

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Krzysztofa Czamary pt. „Obrazowanie zmian chemicznych towarzyszących modyfikacjom fenotypu komórek w modelach patologii układu krwionośnego z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej”**

Śródbłonek naczyniowy bierze udział w wielu procesach fizjologicznych, między innymi w regulacji przepływu i ciśnienia krwi, syntezie i wydzielaniu substancji biologicznie czynnych, angiogenezie, kontroli przepływu substancji odżywczych czy reakcjach zapalnych i odpornościowych. Dlatego też zaburzenie jego prawidłowego funkcjonowania odgrywa ogromną rolę zarówno w patogenezie, jak i przebiegu wielu jednostek chorobowych, do których należą między innymi miażdżyca, nadciśnienie, cukrzyca czy choroba niedokrwienna serca. Wiele wskazuje na to, że na wczesnym etapie rozwoju dysfunkcja śródbłonka manifestuje się wystąpieniem procesów zapalnych, których celem powinno być usunięcie czynnika chorobotwórczego i powrót tkanki do stanu fizjologicznego. Ten ogromnie ważny i zarazem interesujący problem procesów zapalnych tkanki śródbłonka naczyniowego jest właśnie przedmiotem badań zamieszczonych w rozprawie doktorskiej Pana mgr Krzysztofa Czamary.

Swoją pracę doktorską Pan mgr Krzysztof Czamara realizował pod opieką Pani dr hab. Agnieszki Kaczor, rozpoznawalnego na świecie eksperta w zakresie spektroskopii i obrazowania ramanowskiego. Prace badawcze związane z realizacją rozprawy prowadzone były na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków.

Praca doktorska zredagowana została w języku polskim na 183 stronach maszynopisu (wraz z referencjami). Do rozprawy dołączona została ponadto lista wszystkich prac naukowych doktoranta oraz jego publikacje, związane z przedmiotem doktoratu. Układ pracy nie jest typowy. Praca składa się wprawdzie z pięciu zasadniczych części, ale zamieszczone w nich rozdziały, czy podrozdziały nie mają odrębnej numeracji. Bardzo rozbudowana pierwsza część pracy zatytułowana: „CZĘŚĆ LITERATUROWA” zawiera aż 8 zróżnicowanych tematycznie podrozdziałów. Autor przedstawia w niej podstawy biologiczne prowadzonych badań (podrozdziały 1-4), opisuje stosowane w pracy techniki analityczne (podrozdział 5) i metody analizy danych spektroskopowych (podrozdział 6) oraz wyczerpująco prezentuje aktualny stan wiedzy na temat mikroskopowych badań śródbłonka naczyniowego, w tym z użyciem metod mikrospektroskopii i obrazowania ramanowskiego (7). Ostatni (8) podrozdział tej części rozprawy

zawiera najważniejsze informacje na temat stenozy zastawki aortalnej, która oprócz modeli *in vitro* śródbłonna naczyniowego, stanowi przedmiot badań pracy doktorskiej.

W II części pracy („CELE PRACY”) Autor jasno i precyzyjnie definiuje cele rozprawy, które obejmują zbadanie *in vitro* zmian chemicznych i fenotypowych komórek śródbłonna zachodzących na skutek stanu zapalnego i w okresie wczesnej apoptozy oraz ocenę wpływu proliferacji komórek na uzyskiwane wyniki. Celem pracy jest, ponadto, weryfikacja wyników uzyskanych dla związków modelowych i hodowli komórkowych w oparciu o bardziej kompleksowe systemy, a mianowicie tkanki zastawki aortalnej pobrane od pacjentów ze stwierdzoną stenozą aortalną oraz kontrolnych.

W III części pracy („CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA”, podrozdział 9) Autor charakteryzuje przedmiot badań, przebieg eksperymentów, stosowaną aparaturę i warunki pomiarowe, a także zamieszcza podstawowe informacje dot. analizy danych pomiarowych i zastosowanych do tego celu narzędzi.

