

Dr hab. inż. Joanna Chwiej, prof. uczelni
Joanna.Chwiej@fis.agh.edu.pl
Zespół Biospektroskopii Atomowej i Molekularnej
Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Kraków dn., 14.06.2021

Opinia o pracy doktorskiej

***„Obrazowanie wewnątrzkomórkowej dystrybucji oraz ocena działania
wybranych substancji egzogennych na komórki z wykorzystaniem
technik mikroskopii ramanowskiej”***

Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz

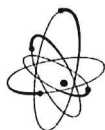
Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca dotyczy oceny możliwości wykorzystania metod obrazowania molekularnego bazujących na zjawiskach spontanicznego i wymuszonego rozpraszania ramanowskiego oraz zaawansowanych metod statystycznej analizy danych spektralnych dla potrzeb charakterystyki fenotypu leukocytów oraz określenia zmian biochemicznych zachodzących na skutek aktywacji komórek następującej wskutek działania różnych czynników egzogennych.

Techniki obrazowania oparte na zjawisku Ramana, ze względu na swoje ogromne zalety, znajdują obecnie coraz szersze zastosowanie w biologii i medycynie. Wymagają jedynie minimalnego przygotowania materiału biologicznego, pozwalając równocześnie na nieniszczące i nieinwazyjne pomiary o wysokiej specyficzności z bardzo dobrą rozdzielczością przestrzenną. Ponieważ informacje o składzie chemicznym próbki biologicznej uzyskuje się bez użycia barwników i znaczników, to obrazowanie ramanowskie dostarcza prawdziwych danych o rozmieszczeniu w niej różnych biomolekuł, w tym białek, lipidów czy kwasów nukleinowych. Nie dziwi zatem wybór technik mikroskopii ramanowskiej jako narzędzi do realizacji badań zaplanowanych w doktoracie, którego temat uważam za ogromnie ważny i aktualny.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz została napisana w języku polskim. Liczy 230 stron i podzielona została na 4 główne części (I. Część teoretyczna, II. Cel pracy, III. Część eksperymentalna oraz IV. Wyniki i dyskusja).

**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej**

Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
tel: +48 12 617 2951, +48 12 633 3740, fax: +48 12 634 0010
e-mail: fizagh@ftj.agh.edu.pl, www.fis.agh.edu.pl



Zasadnicze części pracy poprzedzają: Spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w rozprawie. Na jej końcu znajdują się natomiast, nieobjęte numeracją, ale wyraźnie wyróżnione części pracy zawierające podsumowanie i wnioski z płynących badań, bibliografię, spis ilustracji i tabel oraz wykaz osiągnięć Doktorantki.

W części I Autorka koncentruje się na procesie hematopoezy, podziale leukocytów, ich charakterystyce morfologicznej i funkcjonalnej, opisuje wpływ czynników egzogennych na komórki leukocytów oraz podstawy stosowanych w pracy metod eksperymentalnych i statystycznych. W oparciu o dobrze dobrane i aktualne pozycje literaturowe, Autorka sprawnie przedstawia aktualny stan wiedzy w zakresie tematu rozprawy oraz naświetla motywację, jaka skłoniła ją do podjęcia badań. Ogólny cel pracy i jej cele szczegółowe zostały jasno sformułowane w rozprawie i jawnie zamieszczone w części II. Część III pracy zawiera szczegóły prowadzonych na potrzeby pracy eksperymentów w tym, charakterystykę wykorzystywanego w nich materiału badawczego, warunków pomiarowych czy podejścia do analizy danych. Zasadnicza, IV część rozprawy, stanowi jej kwintesencję prezentując wyniki przeprowadzonych badań i ich dyskusję. Rozprawę kończą dwie bardzo ważne, ale nienumerowane części, zatytułowane „Podsumowanie i wnioski” oraz „Wnioski”.

Układ rozprawy nie jest całkiem typowy, ale w pełni akceptowalny. Pewne zastrzeżenia może budzić numeracja podrozdziałów, która prowadzona jest zupełnie niezależnie od wyróżnionych czterech zasadniczych części pracy, jak również brak numeracji istotnych końcowych części rozprawy zawierających podsumowanie uzyskanych rezultatów i płynące z nich wnioski.

Jak wspomniano na wstępie, praca Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz koncentruje się na identyfikacji charakterystycznych cech biochemicznych różnych typów leukocytów oraz określeniu wpływu wybranych czynników egzogennych prowadzących do ich aktywacji na skład biomolekularny tych komórek. Wykorzystywany przez Doktorantkę materiał badawczy był bardzo bogaty, stanowiły go zarówno komórki pierwotne izolowane od dawców, w tym limfocyty, mononukleary, monocyty, eozynofile i neutrofile, jak również modelowe linie komórkowe – Jurkat, THP-1 i EoL-1. Równie szeroki był zestaw, zastosowanych dla potrzeb realizacji celów rozprawy, metod analizy instrumentalnej. Obejmował on nie tylko, zgodnie z tytułem pracy, różne techniki mikroskopii ramanowskiej, ale również spektroskopię UV-VIS czy mikroskopię fluorescencyjną. Podsumowując, zarówno materiał jak i metody badawcze, które doktorantka wykorzystwała w pracy do przeprowadzenia biomolekularnej charakterystyki leukocytów oraz wpływu na tą charakterystykę wybranych czynników egzogennych, zostały dobrane i zastosowane w sposób poprawny.

