



Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. „Opracowanie spektralnej histopatologii FTIR do detekcji i charakterystyki przerzutowości nowotworowej” autorstwa Pani mgr Karoliny Chrabąszcz.

Recenzowana rozprawa doktorska pt. „Opracowanie spektralnej histopatologii FTIR do detekcji i charakterystyki przerzutowości nowotworowej” wykonana została przez Panią mgr Karolinę Chrabąszcz w Zespole Obrazowania Ramanowskiego Zakładu Fizyki Chemicznej a Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem dr. hab. Kamilli Małek prof. UJ jako promotora oraz dr. hab. Katarzyny Marzec jako promotora pomocniczego.

Choroby nowotworowe, mimo tak ogromnego postępu w nauce jaki nastąpił w pierwszych dekadach XXI wieku, wciąż nie są dostatecznie dobrze poznane i wymagają wielu różnorodnych badań, aby móc poznać ich etiologię. Istotnym też jest wczesna ich diagnostyka, albowiem już wiemy, że prawidłowe rozpoznanie na wczesnym etapie ich rozwoju w znacznym stopniu może doprowadzić do spowolnienia rozwoju choroby a nawet do całkowitego wyleczenia chorego. Obecnie prowadzone badania na polu poprawy diagnostyki medycznej sięgają do badań interdyscyplinarnych, coraz to nowszych metod analitycznych. Do tychże, niewątpliwie zaliczają się różnorodne techniki mikroskopowe, techniki chemii analitycznej, spektroskopie, a nawet metody fizyki jądrowej.

Od lat, stosowane techniki mikroskopowe służą do obrazowania preparatów histologicznych dzięki czemu histopatolog ocenia rodzaj tkanki, rozpoznaje nieprawidłowości jej morfologii, jeśli takowe występują. Wielokrotnie diagnoza postawiona przez histopatologa jest ostatnim elementem procesu diagnostyki. To na jej podstawie dobierane są metody leczenia pacjenta. Niestety, ocena histopatologiczna nie jest możliwa na bardzo wczesnym etapie procesu chorobowego z uwagi na rozmiar nieprawidłowych komórek, które co



prawda mogą być rozpoznane przez histopatologa pod warunkiem, że znajdą się w analizowanym preparacie. Oczywiście wykonując biopsję pobiera się mały kawałek tkanki i można dokonać jego analizy w całości. Jednakże biopsja wykonywana jest zazwyczaj już po badaniu palpacyjnym bądź badaniu USG czy wykonując prześwietlenie ciała pacjenta wykorzystując promieniowania rentgenowskie. Idealnym byłoby znalezienie takiej metody diagnostycznej, i to w dodatku najlepiej nie inwazyjnej, dzięki której można by postawić diagnozę zanim pojawią się istotne zmiany morfologiczne, które będą rozpoznawalne wymienionymi wcześniej metodami.

Mając do dyspozycji szeroki wachlarz wspomnianych na wstępie metod naukowcy starają się zastosować je w diagnostyce. Tu warto np. wymienić techniki obrazowania, potocznie nazywane dziś rezonansem. Mało kto wie, że ta technika pochodzi od „fizyków jądrowych”. Ten rezonans to tak naprawdę magnetyczny rezonans jądrowy. Użycie pełnej poprawnej nazwy metody obrazowania zapewne odstraszałoby pacjentów. Tajemniczo brzmiąca też „spektroskopia” również bazuje na zjawiskach odkrytych przez fizyków bądź chemików, wciąż jest na etapie wdrażania i testowania jej przydatności do diagnostyki. Jedną z tych spektroskopii jest spektroskopia oscylacyjna, która coraz częściej wykorzystywana jest do analizy składu chemicznego a nawet i struktury budowy cząsteczek z których składa się nasz organizm.

Pani mgr Karolina Chrabąszcz postanowiła podjąć próbę opracowania metody wczesnego diagnozowania przerzutów nowotworowych i wykorzystać do tego celu różne metody obrazowania, w szczególności Spektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Pokazanie potencjału tej metody analitycznej w diagnostyce stanowi niewątpliwie poważne wyzwanie dla świata nauki.

Recenzowana rozprawa w formie monografii została oparta o cztery publikacje, w których autorka jest pierwszym autorem. Publikacje ukazały się w recenzowanych czasopismach z listy JCR i cechują się wysokim czynnikiem oddziaływania (*Impact factor*), którego sumaryczna wartość wynosi 16,146. Rozprawa została opisana na 151 stronach maszynopisu i została podzielona na część literaturową oraz eksperymentalną. Część literaturowa składa się z 5 rozdziałów: tj. *Biologia nowotworów*, *Diagnostyka onkologiczna*, *Spektralna histopatologia FTIR* oraz *Spektroskopia oscylacyjna w badaniach*



biomedycznych i Cel pracy. Natomiast część eksperymentalna składa się z 3 rozdziałów tj. *Materiał badawczy i stosowane metody doświadczalne*, *Wyniki i dyskusja* oraz *Podsumowanie*. Rozprawa rozpoczyna się streszczeniem, abstraktem w języku angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Natomiast *Bibliografia* oraz *Wykaz publikacji i osiągnięć autora* kończą rozprawę.