Zasadnicza, IV część pracy („WYNIKI I DYSKUSJA”) zawiera wyniki badań wraz z dyskusją ich znaczenia w kontekście aktualnego stanu wiedzy. Pierwszy podrozdział tej części rozprawy (podrozdział 10) zawiera wyniki pomiarów ramanowskich 35 standardów lipidowych, wśród których znalazły się przykłady kwasów tłuszczowych, trójacylogliceroli, lipidów błonowych, a także cholesterol i jego estry. Obecne w widmach pasma ramanowskie Autor przypisuje określonym drganiom w molekułach. Ponadto, identyfikuje i interpretuje, w kontekście struktury badanych związków, nieraz bardzo subtelne różnice pojawiające się w ich widmach oscylacyjnych. Rezultaty zamieszczone w tej części pracy stanowią punkt wyjścia do analizy i interpretacji wyników uzyskanych dalej dla hodowli komórkowych i tkanek zastawki aortalnej. W opinii recenzenta, stanowią one jednak również wspaniałe kompendium wiedzy, którą pewnie nie raz, w przyszłości, Doktorant, jego Zespół, ale i środowisko naukowe wykorzystają przy interpretacji widm ramanowskich różnych materiałów biologicznych.

W kolejnym (11) podrozdziale IV części rozprawy, Autor bada różnice w profilach ramanowskich kontrolnych komórek śródbłonna linii HMEC-1 oraz EA.hy926. W częściach 12 i 13 analizuje, odpowiednio, zmiany biochemiczne zachodzące w komórkach linii HMEC-1 na skutek stanu zapalnego indukowanego TNF- $\alpha$  i LPS *E Coli* oraz nieprawidłowości występujące w komórkach linii EA.hy926 w czasie wczesnej apoptozy indukowanej FasL oraz CHX.

Podrozdział 14 poświęcony jest badaniom zmian w widmach ramanowskich komórek linii EA.hy926 spowodowanych proliferacją. Przy użyciu hierarchicznej analizy skupień, Autor bada także wpływ konfluencji na rozdział widm oscylacyjnych zarejestrowanych dla komórek w różnych fazach cyklu oraz wpływ fazy cyklu komórkowego na rozróżnienie widm ramanowskich komórek w stanie zapalnym oraz kontrolnych.

Z kolei w ostatnim (15) podrozdziale IV części pracy, przeprowadzono analizę biomolekularną tkanek zastawki aortalnej pobranych od pacjentów ze stenozą zastawki aortalnej i kontrolnych.

W V części rozprawy, Doktorant krótko, na czterech stronach, podsumowuje uzyskane wyniki i przedstawia wnioski końcowe płynące z pracy. W pełni zgadzam się z Autorem, że do najważniejszych rezultatów uzyskanych w ramach rozprawy należy zaliczyć:

1. Identyfikację pasm ramanowskich specyficznych dla badanych związków lipidowych;
2. Scharakteryzowanie profili ramanowskich kontrolnych komórek śródbłonka linii EA.hy926 oraz HMEC-1;
3. Obserwację w komórkach linii HMEC-1, w których indukowano stan zapalny przy użyciu TNF- $\alpha$  oraz LPS, zwiększonej częstości występowania kropli lipidowych, a także wykazanie różnic w składzie chemicznym tych kropli w zależności od czynnika indukującego stan zapalny;
4. Obserwację zmian biochemicznych (spadek zawartości białek i wzrost akumulacji DNA/RNA) zachodzących w różnych organellach komórek linii EA.hy926 w czasie wczesnej apoptozy wywołanej przez FasL aktywujący błonowe receptory śmierci oraz CHX hamujący syntezę białek;
5. Identyfikację różnic w profilach ramanowskich komórek w zależności od fazy cyklu komórkowego oraz ocenę wpływu fazy cyklu komórkowego na rozdział widm ramanowskich zmierzonych dla komórek kontrolnych i w stanie zapalnym.
6. Wykazanie użyteczności wyników uzyskanych dla standardów lipidowych oraz hodowli komórkowych w badaniach zmian patologicznych tkanki ludzkiej zastawki aorty.

Jak zatem można zauważyć, wszystkie cele badawcze rozprawy Autor konsekwentnie w jej ramach zrealizował. Praca zredagowana została na podstawie wyników cyklu pomysłowo zaplanowanych i precyzyjnie wykonanych eksperymentów. Rzetelnie wykonana została analiza spektroskopowa i statystyczna wyników badań, a wnikliwa interpretacja uzyskanych rezultatów przeprowadzona została w oparciu o dobrze dobraną aktualną literaturę.

Większość zawartych w pracy rezultatów została już ogłoszona w dobrych i bardzo dobrych recenzowanych czasopismach o wysokim współczynniku przebiccia. O wkładzie Doktoranta w powstanie tych prac świadczy fakt, iż aż w czterech z nich jest on pierwszym autorem.

