



POLSKA AKADEMIA NAUK  
**Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego**

instytut biologii doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

Zakład Biochemii  
Pracownia Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa  
Tel. (22)5892456; Fax: (22) 8225342, e-mail: j.redowicz@nencki.gov.pl

Prof. dr hab. Maria Jolanta Rędownicz  
Kierownik Pracowni Molekularnych  
Podstaw Ruchów Komórkowych

Warszawa, 26 maja 2017 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Damiana Lewandowskiego  
pt. "Porównawcze badania rozwoju mięśni miotomalnych oraz mięśni kończyn  
wybranych przedstawicieli gadów (*Reptilia*)"  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Daczewskiej, prof. nadzw. UW  
z Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego

Z lektury ogromu doniesień z ostatnich lat można odnieść wrażenie, że wszystko już wiemy o tym jak powstają, jak różnicują i jak regenerują mięśnie kręgowców. Przyglądając się jednakże bliżej wynikom badań, od kilku już dekad prowadzonych na poziomie molekularnym z wykorzystaniem wyrafinowanych technik genetycznych, biologii molekularnej i komórkowej okazuje się, że są one w zasadzie ograniczone do zaledwie kilku gatunków, głównie organizmów modelowych, takich jak danio przegowane, żaby z rodzaju *Xenopus*, mysz czy szczur. Natomiast w zasadzie nic nie wiemy o tym, jak te procesy przebiegają u gadów i niewiele o tym, jak to się odbywa u ptaków. Przyjęło się, że powinny przebiegać dość podobnie do organizmów z "sąsiadujących" szczebli ewolucji. I jak się okazuje z przedstawionej mi do recenzji rozprawy mgr. Damiana Lewandowskiego to założenie nie do końca jest słuszne, natura nie lubi bowiem monotonii...

### Formalny opis rozprawy

Licząca 105 stron rozprawa posiada w zasadzie układ typowy dla rozpraw doktorskich. Część merytoryczna rozpoczyna się opisem dorobku naukowego Doktoranta oraz wykazami najczęściej stosowanych skrótów oraz rycin i tabel. Wstęp liczy 15 i zawiera cztery ryciny; po krótkim sprecyzowaniu celów pracy znajduje się liczący 11 stron rozdział Materiały i metody, w którym jest pięć tabeli i trzy ryciny prezentujące zdjęcia badanych gadów. Wyniki liczą 26 stron i zawierają 18 rycin, w większości złożonych. Na Dyskusję składa się 13 stron, a dodatkowe 2 strony tego rozdziału to Podsumowanie i wnioski. Streszczenia w języku polskim i angielskim liczą po 2 strony. Rozprawa kończy się spisem piśmiennictwa, na które składa się ok. 210 pozycji (nie numerowanych), z czego ok. 30% to prace z ostatniej dekady.

### Ocena merytoryczna

Wykaz skrótów jest krótki, acz wyczerpujący, podane nazwy są w zasadzie prawidłowe, z wyjątkiem DAPI. Zastanawiam się również, dlaczego Doktorant zróżnicował nazwy rycin - są i ryciny, i zdjęcia i fotografie, a jeszcze i wykresy. Moim zdaniem wszystkie te formy prezentacji powinny być nazwane po prostu rycinami.

We Wstępie, który jest wprowadzeniem w tematykę prowadzonych badań Doktorant podsumowuje przede wszystkim dotychczasową wiedzę nt. procesów miogenezy i różnicowania mięśni kręgowców. Nie mam zasadniczych uwag do części opisującej powyższe procesy, przydałby się może schemat ilustrujący etapy różnicowania mięśni, co byłoby bardzo pomocne w analizie obrazów prezentowanych później w wynikach (idealnie byłoby wręcz, gdyby też w wynikach każdy z etapów różnicowania był poparty stosownym schematem). Moje zatroskanie budzi jednakże dość niefrasobliwy opis aparatu kurczliwego i mechanizmu skurczu, mam bowiem wrażenie, że Doktorant nie widzi różnic między mikrofilamentami a filamentami cienkimi, a i nie bardzo rozumie, jak generowana jest siła skurczu. Oczekuję, że Doktorant zrehabilituje się podczas obrony rozprawy.

Podjęcie celu pracy, jakim jest dokonanie analizy porównawczej rozwoju mięśni szkieletowych wybranych przedstawicieli gadów: zaskrońca zwyczajnego (*Natrix natrix*), kobry egipskiej (*Naja haje*) oraz jaszczurki zwinki (*Lacerta agilis*), Doktorant uzasadnia brakiem doniesień nt. miogenezy miotomalnej gadów, przy sporej już wiedzy o miogenezie innych kręgowców. Doktorant zaznacza także, iż w przypadku gadów nie wyłoniono dotychczas modelowego gatunku, co ma miejsce w przypadku innych gromad kręgowców. W pracy skupiono się na analizie różnicowania i wzrostu mięśni miotomalnych węży oraz mięśni kończyn jaszczurki zwinki ze szczególnym uwzględnieniem źródła komórek progenitorowych.

