

**Dr hab. Monika Pietrowska**

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie – Państwowy Instytut Badawczy  
oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15  
44-102 Gliwice  
tel. (32) 278 96 72  
e-mail: [monika.pietrowska@io.gliwice.pl](mailto:monika.pietrowska@io.gliwice.pl)

**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej **mgr Marty Nolki-Szaszner** zatytułowanej „*Analiza proteomiczna i metabolomiczna procesów indukcji pluripotencji w mioblastach oraz różnicowania indukowanych komórek macierzystych w kierunku komórek kardialnych*” wykonanej w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

Terapia komórkowa jest wykorzystywana w medycynie regeneracyjnej i ma na celu odbudowę zniszczonej bądź uszkodzonej tkanki. W tego rodzaju terapii idealnym modelem jest wykorzystywanie komórek autologicznych, czyli pochodzących od pacjenta, gdyż minimalizujemy w ten sposób ryzyko odrzucenia przeszczepionej tkanki. Zjawisko indukowanej pluripotencji komórek macierzystych (ang. induced pluripotent stem cells, iPSC) jest przełomem w badaniach nad regeneracją narządową. Z kolei komórki iPSC to generowane z autologicznych komórek somatycznych dorosłego gospodarza, przeprogramowane komórki, które mają zdolność do różnicowania się do wszystkich tkanek i komórek. Mimo postępu w medycynie regeneracyjnej i opracowania sposobów uzyskiwania komórek iPSC, wciąż istotne są badania zarówno *in vitro* jak i *in vivo* optymalizujące metodologię otrzymywania oraz wyjaśniające zmiany molekularne zachodzące w trakcie odróżnicowywania i późniejszego różnicowania komórek iPSC. Poznanie mechanizmów leżących u podstawy tych procesów jest konieczne zdaniem Autorki prezentowanej rozprawy doktorskiej aby uzyskać pewność, że zaproponowana terapia jest wydajna, a przede wszystkim, bezpieczna. Analizy funkcjonalne komórek iPSC *in vitro* oraz *in vivo* mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów zachodzących w trakcie procesów odróżnicowywania i późniejszego różnicowania, i tym samym przyspieszyć wprowadzanie technik opartych na komórkach iPSC do kolejnych etapów badań klinicznych. Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było opisanie zmian zachodzących w trakcie indukcji pluripotencji w mioblastach ludzkich, jak również w trakcie różnicowania uzyskanych komórek iPSC w kierunku komórek o charakterze kardialnym. Ocenie poddano również zmiany zachodzące po podaniu komórek kardialnych do serca myszy, u których wcześniej wywołano zawał przez podwiązanie lewej tętnicy wieńcowej. Aby zrealizować przedstawione cele mgr Marta Nolka-Szaszner wykorzystwała w swoich badaniach nowoczesną technikę analityczną - spektrometrię mas. Technologia ta umożliwia opisanie globalnych zmian zachodzących w proteomie czy metabolomie komórek lub tkanek w trakcie zachodzących procesów odróżnicowywania i ponownego różnicowania. Ze względu na powyższe tematyka pracy badawczej, której podjęła się mgr Marta Nolka-Szaszner jest bardzo aktualna, a uzasadnienie wyboru problemu badawczego jest wystarczające.

W związku z tym, że w badaniach których podjęła się Doktorantka nie istnieje tzw. „złoty standard” postępowania, etap optymalizacji procedury analitycznej jest konieczny w każdej pracy badawczej wykonywanej w tej dziedzinie. Doktorantka zdecydowała się na zastosowanie do odróżnicowania mioblastów metod bazujących na wykorzystaniu wektorów wirusowych w dwóch różnych protokołach: STEMCCA oraz SENDAI, będących jednymi z kilku standardowych metod postępowania. Doktorantka zadbała również, aby zoptymalizować etap hodowli *in vitro*, a jej efekty potwierdzić kilkoma niezależnymi testami. W mojej opinii ten etap pracy doktorskiej został bardzo poprawnie i w pełni zrealizowany. Do oceny składu białek preparatów między innymi wyjściowych mioblastów oraz mioblastów w siódmym dniu procesu odróżnicowywania, komórek iPSC oraz komórek o charakterze kardialnym wykorzystano analizę proteomiczną z wykorzystaniem podejścia LC-MS/MS. Porównawcze analizy profili metabolicznych komórek prowadzono z wykorzystaniem układu GC-MS. Techniki wysokoprzepustowe wspomagane są w przedstawianej do recenzji pracy doktorskiej przez techniki biologii molekularnej takie jak: analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, testy różnicowania mioblastów, testy



cytogenetyczne oraz barwienia immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał w celu weryfikacji obecności i lokalizacji badanych białek. Wymienione techniki to tylko niektóre z technik biologii molekularnej, których wyniki są zaprezentowane w pracy doktorskiej. Dobór molekularnych narzędzi badawczych do rozwiązania postawionego przed mgr Martą Nolką-Szaszner problemu oceniam bardzo dobrze. Należy również podkreślić duży nakład pracy eksperymentalnej Doktorantki. Wykazała się ona dużą wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnościami prowadzenia pracy badawczej na bardzo dobrym poziomie. Różnorodność technik wykorzystywanych podczas realizacji badań pozwoliła na wielostronne scharakteryzowanie modelu badań.