Rozprawę Pana mgr Krzysztofa Czamary oceniam bardzo wysoko także ze względu na jej interdyscyplinarny charakter. Praca ta wiąże bowiem aspekty analizy chemicznej z badaniami biologicznymi i klinicznymi. Z jej lektury widać, że Doktorant doskonale się odnalazł w badaniach takiego interdyscyplinarnego zespołu i zdaje sobie sprawę, że warunkiem uzyskania przez zespół cennych rezultatów jest rzetelna, uczciwa praca każdego z jego członków. Autor 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.

Nie bez znaczenia jest także fakt, że rozprawa doktorska przygotowana została z ogromną starannością i dbałością o szczegóły, uwagę zwracając przede wszystkim bardzo ładne, czytelne schematy i rysunki.

Przedłożona mi do recenzji praca jest wieloaspektowa. Porusza kilka bardzo aktualnych i ważnych problemów, z których każdy mógłby stanowić przedmiot odrębnego doktoratu. Ten ogrom zgromadzonych w ramach rozprawy wyników rodzi również szereg pytań. Spodziewam się,

że większość z nich doktorant już sobie zadawał w toku realizacji pracy i odpowiedź na nie sprawi mu najmniejszego problemu.

1. Pierwsze pytanie, jakie zrodziło się po przeczytaniu rozprawy, to dlaczego w badaniach wpływu stanu zapalnego i apoptozy na profile ramanowskie komórek stosowane są dwa różne modele *in vitro* śródbłonna naczyniowego. W pierwszym przypadku Doktorant wykorzystuje linię hodowlaną śródbłonna z mikrokrążenia HMEC-1, w drugim linię EA.hy926 wywodząca się ze śródbłonna dużych naczyń krwionośnych.

2. TNF- $\alpha$ , poprzez aktywację receptora czynnika martwicy nowotworów, może indukować zarówno stan zapalny w komórkach, jak i apoptozę, czy zatem możemy wykluczyć, że obserwowane na skutek stymulacji TNF- $\alpha$  zmiany biochemiczne w komórkach nie są wypadkową tych dwóch procesów?

3. Uzyskane dla związków modelowych i modeli *in vitro* wyniki Autor wykorzystuje do badania znacznie bardziej skomplikowanych systemów, jakimi są tkanki zmienione chorobowo i kontrolne ludzkiej zastawki aortalnej. Autor pisze, że w tkankach takich współistnieje wiele typów komórek i zachodzi szeroka gama procesów komórkowych. Zapomina o tym, że każdy chory czy zdrowy człowiek ma inne predyspozycje osobnicze, prowadzi różny tryb życia, stosuje różne leki, nie zawsze ordynowane przez lekarza. Pacjenci, od których pobierane są tkanki są zapewne w różnym wieku, a pobrany od nich materiał biologiczny reprezentuje różne stadium rozwoju choroby. Mówiąc z przekąsem, nie mamy żadnego wpływu na prowadzony „eksperyment”, a nawet nie posiadamy informacji na temat jego przebiegu. Dlatego, w tym kontekście, nie możemy zapominać o ogromnej roli zwierzęcych modeli schorzeń, które wykorzystuje się nie tylko w badaniach podstawowych mających na celu ustalenie mechanizmów leżących u podłoża różnych patologii, ale przede wszystkim w trakcie opracowywania nowych leków, gdzie zastosowanie odpowiednich nieklinicznych modeli zwierzęcych ma zasadnicze znaczenie dla uzyskania danych o wartości prognostycznej dla ludzi. Stąd pytanie recenzenta, o najważniejsze zwierzęce modele patologii śródbłonna naczyniowego.

4. W III części pracy doktorskiej Autor opisuje materiał eksperymentalny oraz metody badawcze wykorzystywane w badaniach. Dużą uwagę poświęca warunkom hodowli i stymulacji komórek śródbłonna, a także procedurom ich utrwalania. Znacznie mniej miejsca, i to w części poświęconej właśnie hodowli i stymulacji komórek, znalazły w pracy informacje dot. zmienionych chorobowo, w przebiegu AS, oraz kontrolnych zastawek aortalnych. Nie wiadomo, czy zastawki kontrolne pobrane zostały od dawców przyżyciowo, czy pośmiertnie, jaki czas mijał i jak były przechowywane tkanki od momentu pobrania do czasu ich preparatyki i pomiaru. Autor nie pisze również, czy tkanki poddawane były jakimkolwiek procedurom i przy użyciu czego cięto je na skrawki. Wszystkie te informacje są bardzo istotne z punktu widzenia interpretacji uzyskanych wyników badań.