Do realizacji swoich zamierzeń Doktorant wykorzystał mikroskopię świetlną (konfokalną fluorescencyjną) i elektronową (transmisyjną) oraz metody immunocytochemiczne i immunodetekcji typu Western blot. Metody te zostały dość zwięźle opisane w Materiałach i metodach. W tej części rozprawy Doktorant opisał także gady, zarodki których zostały poddane analizie; zastanawiam się dlaczego przedstawił je w odwrotnej kolejności niż je potem analizował. Należy podkreślić, że nie był to typowy materiał badawczy, z jakim spotyka się większość dzisiejszych biologów (od linii komórkowych po organizmy modelowe, z reguły dość łatwo dostępne). W tym przypadku były to jaja (zarodki) zwierząt nie dość, że pod ścisłą ochroną (zwłaszcza te występujące w Polsce), występujące więc dość rzadko, to jeszcze i sezonowe. Na przeprowadzenie badań należało uzyskać szereg formalnych zezwoleń od stosownych instytucji i komisji. Tym bardziej należy docenić fakt, że Doktorantowi udało się zdobyć materiał do przeprowadzenia takiego zakresu badań i uzyskania powtarzalnych wyników, które mogły być poddane analizie statystycznej. Z drugiej strony należy zrozumieć, że nie wszystkie potencjalne analizy mogły być przeprowadzone. Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że Doktorant pogubił się w numeracji tabel i nie zawsze wyjaśniał, czym są niektóre odczynniki; nie wiem np. co to jest perlit lub MS-222. Do oznaczania stężenia białka Doktorant wykorzystał powszechnie znaną metodę Bradford(a), wskazując jednoznacznie, że Bradford to kobieta. Pragnę tu poinformować, że byłej doktorantce z mojej grupy (dr Katarzynie Osieckiej) udało się dotrzeć do szefa autora tej metody, który jednoznacznie stwierdził, że Bradford pomimo imienia Marion to zdecydowanie mężczyzna.

W rozdziale wyniki Doktorant dość klarownie opisuje uzyskane przez siebie wyniki, które przedstawił w postaci bardzo przejrzystych, wręcz eleganckich rycin. Jego pracochłonne i żmudne badania wykazały, że budowa somitu, pochodzenie komórek progenitorowych mięśni, formowanie miotomu pierwotnego oraz wzrost mięśni zaskrońca zwyczajnego i kobry egipskiej wykazują cechy typowe dla miogenezy owodniowców (ptaków, ssaków). Również i rozwój kończyn u jaszczurki zwinki przebiega podobnie jak o innych czworonogów. Z dyskusji wynika, że Doktorant nie był zaskoczony tymi obserwacjami. Natomiast, pomimo dużego podobieństwa miogenezy miotomalnej węży do miogenezy owodniowców Doktorant zauważył cechy, które wydają się być specyficzne tylko dla węży,

a mianowicie obecność kropli (pęcherzyków?) lipidowych wokół jądra komórkowego jednego z typu mięśni czerwonych, nie spełniających jego zdaniem funkcji motorycznych. Doktorant przypuszcza, że może to być rezerwuuar lipidów wykorzystywanych podczas hibernacji i tę możliwość dyskutuje, wskazując również na konieczność przeprowadzenia analiz składu tych pęcherzyków lipidowych. Ale przecież jaszczurki też hibernują i takich struktur nie tworzą, nie mówiąc już o płazach. Dlaczego to miałyby być specyficzne jedynie dla węży? A może ten magazyn jest niezbędny do generacji energii niezbędnej do produkcji mięśni w dalszych stadiach rozwoju (osobniki dorosłe to praktycznie same mięśnie)? Chętnie podyskutuję z Doktorantem w tej materii?

