

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana magistra Mateusza Mołonia pod tytułem:

„Rola tempa wzrostu objętości komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w determinowaniu ich potencjału replikacyjnego i długości życia”

Magister Mateusz Mołoń wybrał na temat swojej rozprawy problem starzenia się organizmów. Taki temat wzbudza zrozumiałe zainteresowanie i emocje wśród wszystkich, także profesjonalnych badaczy. Jest to z jednej strony stymulujące ale może też doprowadzić do osłabienia krytycyzmu i obniżenia standardów naukowych. Gerontologia zna wiele takich przypadków. Kontrowersyjny bywa już sam wybór organizmu do badań. Tak jest w przypadku jednokomórkowych drożdży używanych jako model do badania długowieczności organizmów wielokomórkowych. Stosowanie drożdży jako modelu w badaniach podstaw genetyki, biochemii i biologii komórkowej doprowadziło do wielu sukcesów. Nie oznacza to jednak, że można je stosować z równym powodzeniem w innych dziedzinach. Wybierając takie zagadnienie i taki organizm mgr Mołoń musiał się zmierzyć nie tylko z samą pracą badawczą ale też umieścić ją w kontekście badań wcześniejszych, które były liczne, ale które oprócz cennych osiągnięć przyniosły też sporo wyników niepewnych a nawet pozornych. Zaznaczam to na wstępie mojej recenzji, aby podkreślić, że jakkolwiek przedstawiona praca ma charakter eksperymentalny, to istotnym elementem jej oceny musi być odniesienie się do jej warstwy koncepcyjnej. Od razu też powiem, że waga podejmowanego zagadnienia i celność krytyki badań wcześniejszych przeprowadzonej przez autora są atutami tej pracy i istotnie podnoszą jej ogólną ocenę. Podsumowując, temat pracy oceniam jako dobrze dobrany, znajdujący się w obszarze zainteresowań współczesnej nauki i mogący wnieść do niej nowe elementy wiedzy, a tym samym odpowiedni dla rozprawy doktorskiej.

We wstępie doktorant przedstawił wszystkie ważniejsze teorie tłumaczące proces starzenia się organizmów dzieląc je na ewolucyjne i mechanistyczne. Te pierwsze zostały potraktowane skrótowo, brakuje mi zwłaszcza choćby rudymentalnego przeglądu empirycznych testów tych koncepcji. Rozumiem jednak, że autor jest lepiej przygotowany do referowania hipotez mechanistycznych i to zrobił bardzo dobrze. Dalsza część wstępu omawia wcześniejsze zastosowania drożdży w badaniach długości życia i starzenia się. Zarówno badania tak zwanego replikacyjnego jak i chronologicznego starzenia się drożdży przedstawione są wyczerpująco i poprawnie. Nie mogę się jednak zgodzić z twierdzeniem autora, że: „Pożytki minimalne stosowane w badaniach chronologicznego starzenia w doskonały sposób naśladują warunki panujące w naturze”. Nie wiemy, w jakich warunkach żyją drożdże piekarnicze w naturze. Byłoby lepiej gdyby autor przyjął, że laboratoryjne warunki hodowli wcale nie

muszą naśladować naturalnych by wyniki eksperymentów były wartościowe. Szczególnie ważny dla niniejszej rozprawy powinien być opis mutacji wpływających na różne miary długowieczności. Nie można powiedzieć by odnośny fragment był zbyt krótki. Jest tam wiele informacji o poszczególnych genach, których mutacja zmienia długość życia, szczególnie o tych genach, których delecje będą używane w eksperymencie. Brakuje jednak uzasadnienia dlaczego akurat te geny uznane zostały przez doktoranta za szczególnie ważne. Czy reprezentują one główne klasy genów wpływających na długowieczność, są ciekawymi wyjątkami, czy też są ważne z innych powodów. Te braki powodują, że kończący wstęp podrzdział „Cel pracy” wyraźnie rozczarowuje. Jest to raczej zapowiedź podjętych i opisanych dalej czynności laboratoryjnych niż sformułowanie celu naukowego. Jaki był cel badań staje się powoli jasne w trakcie czytania całej rozprawy. Recenzent musi go odkryć, inni czytelnicy mogą być mniej motywowani i należało im w tym pomóc.