Pierwszy rozdział rozprawy – *Biologia nowotworów* – opisuje problem z jakim boryka się nasza populacja, którym jest zagadnienie chorób nowotworowych. Autorka skupiła się na nowotworach sutka jako, że te są najczęściej występującą chorobą nowotworową wśród kobiet, prowadzącą do przedwczesnych zgonów. W rozdziale tym, autorka rozprawy opisała też proces nowo tworzenia i przerzutowania, biologię molekularną nowotworów, omówiła etapy rozwoju tej choroby poczynając od powstawania nowotworu a kończąc na wyjaśnieniu budowy macierzy zewnątrzkomórkowej i jej przemianom podczas migracji komórek nowotworowych.

Drugi rozdział – *Diagnostyka onkologiczna* – opisuje współczesne techniki obrazowania wykorzystywane w diagnostyce onkologicznej i podaje szczegóły przygotowania preparatów do oceny histopatologicznej.

Trzeci rozdział – *Spektralna histopatologia FTIR* - zawiera podstawy fizyczne spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (FTIR). Zawiera on również bardzo cenny dla czytelnika zestaw przypisań pasm w widmach materiału biologicznego oraz porównuje rodzaj obrazowania FTIR detektorem FPA oraz systemy mikroskopii w podczerwieni z uwagi na typ spektroskopii IR. Podaje zalety kwantowego lasera kaskadowego, opisuje metody analizy

Rozdział czwarty – *Spektroskopia oscylacyjna w badaniach biomedycznych* – przekonuje czytelnika, że spektroskopia oscylacyjna jest odpowiednim narzędziem do analizy materiału biologicznego.

Rozdział piąty – *Cel pracy* – definiuje cel pracy zwracając uwagę na poszczególne etapy badań. Niestety, w rozprawie nie określono jednoznacznej tezy. Mam jednak nadzieję, że **podczas obrony doktorantka przedstawi tezę, skoro ma jej bronić.**

Rozdział szósty – *Materiał badawczy i stosowane metody doświadczalne* – zawiera się w drugiej części rozprawy, która dotyczy eksperymentów



i przeprowadzonych badań. Rozdział ten został poświęcony preparatyce materiału badawczego, w którym doktorantka przedstawiła dość szczegółowo wszystkie procedury związane z hodowlą komercyjnie dostępnych komórek gruczolakoraka 4T1 (ATCC, USA), przygotowaniu modelu zwierzęcego w którym posłużono się samicami myszy Balb/c. Następnie opisane zostały poszczególne kroki analiz histopatologicznych, które w bardzo przystępny sposób wyjaśniają czytelnikowi istotę tego typu badań. Rozdział ten poświęcony jest też technikom obrazowania w podczerwieni i procedurom przygotowania danych hiperspektralnych do analiz chemometrycznych.

Rozdział siódmy – *Wyniki i dyskusja* – jest najobszerniejszym rozdziałem rozprawy. Autorka rozpoczyna swoją opowieść od ukazania wpływu warunków pomiarowych na informacje jakie niosą w sobie widma FTIR. Tutaj uwagę czytelnika skierowano na różne sposoby przygotowania do badania tkanek. Pani mgr Chrabąszcz przedstawia zalety i wady zastosowania metod wykorzystujących zarówno parafinę jak i medium do zatapiania pozyskanych od myszy tkanek w celu pocięcia ich na skrawki a następnie poddanie ich analizie. Doktorantka zwraca uwagę na barwienia H&E preparatów w zestawieniu do rozkładu przestrzennego białek i lipidów w tych tkankach. Oczywiście analizy FTIR wykonane były przed wybarwieniami H&E. Czytelnik dowiaduje się czym różni się spektralna zdolność rozdzielcza od przestrzennej zdolności rozdzielczej. W bardzo przejrzysty sposób zostały dokonane charakterystyki zarówno komórek nowotworowych 4T1 jak i tkanek pierwotnego guza sutka oraz wtórny w płucach. Otrzymane profile spektralne w połączeniu z analizą chemometryczną doskonale odzwierciedlą obraz histologiczny tkanki czy komórki. **Specjalistyczna analiza widm, które w wielu przypadkach są bardzo podobne do siebie i różnią się tylko subtelnościami i których nie sposób zauważyć wprost porównując widma została wykonana w prawdziwie kunsztowny sposób.** Obliczenia drugiej pochodnej, przeprowadzenie analizy skupień pozwoliły na rozróżnienie występujących struktur, określenie charakterystycznych cech spektralnych dla tkanki zmienionej nowotworowo w zestawieniu do tkanki będącej kontrolą. Zastosowanie spolaryzowanego promieniowania IR pozwoliło na ocenę konformacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Dzięki zastosowanym metodom pomiarowym i analitycznym doktorantce udało się prześledzić proces