5. Nie do końca mogę zgodzić się ze stwierdzeniem Doktoranta, że obraz spektroskopowy kontrolnych komórek śródbłonna jest uniwersalny i niezależny od linii hodowlanej. Autor

identyfikuje przecież różnice w widmach komórek linii HMEC-1 oraz EA.hy926 zarówno w zakresie wysokich, jak i niskich liczb falowych. Różnice te trochę bagatelizuje, tłumacząc iż mogą być niewiarygodne, bo dotyczą rejonów widma leżącym poza zakresem normalizacji ( $1500-400\text{ cm}^{-1}$ ). Ale przecież stosując ten sam zakres normalizacji analizuje np. pasmo  $3030-3000\text{ cm}^{-1}$ , wykorzystując je do obrazowania w komórkach lipidów nienasyconych, i na podstawie uzyskanych dla niego rezultatów wysuwa kluczowe dla pracy wnioski.

Jako recenzent muszę również wytknąć drobne usterki i zwrócić uwagę na niedopowiedzenia, które pojawiły się w pracy. Ich listę przedstawiam poniżej, zwracając równocześnie uwagę, że nie mają one wpływu na jej końcową ocenę.

- W spisie treści nie została zachowana ciągłość numeracji, po części 5.2 pojawia się od razu część 5.4. Brakuje podrozdziału 5.3. Biochemiczne testy komórkowe.
- Str. 11, 2. akapit, 4. zdanie: powinno być „w odróżnieniu od” zamiast w „odróżnieniu do”.
- Str. 11, 2. akapit, 5. zdanie: powinno być „podczas gdy”, a nie „podczas gry”.
- Str. 37, rysunek 9: na schemacie brakuje jednego z etapów mitozy – profazy.
- Spośród wszystkich podrozdziałów części I najslabiej, w opinii recenzenta, przygotowany został podrozdział 5.1 zawierający podstawy najważniejszej techniki eksperymentalnej wykorzystywanej w pracy, czyli spektroskopii ramanowskiej.

Opisując obrazowanie ramanowskie (str. 43-45) Autor nie zawsze stosuje powszechnie przyjęte w środowisku słownictwo, jak np. „skanowanie rastrowe” dla rejestracji widm ramanowskich „punkt po punkcie” z zadanego obszaru wskutek przesuwu próbki w polu wiązki, czy „mapowanie chemiczne” dla sporządzenia dwuwymiarowych map rozkładu intensywności badanego pasma.

Na str. 43 Autor pisze: „Spektroskopia ramanowska... umożliwia w sposób niedestrukcyjny... detekcję badanych związków w próbkach różnych materiałów...”. Czy rzeczywiście zawsze możemy traktować spektroskopię Ramana jako technikę niedestrukcyjną? Jakie, z parametrów pomiaru mają na to wpływ?

Na str. 44 Doktorant pisze, że rozdzielczość boczna jest określona przez kryterium Rayleigha i zależy od optyki układu i długości fali promieniowania wzbudzającego. Tak jest w istocie, ale nie wspomina, że w przypadku skanowania rastrowego bardzo istotnym jest krok, z jakim prowadzimy mapowanie.

- Str. 50, 1. akapit, ostatnie zdanie: powinno być „przeciwiał” zamiast „antygenów”.
- Na rysunku 16 przedstawiono schematycznie proces mapowania chemicznego polegający na określeniu intensywności badanych pasm ramanowskich w zarejestrowanych dla danego obszaru widmach w celu zobrazowania akumulacji związków, dla których są one specyficzne. Przedstawiona na schemacie procedura nie uwzględnia odejmowania linii bazowej. Czy w procesie mapowania chemicznego uwzględniano zmiany położenia linii bazowej, jeśli tak to jak ta procedura przebiegała?