Opisy metod są obszerne i pozwalające na odtworzenie eksperymentów, tym samym są poprawne. Szczegółowe opisy procedur bez odwoływania się do innych prac mogłyby oznaczać, że zostały one rozwinięte samodzielnie przez autora. Nie twierdę, że autor to sugeruje. Raczej nie dopilnował odpowiedniego cytowania źródeł (drukowanych lub istniejących w Internecie) i określenia swojego ewentualnego wkładu w modyfikację stosowanych procedur. Nawet używając zestawów komercyjnych dobrze jest docenić tych, którzy byli pomysłodawcami metody. Tym bardziej, gdy pisze się o nieco bardziej złożonych procedurach, np. transformacji z wykorzystaniem octanu litu, o której to technice i jej historii recenzent akurat trochę wie, lub o profilowaniu polisomów, o czym wie niewiele.

Ważną częścią pracy jest oczywiście rozdział prezentujący wyniki analiz eksperymentalnych. Tytuł rozdziału okazuje się być mylący bo rozpoczyna się on podaniem niektórych (bo inne są jeszcze dalej) argumentów stojących za wyborem stosowanych szczepów i badanych delecji. Następnie mamy podrzdział zatytułowany „Przygotowanie materiału badawczego”. Właściwe wyniki zawierają dane o: krzywych wzrostu, liczbie pączków, zmianach objętości komórki, a także reprodukcyjnej i wreszcie po-reprodukcyjnej długości życia. Przeprowadzono je dla trzech szczepów, w każdym dla typu dzikiego i czterech mutantów. Testy wydajności translacyjnej i aktywności metabolicznej przeprowadzono dla jednego szczepu i dwóch mutantów. Przed oceną wartości naukowej tych wyników zwróć uwagę na nieprawidłowości w ich prezentacji i analizie.

(1) Autor poprzestaje na prezentacji graficznej i słownym opisie krzywych wzrostu w kulturach płynnych badanych szczepów. Parametry wzrostu można było i należało skwantyfikować. Służyć temu może dopasowanie danych do wybranych modeli wzrostu. Takie krzywe mają po co najmniej dwa parametry i bywają trudne w interpretacji. Można zatem uwzględnić tylko fazę wzrostu wykładniczego i wyliczać, z dobrym przybliżeniem, maksymalne tempo wzrostu jako regresję zlogarytmowanego zagęszczenia. Taki parametr, wraz z oszacowaniem błędu, nadaje się do bezpośrednich porównań tempa wzrostu różnych szczepów.

(2) Dane o potencjale reprodukcyjnym przedstawiono w formie opadających krzywych pokazujących jaki procent komórek zdołał przeprowadzić jedno, dwa, trzy, itd. pączkowań. Taki wykres wygląda jak krzywa przeżywania i autor przyjął tę konwencję. Tymczasem jedną z głównych, i akceptowanych przez recenzenta, tez tej rozprawy jest

to, że liczba pączkowań jest przede wszystkim liczbą pączkowań a nie oczywistą miarą długowieczności. Należało chyba dać rozkłady częstości gdzie na osi poziomej byłyby liczby pączków a na osi pionowej liczby szczepów, które je osiągnęły. Tym bardziej, że o wykryciu różnic między szczepami decydował test t oparty właśnie na średniej liczbie pączków, a nie na różnicach w przebiegu krzywych rzekomego przeżywania. Różnice w krzywych przeżywania są znacznie trudniejsze do wykrycia i interpretacji.

(3) W Metodach autor zapewnia, że przeprowadzono po kilka niezależnych pomiarów potencjału reprodukcyjnego (czyli liczby pączkowań) dla kilkunastu komórek dla każdego szczepu i mutantu. Nie znalazłem jednak informacji, które z powtórzeń zostały użyte do porównań między mutantami (od ryciny 18 i tabeli 4). Mogę sądzić, że użyto sum uzyskanych ze wszystkich powtórzeń i że takie postępowanie jest przyjęte w kręgu badaczy replikacji drożdży. Nie znaczy to, że jest poprawne. Należało najpierw przeprowadzić analizę dwuczynnikową, gdzie obok szerepu występowałby czynnik powtórzenia. Po wykazaniu, braku statystycznie istotnych różnic między powtórzeniami można je bezpiecznie złączyć.