przemodelowania macierzy zewnątrzkomórkowej wraz z upływem czasu rozwoju guza. Ten fragment rozprawy uważam za bardzo ciekawy i nowatorski.

W celu potwierdzenia swoich obserwacji z analiz wykorzystujących metodę FTIR, pani mgr Karolina Chrabąszcz w ramach współpracy dokonała analiz pomiarów wykonanych Niemczech przy pomocy metody obrazowania antystokesowską mikroskopią ramanowską (CARS), metodą generacji drugiej harmonicznej (SHG), metodą fluorescencji wzbudzaną dwufotonowo (TSEF) oraz metodą obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM). Każda z tych metod analitycznych dostarczyła dodatkowych informacji o badanej tkance i pozwalała na zróżnicowanie rozkładu przestrzennego obecności lipidów, węglowodanów, glikogenów czy białek i ich konformacji, charakterystycznych dla danego stadium rozwoju choroby. **Zastosowanie tych technik całkowicie uzupełnia prowadzone pomiary metodą spektroskopii absorpcyjnej z transformatą Fouriera.** Szkoda, że w rozprawie nie zamieszczono opisu podstaw fizycznych stosowanych metod (CARS, TPEF, SHG i FLIM) ale zainteresowanych odesłano do odpowiednich referencji.

Należy podkreślić, że podjęcie się przez panią mgr Karolinę Chrabąszcz trudnego zadania jakim było określenie przydatności spektroskopii oscylacyjnej do identyfikacji wczesnych zmian zachodzących w tkankach, jeszcze przed osadzeniem się przerzutowych komórek nowotworowych i pokazanie potencjału analitycznego zastosowanych metod do zwalczania tych chorób, daje pewną nadzieję, że obrany kierunek badań może doprowadzić do polepszenia diagnostyki a może i nawet poznania etiologii chorób nowotworowych.

Oprócz wspomnianych wcześniej uwag, nasunęły mi się pewne wątpliwości, do których należą:

1. Czy można mówić o nieprogramowanej apoptozie skoro autorka podkreśla, że komórki ulegają „zaprogramowanej apoptozie”? (str. 12)
2. Wielokrotnie używane jest określenie zarówno „macierz pozakomórkowa” jak i „macierz zewnątrzkomórkowa”. Czy mowa jest o czymś innym, czy są to synonimy?



3. Nie bardzo zrozumiałym jest opis roli naczyń limfatycznych. Autorka pisze: „*Naczynia limfatyczne drenujące guza zwiększają swój przepływ i ruchliwość*”. Czy znaczy to, że te naczynia gdzieś wędrują, przepływają? (str. 26)
4. Jako fizyk nie mogę przejść obojętnie nad bardzo pobieżnym sformułowaniu opisującego zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego. Autorka pisze: „*Pobudzanie protonów niektórych atomów w tkankach następuje poprzez sygnał o charakterze fal radiowych z odpowiednią częstotliwością*” – str. 31. Cały ten akapit jest bardzo lakonicznym opisem metody NMR. Nie sądzę aby czytelnik, który nie zna metody mógł zrozumieć na czym ona polega. O jakich to protonach jest tu mowa?
5. Zapis, że „*Fotony są rejestrowane równocześnie przez dwa z wielu detektorów ułożonych w postaci pierścienia, co pozwala na dokładne określenie miejsca powstania pozytonów*” jest również, jak w przypadku NMR, bardzo pobieżny (str. 31/32). Znowu, może to świadczyć o niedogłębnej znajomości przez doktorantkę metody PET. Istotnym jest fakt, że powstałe fotony na skutek anihilacji pozytonu rozchodzą się dokładnie w dwóch przeciwnych kierunkach i to pozwala określić miejsca ich powstania. Natomiast powyższe zdanie doktorantki można odczytać, że fotony są rejestrowane przez dwa dowolne detektory.
6. Szkoda, że autorka nie podała jakiego medium (OCT) użyła do przygotowania skrawków mrożeniowych. (str. 35) Ich skład może również mieć istotny wpływ na otrzymane widma IR.
7. Czy określenie – „*poprzez szereg alkoholi*” w procedurze odparafinowania preparatów sugeruje różne alkohole (np. metylowy, etylowy itd.) czy alkohol etylowy o różnych stężeniach? (str. 35)
8. Proszę o wyjaśnienie co należy rozumieć przez „*antygen*”. Podana definicja niestety nie jest zrozumiała. (str. 36). Co z czym się wiąże?
9. Podany wzór 3.1.1 i następne (str. 38), nieszczęśliwie zawiera dwa bardzo podobne oznaczenia: częstotliwości i liczby kwantowej co dla czytelnika może być bardzo mylące.