Doceniając to co Doktorant zrobił, nie mogę ustrzec się od uwag krytycznych co do formy prezentacji wyników. Tak jak wcześniej pisałam przydałyby się schematy ilustrujące przebieg miogenezy na poszczególnych stadiach, łatwiej byłoby analizować uzyskane obrazy (zwłaszcza w przypadku Fot. 1). Trochę utrudnia śledzenie rycin umiejscowienie opisów na następnej stronie; w takich przypadkach umieszcza się z reguły opisy na dole strony poprzedniej. Dlaczego nie podano grubości skrawka optycznego w przypadku obrazów uzyskanych w mikroskopie konfokalnym? Dlaczego na Wyk. 1 są dwa słupki odpowiadające stadium I; czy nie można było tego uśrednić? Nie dowiedziałam się też, czy wyniki prezentowane na Wyk. 2 są statystycznie istotne? Wprawdzie w opisie ryciny jest podana wartość  $p$ , ale nie ma gwiazdki przy żadnym słupku. Nie znalazłam informacji, w jaki sposób były przeprowadzane analizy densytometryczne. Zastanawiam się, dlaczego Doktorant jako kontrolę poziomu nałożenia wybrał  $\alpha$ -aktyninę; to przecież białko sarkomeryczne, którego znaczną część "gubi" podczas wstępnej obróbki homogenatu. Poza tym, dlaczego Doktorant badał poziom i lokalizację Lbx2, podczas gdy nie wspomniał o tym białku we wstępie; czy Lbx1 (o nim była mowa) i Lbx2 są do siebie podobne w specyficzności działania? Nawiasem mówiąc Doktorant jest niekonsekwentny, pisząc ich nazwę raz z małej, a raz z dużej litery.

Dyskusja jest chyba najlepiej napisaną częścią rozprawy; Doktorant żywym językiem odnosi się w punktach do uzyskanych przez siebie wyników, umiejętnie dyskutując je w oparciu o dane literaturowe (nader skąpe w odniesieniu do gadów) i wskazując zagadnienia, które powinny być jego zdaniem adresowane w przyszłych badaniach. O części z nich wspomniałam wcześniej. To czego mi zdecydowanie zabrakło w tej części rozprawy to tabela (schemat?), w której Doktorant przedstawi i porówna uzyskane przez siebie dane dla poszczególnych stadiów rozwoju mięśni dla badanych trzech gatunków gadów w stosunku do nich samych, jak i kręgowców na niższym i wyższym szczeblu ewolucji. Wzmocniłoby to moim zdaniem nośność jego dokonań. Liczę, że Doktorant będzie w stanie takie sumaryczne podsumowanie przygotować na obronę rozprawy. Doktorant wspomniał w założeniach, że nie ma organizmu modelowego dla gadów. Czy jego badania mogą przyczynić się to wytypowania takowego modelu?

Literatura jest dobrze dobrana, acz brakuje mi tu nowszych prac odnoszących się do molekularnych aspektów miogenezy, choćby z grupy Rudnickiego w odniesieniu do ssaków czy Jagły w odniesieniu do *Drosophila*.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca jest zredagowana w sposób staranny, napisana w miarę poprawną polszczyzną. Doktorant nie ustrzegł się jednak od literówek i kalek z języka angielskiego. Pozwolę sobie wskazać te najbardziej mnie rażące. N-koniec, czyli koniec aminowy łańcucha polipeptydowego to kalka z *N-terminus*; swoim podopiecznym radzę, aby przy pierwszym użyciu tego zwrotu napisali go w nawiasie, obok poprawnej nazwy, a potem już stosowali tę skróconą formę. Skąd się wzięły

mięśnie tułowiowe zamiast mięśni tułowia? Jeśli Doktorant byłby konsekwentny, to dlaczego nie napisał mięśnie kończynowe w miejsce mięśni kończyn... Nie podobają mi się wmgrowanie, zwirowanie czy odpreparowanie. Błędą po polsku nazwą jest poliakrylamidowy, powinno być poliakryloamidowy, bo przecież fenylo, metylo czy etylo...

## Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pana mgr. Damiana Lewandowskiego ma dużą wartość poznawczą poszerzając wiedzę o przebiegu miogenezy u gadów. Doktorant trafnie zdefiniował cele badawcze, podjął właściwe (w tym szczególnym przypadku należałoby również napisać możliwe) kroki do ich zrealizowania i umiejętnie przedyskutował uzyskane wyniki w oparciu o skąpe doniesienia literaturowe (nie z racji ich pominięcia, a po prostu braku). W mojej ocenie badania Doktoranta doprowadziły nie tylko do opisania przebiegu miogenezy, ale i wskazały na istotne, dotychczas nie obserwowane różnice w przypadku rozwoju mięśni szkieletowych węży. Są zatem nowatorskie i stanowią zaczątek do dalszych badań. Znaczna część wyników została przedstawiona w dwóch artykułach opublikowanych w *Protoplasma* (IF>2,3), przy czym w jednym z nich Doktorant jest pierwszym autorem. Jest On również współautorem artykułu przeglądowego w *Postęпах Biologii Komórki*. Moim zdaniem Doktorant wydaje się być dobrze przygotowany do pracy badawczej.

Rolą recenzenta jest przede wszystkim rzetelna ocena rozprawy, w mojej opinii jest zatem sporo uwag i komentarzy krytycznych, ale chciałabym podkreślić, że nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny rozprawy jako całości. Liczę także na żywą dyskusję w trakcie obrony odnośnie podniesionych przeze mnie kwestii i sugestii.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr. Damiana Lewandowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Rezeda