Pod względem redakcyjnym pracę doktorską rozpoczyna szczegółowy wykaz skrótów oraz jej streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska została zredagowana w języku polskim i obejmuje 150 stron tekstu wliczając w to obszerny przegląd literatury (bibliografię stanowi 146 pozycji). Układ pracy jest typowy. Zawiera standardowe dla tego typu dzieł naukowych rozdziały tj. przegląd literatury, cele, metodykę badawczą, wyniki oraz dyskusję, podsumowanie i wnioski, a także bibliografię (w wymienionej kolejności). Wstęp pracy doktorskiej stanowi 26 stron (zawierających poza tekstem 4 ryciny oraz 2 tabele) starannie omawiające aktualny stan wiedzy związany z prowadzonymi przez Doktorantkę badaniami naukowymi. Poszczególne podrozdziały tej części są napisane z dużą znajomością tematu. Doktorantka opisała też w kilku rozdziałach nowoczesne techniki analityczne, które wykorzystała w realizacji swoich badań. Doktorantka jasno określiła cele pracy doktorskiej.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały przedstawione w sposób systematyczny. Opisy doświadczeń w rozdziale pracy doktorskiej dotyczącym metod wykorzystanych podczas jej realizacji są kompletne i szczegółowe w stopniu pozwalającym na powtórzenie badań w innych laboratoriach. Jedyłą uwagę jaką można mieć na tym etapie to brak konkretnego podsumowania efektów tych prac. Jedyne wątpliwości recenzenta budzi opis wykonanych analiz statystycznych i bioinformatycznych. Utrudnia to odbiór i interpretację prezentowanych przez Doktorantkę wyników. Na szczęście dla recenzenta rozdział ten zawiera ryciny i tabele ułatwiające odbiór zarówno tej części pracy jak i zrozumienie prezentowanych w pracy doktorskiej wyników badań. Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane na 12 stronach rozdziału Dyskusja ze zwróceniem szczególnej uwagi na ograniczenia stosowanych metod, co świadczy moim zdaniem o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Podsumowując ocenę tematyki badań i jej realizacji przez Doktorantkę, przedstawię do recenzji pracę oceniam wysoko. Mimo że nie zabrakło w zaprezentowaniu wyników badań potknięć, to badania będące jej przedmiotem mają charakter nowatorskich, zostały bardzo dobrze zaplanowane i zrealizowane.

Doktorantka nie uniknęła niestety licznych błędów językowych i stylistycznych, z których wymienię kilka:

1. „ilość pasaży” (strona 21), pasaż czyli proces polegający na usunięciu komórek z naczynia hodowlanego i przeniesieniu do nowej pożywki w celu utrzymania komórek w odpowiednio niskiej gęstości (konfluencji), aby stymulować dalszy wzrost jest rzeczownikiem policzalnym, liczba dotyczy rzeczowników policzalnych, ilość zaś niepoliczalnych;
2. „odpowiednik polski” (tabela skrótów, strona 7) zamiast rozwinięcie skrótu w języku angielskim i rozwinięcie skrótu w języku polskim;
3. rozwinięciem skrótu QC jest kontrola jakości, a nie „kontrola jakości próbki” (jest to raczej kontrola działania systemu analitycznego jakim jest chromatograf oraz spektrometr mas jeśli już, o czym Doktorantka pisze na stronie 38). Próbki stanowiące kontrolę jakości powinny być standardem w zarządzaniu kontrolą jakości każdej metody analitycznej, nie tylko metabolomiki
4. „znaczące zwiększenie liczby metabolitów” (strona 38);
5. „w przypadku techniki western blot” (strona 43);
6. „wialki” (na przykład strona 47) w języku polskim z powodzeniem funkcjonują określenia fiołka chromatograficzna, próbówka chromatograficzna;
7. „markery wzorcowe” (strona 47) wzorce mas;
8. „woda MiliQ” (strona 48) woda podwójnie destylowana, dejonizowana, o oporności 18,2 MΩ\*cm, ewentualnie woda filtrowana w systemie MiliQ;
9. „dwukrotnie zmieniając bufor” (strona 50) możemy się jedynie domyślać czy chodzi o zmianę na inny bufor, czy o wymianę buforu na jego nową porcję;
10. „stężenie białka mierzono” (strona 50) - w tym przypadku stężenie wyznaczano na podstawie zmierzonej wartości absorbancji;

11. „do świeżych probówek typu Eppendorf” - zdecydowanie lepiej brzmi nowych;
12. „heatmapy” (strona 35) w języku polskim mapy ciepła.

Niestety w tej interesującej i bogatej eksperymentalnie pracy doktorskiej pojawiają się błędy edytorskie. Język pracy jest często nieprecyzyjny i pełen żargonu naukowego. Trudno przytaczać wszystkie występujące w pracy doktorskiej niepoprawne wyrażenia, ograniczę się znów do kilku przykładów:

- „Główne etapy pracy opierają się na konwersji surowych danych, aby **zyskały wartość naukowa**.” (strona 38);
- „Stężenie białka obliczono z wykorzystaniem regresji liniowej.” (strona 60);
- „Dokonano również porównania obserwowanych zmian akumulacji białek do tych powiązanych z **typowymi zaburzeniami** charakterystycznymi dla patogenez **niektórych chorób**.” (strona 72);
- „Przeszukiwanie baz danych odbywało się przy wykorzystaniu algorytmu uwzględniającego **ściśle określone** parametry wyszukiwania.” (strona 52);
- „Zakres tolerancji mas peptydów określono na równy 0.2 Da.” (strona 52) – zapewne chodzi o zakres tolerancji błędu z którym oprogramowanie będzie przypisywać masy peptydów uzyskane eksperymentalnie do teoretycznych mas peptydów;
- „Natomiast różnice pomiędzy profilami mioblastów reprogramowanych *in vitro* z wykorzystaniem **różnych metod** nie były aż **tak wyraźne**” (strona 69); - metody były dwie, a analiza głównych składowych służy głównie do redukcji zmiennych opisujących dane oraz odkrycia ewentualnych prawidłowości między ich cechami, nie do „opisywania różnic”;
- „**intensywny wzrost akumulacji bardzo wielu białek**” (strona 10) – bardzo często pojawiają się w pracy redundantne połączenia wyrazowe;
- „Im większa liczba zidentyfikowanych fragmentów tym większe prawdopodobieństwo prawidłowej identyfikacji peptydu.” (strona 35);
- „Wybór odpowiedniej metody normalizacji jest istotny w analizie proteomicznej, powszechną praktyką jest przeprowadzenie transformacji logarytmicznej na wartościach intensywności zarejestrowanych na widmie mas jonów.” (strona 35);
- „funkcjonalne analizy bioinformatyczne wyników” (strona 8).

Doktorantka w pracy podaje: „Materiał otrzymano dzięki współpracy ze szpitalem Med Polonia w Poznaniu. Na badania uzyskano odpowiednią zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.” Dobrą praktyką w takim przypadku jest podanie numeru zgody Komisji Bioetycznej.

Swoją pracę doktorską mgr Marta Nolka-Szaszner przygotowywała pod opieką promotorów w osobach Prof. dr hab. Macieja Kurpisza oraz dr hab. Magdaleny Łuczak. Promotorzy są rozpoznawalnymi i cenionymi specjalistami w dziedzinach badań, które w swojej pracy doktorskiej z sukcesem połączyła mgr Marta Nolka-Szaszner. Prof. dr hab. Maciej Kurpisz jest autorytetem w badaniach nad właściwościami komórek macierzystych i możliwościami ich zastosowania w regeneracji narządowej, natomiast dr hab. Magdalena Łuczak od lat wykorzystuje techniki spektrometrii mas między innymi w ocenie zmian proteomu oraz metabolomu w progresji miażdżycy nerek. Praca doktorska została zrealizowana jako w ramach prowadzonego projektu naukowego STRATEGMED-EPICELL finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

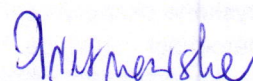
W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości na które nie znalazłam odpowiedzi w recenzowanej pracy doktorskiej. W związku z tym miałabym prośbę do Doktorantki, aby w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej wyjaśniła kilka kwestii o których poniżej:

1. Jakie przesłanki kierowały nią przy wyborze protokołów generowania komórek iPS? Dlaczego ostatecznie zdecydowała się również na system SENDAI?
2. Czy interpretacja analizy głównych składowych jako metody oceny różnic jest poprawna? Czy Doktorantka sprawdzała, czy kolejne składowe nie były ze sobą skorelowane? Czy wcześniej usunięto wartości odstające z badanej próby? Czy spełnione zostało kryterium reprezentatywności próby?
3. Czy Doktorantka mogłaby przybliżyć wykonaną procedurę wstępnej obróbki danych w celu umożliwienia ich wzajemnego porównywania i dalszej analizy tj. normalizację danych?

4. Czy Doktorantka może podać charakterystykę genetyczną myszy szczepu Nod Scid wykorzystanych w prowadzonych w pracy doktorskiej eksperymentach?

Podsumowując, przedstawione przeze mnie powyżej uwagi i wątpliwości nie umniejszają mojej pozytywnej oceny całości rozprawy, którą uważam za wartościową i oceniam dobrze. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością prowadzenia pracy badawczej. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy przedstawionej powyżej oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Marty Nolki-Szaszner spełnia wszystkie niezbędne warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi uzupełnieniami.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk wnioski o dopuszczenie Pani mgr Marty Nolki-Szaszner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Monika Pietrowska, Prof. NIO-PIB