10. Technika transmisyjna spektroskopii FTIR w przeciwieństwie do tego co twierdzi autorka rozprawy, NIE wykorzystuje mikroskopu, lecz mikroskop jest wykorzystany w tej technice str. 39.
11. Rysunek 12 str. 40 przedstawia najprawdopodobniej *kondensor* a nie jak jest opisane *kondensator*. Ale może się myłę. Proszę o wyjaśnienie.
12. We wzorze 3.3.2 nie opisano co oznacza „*n*” podczas gdy inne oznaczenia są opisane.
13. Proszę o wyjaśnienie zdania „*Światło, czyli promieniowanie elektromagnetyczne, posiada składową pola elektrycznego oraz magnetycznego oscylujące w fazie do siebie prostopadłej oraz kierunku jego rozprzestrzeniania*” str. 44. Również na tej samej stronie wydaje mi się, że wyjaśnienie działania polaryzatora nie jest całkowicie zrozumiałe. Co należy rozumieć, że „*fala świetlna jest ustawiona równoległe do drutów*”?
14. Zamiast określać błędy, których należy unikać, powinniśmy raczej mówić o niepewnościach pomiarowych. Rys. 14. Str. 47
15. Domniemam, że „*guzy pierwotne były wyczuwalne palpacyjnie a nie palpacyjnie*” str. 56.
16. Podając procedurę preparatyki skrawków tkanek, autorka stwierdza, że „*Każdorazowo po przeprowadzeniu obrazowania FTIR, szkiełka CaF₂ barwiono hematoksyliną i eozyną...*” Podejrzewam, że wybarwiane były skrawki tkanek a nie szkiełka?
17. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób dostosowywano moc lasera do mierzonej próbki str. 64.
18. Autorka podaje, że „*Podczas obliczania drugiej pochodnej widma FTIR*” stosowano 17 punktowe „*gładzenie*” widm. Czy autorka rozprawy nie obawia się, że w ten sposób możemy pozbawić się informacji jakie zawarte są w widmach, nie wykrywając subtelności w ich różnicach?
19. Stwierdzenie ze strony 79 jest niepoprawne. Albowiem długość fali i liczba falowa to nie jest to samo!
20. Rozprawa posiada podsumowanie, natomiast szkoda, że nie pojawiły się żadne wnioski.



Niestety, muszę też zwrócić również uwagę na liczne błędy edytorskie mogące świadczyć o pośpiechu przygotowania rozprawy. Z uwagi na ich mnogość nie będą tu wymienione, **jednakże planując publikację tej rozprawy należałoby je usunąć. Natomiast, zalecałbym też wykonanie erraty i dołączenie jej do rozprawy znajdującej się w zasobach bibliotecznych.**

Podsumowując, stwierdzam, że założone przez doktorantkę cele zostały osiągnięte i można mówić, iż ta praca stanowi istotny przyczynek do rozwoju nauk interdyscyplinarnych w Dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych jak również nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Cennym jest również pozyskanie zgody Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań ze zwierzętami, co niestety, nie zawsze ma miejsce.

Biorąc pod uwagę ogrom pracy, jaki został włożony przez **Panią mgr Karolinę Chrabąszcz** w zaplanowanie i wykonanie tak wielu eksperymentów, opracowanie rozprawy jak też przeprowadzenie nietuzinkowych analiz danych eksperymentalnych wraz z ich interpretacją stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mimo krytycznych uwag i wątpliwości, **spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim** jakie są określone w *art. 13ust. 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 2017 r. poz. 1789)* oraz *art. 179 ustawy z dnia 13 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz 1669)* **i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Karoliny Chrabąszcz do dalszych etapów przewody doktorskiego.**

Jednocześnie chciałbym dodać iż z uwagi na tematykę rozprawy, ogrom prac jaki został wykonany przez doktorantkę jak również analizę danych wykonanych w prawdziwie kunsztowny sposób oraz wykorzystanie wyników uzyskanych w ramach współpracy międzynarodowej, wnioskuję, do **Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o rozważenie wyróżnienia tej rozprawy**, wierząc, że w zasobach bibliotecznych ukaże się errata do tej rozprawy.

Prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek