



Lublin, 25.01.2021r

**RECENZJA**

rozprawy doktorskiej **mgr Karoliny Chrabąszcz** zatytułowanej „*Opracowanie spektralnej histopatologii FTIR do detekcji i charakterystyki przerzutowości nowotworowej*” wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Kamilli Małek, prof. UJ w Zespole Obrazowania Ramanowskiego w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz promotora pomocniczego dr hab. Katarzyny M. Marzec z Jagiellońskiego Centrum Rozwoju Leków (JCET), Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Tematyka podjęta przez doktorantkę dotyczyła badań najczęściej występującej choroby nowotworowej wśród kobiet jaką jest nowotwór sutka (potocznie nazywany nowotworem piersi). Proces nowotworzenia oraz późniejsze przerzutowanie do odległych organów jest złożonym i wieloetapowym procesem. Poszczególne etapy powstawania guza jak i metastazy implikują szereg zmian biochemicznych związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem systemów regulatorowych. Wczesna diagnostyka, zaproponowanie leczenia umożliwiłoby zmniejszenie śmiertelności związanej z przerzutującym nowotworem sutka. Dlatego temat podjęty przez Doktorantkę jest tematem aktualnym, wpisuje się w bardzo popularny nurt badań prowadzonych obecnie na świecie, ale jest też tematem niezwykle potrzebnym, biorąc pod uwagę ciągły wzrost zachorowalności wśród kobiet.

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań w kierunku opracowania metodologii analitycznej na bazie obrazowania w podczerwieni do detekcji przerzutów nowotworowych od fazy tworzenia niszy premetastatycznej do momentu rozwinięcia litego guza. Badania wykonano na modelu subkomórkowym oraz tkankowym. Hipoteza badawcza zakładała, że dzięki możliwości obserwacji zmian molekularnych zachodzących na poziomie subkomórkowym FTIR jest obiecującym narzędziem do zgłębienia zagadnień związanych z rozwojem niszy premetastatycznej oraz lepszego poznania mechanizmu procesu przerzutowania. W tym celu wykorzystano komórki nowotworowe 4T1 raka sutka oraz model mysz (płuca).

W badaniach wykorzystano techniki obrazowania spektroskopowego, w szczególności spektroskopię FTIR, ATR FTIR, obrazowanie FTIR z użyciem spolaryzowanego promieniowania IR (FTIR PCI, ang. Fourier transform infrared polarization contrast imaging), CARS (CARS, ang. Coherent Antistokes Raman Spectroscopy), technika generacji drugiej harmonicznej (SHG, ang. Second-Harmonic Generation), fluorescencji wzbudzonej dwufotonowo (TPEF, ang. Two-Photon Excited Fluorescence,) oraz mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM, ang. Fluorescence Lifetime Imaging). Jako metodę referencyjną wykorzystano barwienia histologiczne H&E oraz zaawansowane techniki chemometryczne.



Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Tekst obejmuje 151 stron i składa się z następujących części: Streszczenie, Abstrakt, Wykaz skrótów, Część Literaturowa, Cel pracy, Część Eksperymentalna, Wyniki i Dyskusja, Podsumowanie, Bibliografia, Wykaz publikacji i osiągnięć autora. Dysertacja zawiera 52 ryciny i 9 tabel.

**Streszczenie, abstrakt i cel pracy** są moim zdaniem jasno sformułowane.

W **części literaturowej** Autorka przedstawia tematykę biologii nowotworów, diagnostykę onkologiczną spektralną histopatologię FTIR. Szczegółowo opisała zastosowane techniki badawcze, a także przedstawiała aktualny stan wiedzy. W trakcie analizy dostępnej literatury mgr Karolina Chrabąszcz zauważyła potrzebę opracowania metody zapewniającej szybką analizę, nie wymagającą znakowania tkanki żeby ocenić jej morfologię, skład biochemiczny oraz zmiany zachodzące pod wpływem choroby. Całość stanowi dobrze opracowane wprowadzenie do tematu dysertacji to ogółem 42 stron tekstu oraz 15 rycin.

**Część eksperymentalna** liczy 15 stron i zawiera dokładny opis przygotowania materiału do badań zarówno pozyskanego dzięki badaniom *in vivo* a także *in vitro*. Doktorantka szczegółowo opisuje sposób przygotowania materiału badawczego, użyte techniki pomiarowe oraz metody analizy danych.

Część pracy dotycząca **wyników i ich dyskusji** zawarta jest na 68 stronach. Rozdział ten składa się z 7 części po każdej z nich jest krótkie podsumowanie najważniejszych wyników. Badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i systematycznie zrealizowała, a uzyskane wyniki omówione są obszernie w kontekście aktualnego piśmiennictwa z dziedziny.

