

Warszawa, 8 czerwca 2022

**Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej:
„Obrazowanie wewnątrzkomórkowej dystrybucji oraz ocena działania
wybranych substancji egzogennych na komórki
z wykorzystaniem technik mikroskopii ramanowskiej
Mgr Aleksandry Marii Borek-Dorosz**

Praca doktorska Pani mgr **Aleksandry Borek-Dorosz** została wykonana pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej (promotorki pracy) i Pani Dr Katarzyny Majzner, jako promotorki pomocniczej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Celowość podjętych badań.

Tematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz wpisuje się w nurt nowatorskich badań dotyczących wykorzystania metod spektroskopowych w analizie układów biologicznych. Obecnie, techniki spektroskopowe są metodami coraz szerzej stosowanymi w badaniach biomedycznych i analitycznych.

Celem pracy były badania komórek leukocytów, zarówno modeli linii komórkowych jak i komórek izolowanych z krwi ludzkiej z wykorzystaniem szerokiej gamy metod spektroskopowych połączonych z analizami chemometrycznymi. Zasadnicza część pracy dotyczyła badań mających na celu ocenę stanu morfologicznego jak i biochemicznego komórek, związanych z aktywacją leukocytów, w tym stanem zapalnym, zarówno w aspekcie lepszego zrozumienia i poznania mechanizmów molekularnych komórek jak i rozwoju nowych technik szybkiej diagnostyki.

***Kompozycja i zawartość merytoryczna pracy.***

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz napisana jest zgodnie z zasadami przyjętym dla prac w dziedzinie nauk przyrodniczych. Praca jest obszerna i liczy 230 stron, zawiera 56 rysunków/wykresów, 7 tabel. W bibliografii Autorka przytoczyła 239 pozycji literaturowych, na które składają się głównie artykuły zamieszczane w fachowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej i obejmujące okres od lat siedemdziesiątych do najnowszych pozycji. Struktura pracy jest logiczna i przejrzysta. Rozprawa doktorska rozpoczyna się krótkim, trzystronicowym Streszczeniem, w którym Pani mgr Aleksandra Borek-Dorosz przedstawia charakterystykę leukocytów pod kątem ich podziału ze względu na linię rozwoju w procesie hematopoezy oraz na podstawie obecności bądź braku specyficznych ziarnistości w cytoplazmie. Zgodnie z przyjętymi kryteriami podziałów doktorantka opisuje własności granulocytów dzielących się na bazofile, eozynofile, neutrofile oraz agranulocytów, które mogą występować w postaci limfocytów oraz monocytów. Charakterystyka komórek ujmuje ich cechy morfologiczne, markery powierzchniowe, czasy życia oraz ich funkcje w organizmie, w procesach chorobowych i odpowiedziach immunologicznych organizmu. Zgodnie z tym podziałem komórki będą w pracy doktorskiej charakteryzowane.

Kolejno, w Rozdziale 2 Doktorantka opisuje mechanizmy, które powiązane są ze stanem zapalnym komórek leukocytów analizując wpływ czynników egzogennych (czynników indukujących zmiany molekularne oraz biochemiczne w komórkach) na komórki leukocytów. Doktorantka przechodzi od charakterystyki złożonych mechanizmów aktywacji limfocytów do terapii bazującej na aktywacji limfocytów T tj. do immunoterapii CAR-T (CAR - chimeryczny receptor antygenowy, ang. *chimeric antigen receptor*).

W Rozdziale 3 Doktorantka przedstawia podstawy metod spektroskopowych stosowanych w pracy oraz przykłady ich zastosowań do badań nad leukocytami. Tematami kolejnych podrozdziałów są spektroskopia UV-VIS, spektroskopia ramanowska, spektroskopia rezonansowego rozpraszania ramanowskiego, techniki optyki nieliniowej tj. koherentna antystokesowska spektroskopia ramanowska (CARS, ang. *Coherent anti-*



Stokes Raman Scattering), wymuszone rozpraszanie ramanowskie (SRS, ang. *Stimulated Raman Scattering*) oraz obrazowanie ramanowskie i fluorescencyjne.

Część teoretyczną pracy kończą krótkie opisy metod chemometrycznych stosowanych do analizy złożonych obrazów spektralnych układów biologicznych analizowanych w pracy tj.: analiza skupień (CA, ang. *cluster analysis*), nadzorowane i nienadzorowane metody uczenia maszynowego (PLA (analizatorów głównych, ang. *principal component analysis*, liniową analizę dyskryminacyjną (LDA, ang. *linear discriminant analysis*), niezależnego modelowania i analogii klas (SIMCA, ang. *Soft independent modelling by class analogy*) oraz najmniejszych kwadratów (PLS, ang. *Partial Least Square*).