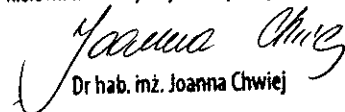
- Tytuł części 7.2 („Mikroskopia i spektroskopia ramanowska w badaniach procesów stanu zapalnego, apoptozy i cyklu komórkowego”) może mylnie sugerować, że zawiera on informacje dotyczące tylko technik spektroskopii i mikroskopii ramanowskiej, a przecież znaczna jego część poświęcona jest pracom wykonanym przy użyciu techniki AFM.
- Do weryfikacji, czy istnieją statystycznie istotne różnice i między jakimi badanymi grupami, Autor wykorzystuje jednoczynnikową analizę wariancji wraz z testem post-hoc Tukeya. Dlaczego wybiera test Tukeya, a nie bardziej konserwatywny test Scheffégo.
- Na str. 76, w pierwszym akapicie, Doktorant pisze, że wyniki „... odnoszą się do prawidłowo zmierzonych komórek śródbłonna i nie uwzględniają znacznej liczby komórek nie nadających się do analizy”. Co Autor rozumie przez „prawidłowo zmierzone komórki” i „komórki nie nadające się do analizy”?
- Na tej samej stronie, opisując narzędzie wykorzystywane do przeprowadzenia analizy skupień, dla metody hierarchicznej Doktorant definiuje jedynie metodę wiązania obserwacji w klastry nie podając, jaką miarę odległości między nimi stosuje.
- Doktorant interpretuje w pracy bardzo subtelne różnice w położeniach pasm, czasem rzędu kilku liczb falowych. Nie doszukałam się jednak w pracy informacji, ile wynosiła rozdzielczość spektralna pomiaru.
- Z czego wynika poszerzenie i przesunięcie w kierunku wyższych liczb falowych pasm ramanowskich dla lipidów w ciekłym stanie skupienia.
- Co Autor rozumie przez przegięcie pasma w widmie ramanowskim. Czego efektem jest jego pojawienie się w widmie?
- Na rys. 30 nie zamieszczono wyników profilowania ramanowskiego uzyskanych dla 24-godzinnej stymulacji TNF- $\alpha$ , z kolei na rysunku 32 wyników analizy skupień dla stymulacji 6-godzinnej.
- Jak, w profilowaniu ramanowskim, przebiega proces normalizacji intensywności sygnałów między warstwami i dlaczego nie zawsze go stosowano?
- Na rysunku 37 mylnie przypisano symbol „\*” wartościom obserwowalnego poziomu istotności  $p < 0,001$ .
- Na str. 115 Autor pisze, że „... inkubacja z cytokiną prozapalną powoduje statystycznie istotny wzrost ogólnej liczby LDs”, a przy użyciu stosowanej metody liczy procentowy udział powierzchni LDs w powierzchni całej komórki.
- W części 14.2 Doktorant bada, przy użyciu hierarchicznej analizy skupień, wpływ konfluencji na rozdział widm ramanowskich zmierzonych dla komórek kontrolnych i stymulowanych TNF- $\alpha$  oraz cytochalazyną B. Zastanawia mnie dlaczego zamiast hierarchicznej metody Warda nie stosuje tu metody K-średnich, skoro dokładnie zna liczbę spodziewanych podgrup w badanym zbiorze widm.

Wszystkie przedstawione powyżej uwagi, wątpliwości i pytania stanowią jedynie punkt zaczepienia do dalszej dyskusji i mają służyć rozwojowi naukowemu Doktoranta. W żaden sposób

nie umniejszają natomiast mojej oceny całości kształtu rozprawy, bowiem przedłożoną mi do recenzji rozprawę doktorską uważam za niezwykle wartościową i oceniam bardzo wysoko. W mojej ocenie rozprawa Pana mgr Krzysztofa Czamary pt. „Obrazowanie zmian chemicznych towarzyszących modyfikacjom fenotypu komórek w modelach patologii układu krwionośnego z wykorzystaniem mikroskopii ramanowskiej” wykonana pod kierunkiem Dr hab. Agnieszki Kaczor spełnia wszystkie zwyczajowe i prawne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z przepisami ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „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) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ogromny nakład pracy włożony przez doktoranta w realizację rozprawy, duża ilość ciekawych i wartościowych wyników, z których większość już wcześniej, na etapie publikacji, pozytywnie przeszła etap recenzji przez światowej sławy ekspertów, pozwala mi wnioskować do Szanownej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Kierownik Katedry Fizyki Medycznej i Biofizyki

  
Dr hab. mż. Joanna Chwiej