Pierwszym bardzo ważnym aspektem pracy była ocena wpływu preparatyki i przechowywania materiału biologicznego oraz warunków pomiarowych na wyniki badań ramanowskich. Uzyskane w ramach tej części rozprawy wyniki pozwoliły na optymalizację protokołu przygotowania komórek oraz ich pomiarów z użyciem metod instrumentalnych bazujących na zjawisku Ramana. Rezultaty

uzyskane w ramach rozprawy potwierdziły użyteczność technik ramanowskich oraz zaawansowanych metod statystycznych w identyfikacji badanych typów agranulocytów i granulocytów oraz zmian molekularnych związanych z aktywacją limfocytów T. Co więcej, pozwoliły uwidocznić różnice w morfologii oraz składzie biomolekularnym linii komórkowych stosowanych jako modele określonych leukocytów pierwotnych. Reasumując, założone cele rozprawy zostały zrealizowane. Uzyskane w ramach rozprawy bardzo ciekawe i obiecujące wyniki zostały przez Doktorantkę przedyskutowane i skonfrontowane z aktualnym stanem wiedzy prezentowanym w najświeższej literaturze naukowej.

Rolą moja jako recenzenta jest także zwrócenie uwagi na niedociągnięcia czy uchybienia, jakie pojawiają się w pracy. Celem ich przedstawienia nie jest wytykanie niedoskonałości rozprawy, a raczej skłonienie do refleksji i motywacja do dalszego doskonalenia się. Uwagi te, które nie umniejszają mojej pozytywnej ocenie pracy, przedstawiam poniżej.

Uwaga 1:

Na str. 31, w części 3.1. Autorka błędnie definiuje absorbancję jako różnicę intensywności promieniowania za i przed próbką.

Uwaga 2:

Na str. 42 Autorka podaje przykłady metod chemometrycznych, wśród nich wymienia „analizę hierarchiczną”, jaką konkretnie metodę ma na myśli?

Uwaga 3:

W pracy pojawia się dość dużo kolokwializmów. Ich sztandarowym przykładem jest sformułowanie: „analiza widm po pasmach charakterystycznych”. Rozumiem, że Doktorantka ma na myśli proces określany w literaturze fachowej jako „mapowanie chemiczne” i oznaczający obrazowanie w 2- lub 3-ch wymiarach intensywności pasma (stosunku intensywności pasm) rozumianej jako jego wysokość (rzadziej) lub pole powierzchni (częśćcej).

Uwaga 4:

Na str. 44 zaprezentowano rozważania dot. rozdzielczości przestrzennej uzyskiwanych map chemicznych. Autorka wiąże tę wielkość tylko z gęstością próbkowania czyli krokiem, z jakim w tym przypadku rejestrowane były widma ramanowskie. A od czego wielkość ta zależy w sensie fizycznym?

Uwaga 5:

Na str. 44 pojawia się stwierdzenie, że w analizie klastrowej z góry zakładamy liczbę skupień. Czy, poza analizą metodą k-średnich, rzeczywiście liczba klastrowa definiowania jest *a priori*?

Uwaga 6:

Str. 51, co oznacza w przypadku osób, od których pobierano krew do izolacji wykorzystywanych w doktoracie komórek, termin „dieta standardowa”? Używa się go oczywiście w kontekście eksperymentów na zwierzętach, w których aby zminimalizować liczbę czynników wpływających na wyniki badań, rodzaj i czasem również ilość pożywienia podlega ścisłej kontroli. A jak jest w tym przypadku?

Uwaga 7:

Duże wątpliwości budzić może podejście do interpretacji wyników analizy składowych głównych. W wielu przypadkach, na wykresach rozrzutu obserwacji w przestrzeni składowych głównych, elipsy prawdopodobieństwa przykrywają się (przynajmniej częściowo), co wskazuje na brak istotnie statystycznych różnic między badanymi populacjami widm. Nawet w takich wypadkach, jednak, Autorka wyciąga bardzo daleko idące wnioski na temat różnic spektralnych między badanymi komórkami w oparciu o uzyskane w PCA wykresy ładunkowe. W oparciu o wykresy ładunkowe można, oczywiście, identyfikować korelacje (dodatnie, ujemne) występujące między składowymi głównymi a zmiennymi pierwotnymi (intensywności ramanowskie). W pewnych sytuacjach mogą one także wskazać, które z częstotliwości najlepiej różnicują analizowane grupy widm. Nie dostarczają, jednak, jednoznacznych informacji na temat tego, jakie są relacje pomiędzy intensywnościami poszczególnych pasm ramanowskich dla analizowanych populacji komórek. Do takich błędnych wniosków może prowadzić również sam opis osi pionowej na wykresach ładunkowych, której to Doktorantka przypisuje nazwę „intensywność ramanowska”.

Uwaga 8:

Nie znalazłam w pracy informacji na temat kryterium w oparciu, o które określana była liczba istotnych z punktu widzenia poszczególnych analiz składowych głównych (procent wyjaśnionej wariancji, kryterium Kaisera czy test osypiska). Jest to o tyle istotne, że w zależności od problemu doktorantka bierze pod uwagę różną liczbę i różne składowe.

Uwaga 9:

Metodę k-średnich Autorka wykorzystuje w pracy do rozróżnienia widm pochodzących z różnych części badanych komórek (jądro, cytoplazma, rejon bogaty w lipidy, etc.). Dlaczego zatem w wielu przypadkach dalszym analizom PCA czy PLS-DA poddaje średnie widma z całych komórek, a nie poszczególnych ich części? Czy takie podejście nie wpływa negatywnie na proces rozdzielenia widm analizowanych populacji komórek w przestrzeni składowych głównych?

Uwaga 10:

Wyniki zamieszczone w rozdziale 7.2. wskazują jednoznacznie na istnienie różnic w widmach ramanowskich pomiędzy limfocytami B i T. Dlaczego zatem porównując te komórki z monocytami i mononuklearnymi, limfocyty B i T „wrzuca się do jednego worka”? Być może włączenie tych dwóch subpopulacji do analizy PCA niezależnie przyczyniłoby się do lepszego rozdzielenia obserwacji w przestrzeni składowych głównych.

Uwaga 11:

Szkoda, że na rysunku 38 nie pokazano dystrybucji lipidów dla spoczynkowych limfocytów T oraz karotenoidów dla komórek aktywowanych.

Uwaga 12:

Przedstawione na rysunku 50 widma jądra komórkowego oraz cytoplazmy eozynofili i neutrofilii uzyskane przy wykorzystaniu laserów o długościach fali 532 i

633 nm są identyczne. Taki wynik może dziwić zwłaszcza w kontekście średnich widm ramanowskich tych komórek uzyskanych przy wykorzystaniu laserów o różnych długościach fali zaprezentowanych na rysunku 49.

Inne wagi techniczno-edytorskie, które nie będą dyskutowane podczas publicznej obrony:

1. Prezentowane w pracy ryciny, schematy i wykresy, przygotowane przez Doktorantkę samodzielnie i z wielką starannością, stanowią bardzo duży atut rozprawy.
2. Niestety w pracy pojawia się dość sporo błędów stylistycznych, gramatycznych i interpunkcyjnych, które w pewnych miejscach utrudniają zrozumienie tekstu. Tak dzieje się zwłaszcza w podrozdziale 8.4 rozprawy, gdzie poza wspomnianymi powyżej niedoskonałościami językowymi, aż 8 razy na stronach 173-180 pojawia się ten sam rysunek 56. Rozumiem, że jest to niedopatrzenie Doktorantki wynikające z ogromnej presji czasu, jaka na niej spoczywała.
3. Na str. 19, w opisie do rysunku 2 pojawiają się informacje na temat komórek NK i makrofagów, chociaż komórek tych nie obejmuje przedstawiony na nim schemat.
4. Na str. 35, na rysunku 8 błędnie oznaczono jedno z przejść jako spontaniczny efekt ramanowski. Ponieważ nie zmienia się tu energia fotonu, mamy do czynienia z rozpraszaniem elastycznym. Przejście to powinno być zatem oznaczone jako rozpraszanie Rayleigha.
5. Str. 36, nie wszystkie symbole pojawiające się w równaniu 1 zostały objaśnione.
6. Na str. 66 powinno być „kondensor” zamiast „kondensator”.

Podsumowanie:

Niezależnie od przedstawionych powyżej uwag, zamieszczone w pracy doktorskiej Pani Aleksandry Borek-Dorosz rezultaty uważam za bardzo cenne. Wskazują one na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie realizowanego tematu, dobre przygotowanie w zakresie stosowanych metod eksperymentalnych, a także predyspozycje do pracy w interdyscyplinarnym zespole. Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz wiąże aspekty analizy chemicznej z badaniami biologicznymi i klinicznymi. Z jej lektury widać, że Doktorantka doskonale zdaje sobie sprawę, że warunkiem uzyskania przez zespół cennych rezultatów jest rzetelna, uczciwa praca każdego z jego członków i rolę członków zespołu, w którym pracuje, nie tylko dostrzega, ale również jasno precyzuje w swojej rozprawie, nie przypisując jedynie własnej osobie uzyskanych w ramach pracy rezultatów.

Należy podkreślić także, że część z przedstawionych w rozprawie rezultatów została już opublikowana w doskonałych czasopismach z listy JCR, jak również zaprezentowana w formie prezentacji ustnych i posterowych na licznych seminariach i konferencjach naukowych. Ponadto, w okresie realizacji doktoratu

Pani mgr Aleksandra Borek-Dorosz była wykonawcą w aż trzech projektach badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych, a mianowicie w dwóch projektach Narodowego Centrum Nauki (Harmonia i OPUS) oraz projekcie Team-Net Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Praca doktorska Pani Aleksandry Borek-Dorosz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne. Dlatego, stwierdzam, że rozprawa spełnia zwyczajowe i formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Janina Chmielewska