Po jasno zdefiniowanym celu podjętych badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej (część II) rozpoczyna się „Część Eksperymentalna” dysertacji. W podrozdziałach tej części pracy, Autorka płynnie przeprowadza czytelnika w praktyczne aspekty przygotowania badanych układów biologicznych do analiz spektralnych. Na uwagę zasługuje dokładny opis sposobu izolacji komórek leukocytów z krwi obwodowej, aktywacji wyizolowanych komórek limfocytów T, również w układzie modelowym wykorzystującym komórki linii Jurkat. Dość szczegółowo Doktorantka opisała dobór parametrów pomiarowych w wykorzystanych metodach spektroskopowych. Część eksperymentalną kończy „techniczny” opis stosowanych metod chemometrycznych do analizy uzyskanych danych spektralnych.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały przedstawione i przedyskutowane w bardzo dogłębny i metodyczny sposób w kolejnym rozdziale, który stanowi kluczową część pracy. Spektroskopowe badania aktywacji agranulocytów są tematem pierwszego podrozdziału IV części rozprawy doktorskiej: „Wyniki i dyskusja”. Na uwagę zasługuje tu gruntowna analiza, jeszcze przed przystąpieniem do szczegółowych badań leukocytów, wpływu przygotowania/preparatyki materiału biologicznego na uzyskiwane obrazy spektralne. Sposób przygotowania układów biologicznych do analiz ramanowskich tak jak i standaryzacja samego pomiaru pod kątem



długości użytej linii wzbudzającej, jej mocy czy czasu akwizycji próbki są niezwykle istotne zarówno do uzyskania rzetelnych informacji, zapewnienia powtarzalności badań a co za tym idzie możliwości ich dalszych praktycznych aplikacji poza laboratorium. Opracowany protokół przygotowania próbek, pomiaru oraz analizy danych spektralnych Doktorantka stosowała do wszystkich eksperymentów skupiających się na obrazowaniu ramanowskim agranulocytów.

Analiza obrazów ramanowskich zarówno w stanie spoczynkowym oraz aktywowanym komórek wnosi cenne informacje o zmianach składu biochemicznego w odpowiedzi komórki na utrwalenie glutaraldehydem i proces aktywacji. Rozważania empiryczne Doktorantka poparła analizami chemometrycznymi. Przykładowo, analiza PLS-DA pozwoliła na opracowanie modelu, który w oparciu o średnie widmo ramanowskie komórki jest w stanie wskazać, czy uległa ona aktywacji czy też jest w stanie spoczynkowym a czułość i specyficzność otrzymanego modelu wynosiły odpowiednio 100% i 90%. Próba identyfikacji zmian molekularnych w strukturze jąder wywołanych procesem aktywacji i uzyskane wyniki a szczególnie obecność karotenoidów, jako markerów różnicujących nie podążają i/lub rzucają nowe podejście na wyniki publikowane na ten temat w literaturze. Zastosowanie wymuszonej spektroskopii ramanowskiej pozwoliło na opracowanie szybkiej i bezznacznikowej spektro-cytometrii obrazowania komórek, a rozdzielność przestrzenna tej metody pozwoliła określić dystrybucję przestrzenną karotenoidów i lipidów. Uważam te badania za mające istotny wkład w zrozumienie i poznanie procesów aktywacji limfocytów, co przekłada się na rozwój i lepsze zrozumienie intensywnie obecnie rozwijanych się nowatorskich metod immunoterapii nowotworów takich jak immunoterapia komórkami limfocytów T z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. *chimeric antigen receptor*, CAR) - terapia CAR-T. Doktorantka, doskonale zdaje sobie sprawę, że bezznacznikowe obrazowanie ramanowskie jest alternatywną metodą identyfikacji stanu aktywacji komórek przeznaczonych do terapii CAR. W ostatnim podrozdziale przedstawiono wstępne wyniki badań modelowych dotyczących aktywacji komórek CAR-Jurkat (CAR-J) poprzez



kontakt z komórkami nowotworowymi oraz wyniki wpływu polaryzacji fenotypu komórek makrofagów na ich parametry morfologiczne oraz biochemiczno-metaboliczne odpowiedzi. Nie są to proste zarówno empiryczne jak i chemometryczne analizy i wymagają dalszej, dogłębnej charakterystyki na większej grupie próbek.