(4) Zmiany wielkości komórek pokazane są jako funkcja liczby pączkowań. Rozumiem, że dla autora szczególne ważnym wynikiem jest wielkość końcowa komórki matki. Ale, tempo osiągania tej wielkości jest chyba też nie bez znaczenia. Należało zatem przeprowadzić porównanie nachylenia prostych regresji lub, bardziej ogólnie, analizę kowariancji.

(5) Dla porównania wielkości komórek, a potem także innych wielkości, doktorant pokazuje średnie i odchylenia standardowe. Różnice istotne na poziomie 0.01 zaznacza gwiazdkami. Tymczasem stosować należy błąd standardowy lub przedział ufności. Odchylenie standardowe jest mylące bo nie uwzględnia wielkości próby. Jeżeli pomierzono 100 komórek, to błąd standardowy jest 10 razy mniejszy niż odchylenie, a 99% przedział ufności niemal cztery razy. Na wielu obecnych wykresach słupki odchylenia standardowego są dość duże i zachodzą na porównywane średnie co jest mylące. Sytuację ratują wspomniane gwiazdki ale tylko częściowo.

(6) Bardzo ważne dla wywodów autora jest stwierdzenie, że ekstremalny wzrost wielkości mutantów *sfp1* na tle BMA często kończy się pęknięciem komórki. Nie widzę dokumentacji tego wyniku w postaci zliczeń, wykresów a tym bardziej testu statystycznego.

Powyższych uwag nie uważam za mało istotne ale, rozważając dostępne dane, jestem przekonany, że ich uwzględnienie nie zmieniłoby jakościowo wyników deklarowanych przez autora. Dlatego nie traktuję ich jako argumentów podważających czy wręcz unieważniających eksperymentalne stwierdzenia pracy.

W swoich dotychczasowych uwagach skupiłem się na negatywnych aspektach przedstawionej rozprawy. Jest to obowiązkiem recenzenta. Nie oznacza to, że nie dostrzegam jej silnych stron. Jak wspomniałem, już samo krytyczne podejście autora do badania starzenia się drożdży zasługuje na uznanie. Łączna ocena wstępu do rozprawy i dyskusji wyników pozwala mi stwierdzić, że doktorant wykazał wymaganą przez ustawę o stopniach i tytule naukowym „ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej”. Oczekiwanie, by rozprawa stanowiła „oryginalne rozwiązanie problemu naukowego” także uznaję za spełnione. Wychodząc od poprawnego

zdefiniowania potencjału reprodukcyjnego, reprodukcyjnej, po-reprodukcyjnej i całkowitej długości życia, potrafił pokazać, że za każdym z tych pojęć kryje się istotna treść biologiczna, zaniedbywana lub nawet fałszowana przez wcześniejsze badania. W szczególności, jest to pierwsza eksperymentalna analiza długowieczności po-replikacyjnej, nie licząc pracy Zadrąg-Tęczy i inn. (2013), której doktorant był zresztą współautorem. Ustawa wymaga też, by rozprawa dowodziła „umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej”. Dostrzegam taki potencjał, ale usilnie namawiam do pogłębienia wiedzy w dziedzinie analizy statystycznej.

Przedstawiona praca jest obszerna, obejmuje 149 stron, zawiera 89 rycin, 15 tabel i 214 pozycji bibliograficznych. Układ rozdziałów jest typowy. Poruszanie się po maszynopisie ułatwia ściśle numerowanie podrozdziałów i umieszczone na jego początku spis treści i lista skrótów. Układ graficzny maszynopisu i wbudowanych wewnątrz rycin jest na ogół przejrzysty i estetyczny. Uchybienia są nieliczne i dotyczą spraw drobnych, na przykład, rozpoczynania akapitu bez wcięcia i niekonsekwentnego, zresztą niepotrzebnego, stosowania szerszej interlinii po niektórych akapitach. Terminologia jest zasadniczo poprawna i konsekwentnie stosowana. Ogólnie, ocena rozprawy od strony redakcji tekstu wypada pozytywnie.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa dowodzi iż jej autor wybrał istotny temat badań. Uzyskał wartościowe wyniki i potrafił je krytycznie przedyskutować. Biorąc pod uwagę te i wcześniejsze stwierdzenia uznaję, że rozprawa odpowiada wymaganiom obowiązującej ustawy o tytule i stopniach naukowych. Wnioskuje do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Mateusza Mołonia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 26.06.2014



prof. dr hab. Ryszard Korona