Pierwsza część wyników dotyczy dyskusji na temat doboru odpowiedniej rozdzielczości spektralnej, jak i przestrzennej oraz w konsekwencji dokonanego wyboru wpływu na uzyskane informacje biochemiczne w badanej próbce.

Następnie doktorantka poddała analizie tkanki w trybie HD oraz UHD IR i wykazała różnice spektralne w odmiennym metabolizmie dwóch przerzutów podopłuczonego oraz okołonaczyniowego. Tym samym wykazała skuteczność techniki IR ponieważ tego typu zmian nie była w stanie rozróżnić za pomocą barwienia H&E. W kolejnym etapie badań analizowała profile spektralne mikroprzerzutów, które w zależności od otoczenia w jakim są ulokowane charakteryzują się różną intensywnością pasm białkowych ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ) i kolagenu ( $1280\text{ cm}^{-1}$ ,  $1235\text{ cm}^{-1}$  i  $1202\text{ cm}^{-1}$ ).

Doktorantka zastosowała nieliniowe techniki oscylacyjne CARS, TPEF, SHG, FLIM oraz HD FTIR do charakterystyki wczesnych przerzutów. Wykazała zróżnicowane zmiany biochemiczne w badanym materiale stosując każdą z w/w metod, a następnie skorelowała uzyskane wyniki. Tym samym wykazała przydatność każdej z metod do badania przerzutów w trzecim tygodniu od iniekcji komórek nowotworowych. Pani mgr Karolina Chrabąszcz podjęła również problem scharakteryzowania zmian w strukturze płuc na skutek progresji procesu przerzutowania dla wczesnej i zaawansowanej metastazy. Do rozwiązania tego problemu zastosowała wielokierunkowe analizy: na poziomie molekularnym - z zastosowaniem analiz ilościowych oraz statystycznych. Zbadała również proces przebudowy macierzy pozakomórkowej, wskazała rodzaj białek jaki ulega transformacji, określiła stopień ich degradacji i akumulacji w badanej tkance. Do oceny konformacji macierzy pozakomórkowej tkanek płucnych zastosowała technikę FTIR z użyciem światła



spolaryzowanego w dwóch płaszczyznach (równoległej i prostopadłej). Dzięki analizie chemometrycznej wykazała zmiany w intensywności pasm w standardowym obrazowaniu natomiast wiązka spolaryzowana światła IR pozwoliła rozróżnić zmiany w kolagenie oraz amidach w strukturach tkanek ulegających przemodelowaniu wynikającej z progresji nowotworowej.

Recenzowana dysertacja została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest bardzo przejrzysto opracowana graficznie. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 190 pozycji, w przeważającej części pochodzi z ostatnich lat jest wykorzystane i zacytowane właściwie. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznanii.

Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka popełniła kilka błędów edytorskich oraz dość liczne tzw. „literówki”, co oczywiście jest nieuniknione i w żaden sposób nie wpływa na wartość pracy, np.: strona 113 w tekście jest „przrzutowania” powinno być „przerzutowania”; strona 138 w tekście jest ‘hisopatologii’ powinno być „histopatologii”. Drobne usterki edytorskie dostrzegam również na stronach 38, 52, 61, 64, 93, 98, 113, 139 ale nijak nie umniejszają one wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy.

Wartość merytoryczną niniejszej rozprawy doktorskiej oceniam wysoko. Pani mgr Karolina Chrabąszcz skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnie realizowała badania naukowe. Wykazała dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów. Właściwie trudno wskazać słabe strony pracy doktorskiej Pani Karoliny Chrabąszcz.

Na koniec podkreślić chciałam podkreślić całokształt pracy Doktorantki. Oprócz dorobku (4 prace o łącznym IF 16,146) przedstawionego do oceny w ramach realizacji pracy doktorskiej Pani mgr Karolina Chrabąszcz jest współautorem również 6 innych prac oraz 1 rozdziału w książce. Podsumowując jej całkowity dorobek naukowy to 10 prac oraz 1 rozdział w książce. Prowadzone badania finansowane były w ramach dwóch projektów naukowych Narodowego Centrum Nauki, projekt OPUS 12 (UMO 2016/23/B/NZ4/01379) oraz wsparcia Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Projekt Iuventus Plus (IP2015 048474).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie **wniosuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Chrabąszcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie ze



względu na zaangażowanie w pracę badawczą Doktorantki, wysoką wartość uzyskanych wyników oraz spełnienie wymagań zgodnych z regułami Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską **do wyróżnienia**.

dr hab. Anna Sroka-Bartnicka