W dalszej części pracy Pani mgr Aleksandry Borek-Doros z powodzeniem wykorzystwała szereg różnych metod spektroskopowych takich jak spektroskopia absorpcyjna w UV-Vis, mikroskopia fluorescencyjna, techniki ramanowskie do charakterystyki dwóch podtypów granulocytów: eozynfilii (Eos) i neutrofilii (Ne) opierając się głównie na analizie obecnych w nich białek z grupy hemoprotein: EPO oraz MPO. Przeprowadzono pomiary spektroskopowe substancji wzorcowych EPO i MPO oraz ludzkich komórek Eos oraz Neu izolowanych z krwi dawców.

Badania wykonana z zastosowaniem trzech linii wzbudzających: 532, 633 i 785 nm. Wykazanie różnic spektralnych w widmach ramanowskich układów wzorcowych (dla wzbudzania laserami 633 i 785 nm) było istotną przesłanką do dalszych badań nad możliwościami identyfikacji ludzkich komórek granulocytów. Rezonansowe wzmocnienie sygnału hemoprotein uzyskano dla lasera o długości fali z zakresu przejść elektronowym CT (633 nm) a uzyskane obrazy spektralne pozwoliły na identyfikację i rozróżnienie eozynofili od neutrofilii (głównie na podstawie różnic we względnych intensywnościach wybranych pasm). Pogłębioną ocenę morfologii komórek Eos i Neu (takich jak powierzchnia, symetria, promień) oraz dystrybucji lipidów Doktorantka przeprowadziła z wykorzystaniem obrazowania fluorescencyjnego. Dodatkowo pomiary CARS pozwoliły na bezznacznikową analizę rozkładu lipidowych kropli w granulocytach i potwierdziły wnioski z eksperymentów fluorescencyjnych.

W ostatnim podrozdziale Doktorantka przedstawiła wyniki i ich dyskusję dotyczącą porównania biochemicznych sygnatur pierwotnych komórek granulocytów izolowanych z krwi z modelowymi, komercyjnymi liniami komórkowymi w stanie zapalnym. Przykładowo komórki EoL-1 poddawano działaniu czynników prozapalnych takich jak kwas masłowy czy interleukiny a mikroskopia fluorescencyjna oraz



obrazowanie CARS zastosowano głównie do oceny zmian zawartości kropli lipidowych oraz analizy biochemicznego składu jądra komórkowego i cytoplazmy w stanach zapalnych. Podsumowując, cała dyskusja otrzymanych wyników zarówno empiryczna jak i analizy statystyczne są napisane w sposób dojrzały, są rzetelne, przekonujące i wyczerpujące a wyciągnięte wnioski prawidłowe. Doktorantka często odnosi się danych literaturowych. Na pochwałę zasługuje też ostatni rozdział pracy, w którym Doktorantka bardzo przejrzysto i wyczerpująco podsumowuje i streszcza swoje wyniki.

Osiągnięcia pracy i realizacja zaplanowanych celów badawczych.

Wszystkie eksperymenty spektroskopowe mające na celu charakterystykę zmian morfologicznych, jak i ocenę stanu biochemicznego komórek leukocytów są niezwykle trudne i wymagają wielkiej staranności ze strony eksperymentatora. Na podstawie przedstawionych badań stwierdzam, że Pani mgr Aleksandra Borek-Dorosz osiągnęła zasadniczy cel swoich badań i wykazała potencjał technik oscylacyjnych a głównie techniki ramanowskiej połączonej z analizami chemometrycznymi, jako bezznaczeniowej, stosunkowo szybkiej i niedestrukcyjnej metody badania mechanizmów molekularnych w komórkach leukocytów. Otrzymane wyniki wskazują na potencjał diagnostyczny w różnicowaniu komórek limfocytów jak i identyfikacji stanu zapalnego w komórce, co w przyszłości z dużym powodzeniem może być wykorzystywany w analizie, diagnozowaniu i monitorowaniu szeregu chorób.

Uwagi/komentarze.

Wyjaśnienia i dyskusji wymagają następujące kwestie:

1) Pomiary żywych komórek są eksperymentalnie wymagające pod kątem przestrzegania czasu analizy (30-40 min, po który zwykle zachodzi apoptoza komórek) i sterylności samych warunków pomiarowych. Jednakże badania żywych układów biologicznych dają



obraz najbardziej wiarygodnych odpowiedzi spektralnych. Rozumiem konieczność stosowania utrwalania komórek w podjętych badaniach, mam jednak prośbę o przedstawienie przykładowego widma ramanowskiego żywej oraz utrwalonej, według opracowanego protokołu, komórki leukocyta, dyskusję i wyjaśnienie, także na podstawie danych literaturowych, jak wygląda i czy różni się ich biochemiczny obraz zakodowany w widmach. Czy są jakieś procesy biologiczne w komórkach, szczególnie w aspekcie badanego w pracy stanu zapalnego zmieniającego biochemię oraz funkcje komórki, których nie można właściwie przeanalizować za pomocą mikroskopii utrwalonych próbek.

