



UNIwersytet  
Warszawski



Wydział Biologii  
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych  
Zakład Cytoologii  
dr hab. EDYTA BRZÓSKA-WÓJTOWICZ, prof. ucz.

Warszawa, 24.10.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Anety Grymanowskiej pod tytułem:  
„Ocena zmienności kształtu jądra neuralnych komórek macierzystych  
neurogenezy hipokampalnej dorosłych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Anety Grymanowskiej pod tytułem: „Ocena zmienności kształtu jądra neuralnych komórek macierzystych neurogenezy hipokampalnej dorosłych” została wykonana pod opieką pana dr hab. Roberta Filipkowskiego i pani dr Adrianę Magalskiej, w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN. Rozprawa Kandydatki jest pracą projektową i **spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim**, określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym.

**Problem naukowy rozprawy**

Pani mgr inż. Aneta Grymanowska prowadziła badania dotyczące możliwości oceny kształtu i parametrów wielkości jądra komórek uczestniczących w neurogenezie hipokampalnej u dorosłych osobników. Badania Doktorantki prowadzone były z wykorzystaniem modelu myszy transgenicznych z wprowadzonym genem białka zielonej fluorescencji pod promotorem nestyny. Ponadto Autorka opracowaną przez siebie metodę analizy jąder komórkowych wykorzystywała do oszacowania parametrów wielkości jąder w komórkach dwóch typów ludzkich nowotworów mózdzku tj. rdzeniaka zarodkowego i gwiazdziaka włosowatokomórkowego. Kandydatka prawidłowo określiła cel swojej pracy. Dobrym uzupełnieniem byłoby sformułowanie hipotezy badawczej, której zabrakło w przedstawionej do recenzji pracy.

Rozprawa została opatrzona teoretycznym wstępem, który wprowadza w podjętą tematykę badawczą. W mojej ocenie niektóre wątki podjęte we wstępie wymagałyby rozwinięcia. Przykładem może być opis laminopatii, o których wspomina Kandydatka, w którym zabrakło informacji o mechanizmie powstawania tych chorób. Zagadnienie to wskazuje na istotność prowadzonych badań.

Dość ogólny wydaje się również rozdział dotyczący neuralnych komórek macierzystych pozostających w stanie spoczynkowym i aktywowanych. Ciekawym uzupełnieniem byłby informacje o niszy tych komórek, a także mechanizmach ich aktywacji i różnicowania. Jednakże chciałabym podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **wykazuje wiedzę teoretyczną** Kandydatki w swojej dyscyplinie naukowej.

### **Rozwiązanie problemu naukowego i metodyka badawcza**

Autorka rozprawy doktorskiej podjęła trzy wątki badawcze, po pierwsze opracowała metody badawcze służące do oceny parametrów wielkości jąder komórkowych, po drugie wykorzystwała je do scharakteryzowania kształtu jąder komórek uczestniczących w neurogenezie hipokampalnej u dorosłych myszy. W ostatnim etapie podjęła próbę zastosowania opisanej analizy w ludzkim modelu nowotworowym. W celu rozwiązania problemu naukowego Doktorantka zastosowała różne metody takie jak: immunohistochemia, mikroskopia konfokalna, mikroskopia elektronowa oraz szereg analiz zebranych danych z zastosowaniem programu VisNow i ITK-SNAP. Kandydatka **posiada umiejętność samodzielnego planowania, prowadzenia i przedstawiania rezultatów swojej pracy naukowej**. Jednakże w opisie metod brakuje charakterystyki materiału pobranego od pacjentów. Nie ma także informacji o zgodzie komisji bioetycznej na przeprowadzenie takich analiz.

### **Uzyskane wyniki i ich znaczenie**

Moim zdaniem przedstawiona **rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki wykazanych w pracy należy opracowanie metody oceny parametrów wielkości jądra komórkowego przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz zastosowanie tej metody do kompleksowej oceny komórek neurogenezy hipokampalnej u dorosłych myszy i w modelu nowotworowym u człowieka. Uzyskane wyniki dostarczają ważnych informacji, jednakże pozostawiają kilka pytań. W tym miejscu pozwolę sobie na zadanie najważniejszych pytań dotyczących uzyskanych rezultatów.

1. Doktorantka identyfikowała komórki mysiej neurogenezy hipokampalnej na podstawie obecności w komórkach markerów wymienionych w Tabeli 2. W doświadczeniu I i III neuralne komórki macierzyste, tak zwane komórki typu 1, charakteryzowane są na podstawie posiadania wypustki neuralnej i ekspresji nestyny-GFP. Podczas gdy w doświadczeniu II, w którym analizowano wyłącznie neuralne komórki macierzyste, komórki w stanie spoczynkowym identyfikowano na podstawie obecności GFAP i braku nestyny. Czy zatem neuralne komórki macierzyste w stanie spoczynkowym nie wykazują obecności nestyny i nie były rozpoznawane w doświadczeniu I i III, czy w doświadczeniu II nie jest możliwe ich odróżnienie od komórek w stanie przejściowym I?

2. W opisie wyników Doktorantka wspomina (podrozdział 4.1), że pokazuje wybrane wyniki badań opisujących właściwości komórek uczestniczących w neurogenezie hipokampalnej dorosłych myszy. Na jakiej podstawie wybrano wyniki? Ponadto bardzo interesujące byłoby zobaczenie zdjęć z mikroskopu konfokalnego znakowań immunohistochemicznych skrawków z mózgów myszy, na podstawie których identyfikowano komórki neurogenezy hipokampalnej.
3. Proszę również o wyjaśnienie co Doktorantka rozumie przez termin „gęstość DNA”?
4. Autorka rozprawy wspomina również, iż część z uzyskanych wyników została wyeliminowana. Powstaje zatem pytanie na jakiej podstawie, przy użyciu jakich kryteriów eliminowano wartości odstające w przypadku wyników przedstawionych na Rycinie 7, 8, 11 i 12.
5. W przypadku analiz skrawków od pacjentów Doktorantka dokonała analizy parametrów wielkości jąder komórek w próbkach kontrolnych i nowotworowych. Na jakiej podstawie identyfikowano komórki nowotworowe na skrawkach uzyskanych od pacjentów?
6. W podsumowaniu wyników nie umieszczono informacji o ludzkim modelu nowotworowym. Jakie wnioski uzyskano na podstawie analizy jąder komórkowych w ludzkim modelu nowotworowym?
7. Analiza rezultatów pracy nasuwa także bardziej ogólne pytanie, jak przygotowanie materiału na przykład jego utwalenie lub zamknięcie wpływa na uzyskane wyniki analiz parametrów wielkości jądra komórkowego i ich powtarzalność?
8. Kolejne bardziej ogólne pytanie dotyczy informacji zawartej w rozdziale 1.3.2. Doktorantka wspomina w nim, że nietypowa morfologia jądra komórkowego może być powiązana z pluripotencjalnością komórek. Czy mogę prosić o komentarz do tej informacji?

### **Forma pracy**

Praca jest opatrzona streszczeniem w języku angielskim i polskim, a także wykazem skrótów. Kilku skrótów, które pojawiły się w tekście nie umieszczono w spisie. Tytuł pracy odzwierciedla jej treść. Forma pracy ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Wszystkie pozostałe części rozprawy to jest: wstęp, cele pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusja, podsumowanie i wnioski zostały poprawnie przygotowane. Piśmiennictwo zostało prawidłowo dobrane. Uwagi do formy pracy są:

1. W metodach i wynikach brakuje informacji, który z zastosowanych modeli badawczych jest przedmiotem opisu. Utrudnia to analizę tekstu.
2. Kolejność i numeracja rozdziałów jest zaskakująca. Rozdziały z numerami 1-6 znajdują się na końcu pracy po raz drugi.
3. W podrozdziale 1.3.1, Doktorantka wspomina, że neuralne komórki macierzyste w stanie spoczynkowym powstają neuronów ziarnistych. Czy Doktorantka ma na myśli odróżnicowanie komórek?

4. Niektóre ryciny nie mają swoich odnośników w tekście np. Rycina 6.
5. Nie podano informacji jakie przeciwciężło zostało zastosowane podczas znakowania skrawków do mikroskopu elektronowego?
6. Przedstawiona w dyskusji Tabela 3 jest bardzo ogólna, forma zawartych w niej informacji nie ma charakteru języka naukowego.
7. Tytuły podrozdziałów w dyskusji są bardzo ogólnikowe i również nie mają cech języka naukowego.
8. Doktorantka stosuje wiele mało precyzyjnych terminów takich jak: „wyjątkowo odróżniający się”, „mała objętość”, „mała kulistość”, „wyższe/nizsze jądra komórkowe”, „najbardziej kuliste jądra komórkowe”.
9. W dyskusji brakuje fragmentu poświęconemu wynikom uzyskanym z ludzkiego modelu nowotworowego.

#### **Wniosek końcowy**

**Podsumowując mogę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w swojej dyscyplinie naukowej, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia przez niego pracy badawczej. W mojej opinii przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artykułe 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym. Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN o dopuszczenie pani mgr inż. Anety Grymanowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie: nauki medyczne.**

dr hab. Edyta Brzóska-Wójtowicz, prof. ucz.