2) Analiza biochemiczna limfocytów B i T z wykorzystaniem wzbudzenia o długości fali 632nm typuje karotenoidy, jako markery różnicujące te komórki. Jednakże duże fluktuacje w ilości karotenoidów w komórkach T i osoczu (stosunkowo duże odchylenia standardowe dla ich pasm ramanowskich) dodatkowo zależne od cech osobniczych mogą osłabiać ich wartość jako markera różnicującego czy też definiującego stan zmian w organizmie. Poproszę o dyskusję tej kwestii.

3) Wieloparametryczna cytometria przepływowa jest obecnie metodą wykorzystywaną do różnicowania/ identyfikację populacji i subpopulacji limfocytów i ma w medycynie coraz szersze zastosowanie. Proszę o porównanie możliwości tej techniki i rozwijanej przez Panią metody identyfikacji/analizy limfocytów pod kątem jej możliwej w przyszłości użyteczności diagnostycznej.

Drobne uwagi:

1) Praca doktorska zredagowana została bardzo starannie. Zamieszczone rysunki i tabele są czytelne i opatrzone poprawnymi opisami. Zdarzają się drobne błędy interpunkcyjne, stylistyczne, literówki np. na rysunku 40 „niaktywowane” zamiast „nieaktywowane”; .powtórzenia w opisie rysunku 50 „Obrazy, obrazy po paśmie” itp. Rysunek 56 jest powielony ośmiokrotnie, od stron 173 do 180, zapewne, aby ułatwić jego

analizę czytelnikowi, jednak dla mnie jest to zabieg mający odwrotny skutek. Brak ciągłości tekstu utrudnia czytanie, ponieważ powielany rysunek zajmuje kolejno całe strony.

2) Doktorantka nadużywa w opisie eksperymentów form bezosobowych (wykonano, przeprowadzono analizę, zaobserwowano itp.), podczas gdy w pracy doktorskiej bardziej zasadne byłoby użycie osoby 1- ej liczby pojedynczej (wykonałam, zaobserwowałam itp.), aby wyodrębnić badana własne i podkreślić samodzielność prezentowanych badań. Praca wykonywana była w interdyscyplinarnych projektach i grupach, co jest niewątpliwym atutem, jednak w rozprawach doktorskich należy podkreślać jak najczęściej również swoją samodzielność.

Wymienione uwagi krytyczne nie umniejszają bardzo wysokiej oceny, jaką stawiam przedstawionej mi rozprawie doktorskiej Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz.

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wszystkie formalne wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r (przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r, poz. 1669). Zatem, wnoszę wniosek o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr. Aleksandry Borek-Dorosz. Tematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej wpisuje się w nurt nowatorskich badań prowadzonych w grupie badawczej, Zespół Obrazowania Ramanowskiego, prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej dotyczących zastosowania metod spektroskopowych do poszukiwania i analizy spektralnych markerów zmian chorobowych.

Uważam przedstawioną rozprawę doktorską za bardzo dobrą. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki w połączeniu z wynikami badań prowadzonymi we współpracy z wieloma światowej klasy ośrodkami badawczymi zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopiśmie specjalistycznych z listy Filadelfijskiej. Liczne wystąpienia konferencyjne Doktorantki świadczą o jej zaangażowaniu, pracowitości ciekawości naukowej.

Doktorantka wykazała, że metody spektroskopowe połączone z analizami chemometrycznymi są doskonałym narzędziem do fenotypowania i analizy komórek leukocytów i pozwalają na głębsze wniknięcie w zrozumienie mechanizmów zmian biochemicznych indukowanych chorobami. Zrozumienie reakcji komórki na zaburzenia układu immunologicznego związane z chorobą jest podstawowym elementem przyczyniającym się do rozwoju/modyfikacji metod leczenia. Biorąc pod uwagę obszerność wykonanych badań, ich złożoność, wysoce staranną analizę danych spektroskopowych i chemometrycznych analiz a także potencjał aplikacyjny, w który wpisują się najnowsze metody walki z nowotworami czy chorobami cywilizacyjnymi, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Borek-Dorosz.

Dr hab. Agnieszka Michota-Kamińska, prof. IChF PAN



Warszawa, 8 czerwca 2022 r.