



ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 24 sierpnia 2017 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

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

Uzbrojenie klasycznych technik pomiarowych, w tym technik spektroskopii molekularnej, w procesory o znacznej mocy obliczeniowej, stwarza tym metodom nieznane dotychczas możliwości analityczne, otwierając perspektywy nowych zastosowań. W przypadku spektroskopii rozpraszania ramanowskiego, możliwość akwizycji setek widm w stosunkowo krótkim czasie oraz sprzężenie tej techniki z konfokalnym mikroskopem optycznym umożliwia generowanie dwuwymiarowych bądź nawet trójwymiarowych obrazów badanych obiektów w mikroskali, w połączeniu z analizą ich składu chemicznego. Takie właśnie zaawansowane podejście metodologiczne wykorzystane zostało w pracy doktorskiej pana mgr. Krzysztofa Czamary, poświęconej badaniom zmian morfologicznych oraz, przede wszystkim, na poziomie chemicznym, komórek śródbłonna naczyń krwionośnych w warunkach ich ekspozycji na czynniki indukujące zmiany chorobowe. Podejście takie uważam nie tylko jako nowatorskie ale również jako niezwykle cenne w aspekcie poznania markerów molekularnych stanów patologicznych układu krwionośnego.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Kaczor, w renomowanym Zespole Obrazowania Ramanowskiego Zakładu Fizyki Chemicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa doktorska jest opracowaniem stosunkowo obszernym. Zredagowana została w języku polskim, na 183 stronach standardowego maszynopisu oraz opatrzona kopiami pięciu artykułów opublikowanych w uznanych czasopismach specjalistycznych, w których prezentowane były częściowo wyniki uzyskane w ramach projektu doktorskiego. Praca zredagowana została według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu formalnego. Wstępna część literaturowa, prezentowana w ramach rozdziału pierwszego, doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia związane ze stanami chorobowymi układu krwionośnego, przede wszystkim, w odniesieniu do śródbłonna naczyniowego. W rozdziale tym zaprezentowane zostały również stosowane w pracy doktorskiej techniki badawcze, w szczególności spektroskopia ramanowska i opierająca się na niej technika obrazowania w mikroskali. Osobny paragraf rozdziału I. poświęcony został wprowadzeniu w stosowane w analizie danych metody chemometryczne. Cele pracy doktorskiej, zarówno strategiczne jak i te szczegółowe, sformułowane zostały w ramach krótkiego rozdziału II. Używane w badaniach materiały oraz zastosowane procedury pomiarowe opisane zostały w sposób szczegółowy w ramach rozdziału III., zatytułowanego „Część Eksperymentalna”. Poziom szczegółowości tych opisów umożliwia w pełni, moim zdaniem, odtworzenie przeprowadzonych prac eksperymentalnych, oczywiście przy założeniu biegłości we władaniu technikami pomiarowymi porównywalnej z tą jaką zaprezentował Doktorant. W tym miejscu swojej analizy pracy doktorskiej mgr. Krzysztofa Czamary, chciałbym również zaakcentować różnorodność stosowanych technik badawczych, chociaż może w założeniu posiłkowych w stosunku do spektroskopii i obrazowania ramanowskiego, jednakże, jak okazało się, niosących cenne informacje i mających istotny wpływ na pełnię charakterystyki stanów chorobowych komórek śródbłonna naczyniowego. Ważną rolę odegrało w tym aspekcie obrazowanie prowadzone z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz badania prowadzone z zastosowaniem testów biochemicznych tak jak i sortowanie komórek w oparciu o analizę sygnału fluorescencyjnego. Najważniejszą częścią analizowanej rozprawy doktorskiej, stanowiącą o jej bardzo wysokim poziomie merytorycznym, jest zdecydowanie rozdział IV., zatytułowany „Wyniki i Dyskusja”. Już pierwszy podrozdział tej części, zatytułowany skromnie charakterystyka



spektralna lipidów, stanowi de facto, prawdziwe kompendium spektroskopii ramanowskiej lipidów acylowych oraz cholesterolu, zawierających przykładowe widma triglicerydów, typowych fosfolipidów oraz wolnych kwasów tłuszczowych, wraz z oznaczeniem reprezentatywnych pasm spektralnych w formie tabelarycznej. Ten bardzo dobrze opracowany podrozdział ukazał się zresztą w formie artykułu w czasopiśmie specjalistycznym *Journal of Raman Spectroscopy*. Artykułowi temu wróżę znaczny rezonans w środowisku badaczy lipidów i błon biologicznych, stosujących technik spektroskopii oscylacyjnej. W ramach zadań badawczych składających się na ocenianą rozprawę doktorską przeprowadzono szczegółowe analizy porównawcze dwóch linii komórek śródbłona naczyniowego (HMEC-1 oraz EA.hy926) poddanych czynnikom chorobotwórczym związanym ze stanem zapalnym (TNF- α oraz LPS) oraz wczesnymi stadiami apoptozy (FasL oraz CHX). Badania morfologiczne oraz chemometryczne wskazały jednoznacznie odpowiedź komórek, na poziomie fizjologicznym, w postaci formowania oraz wydzielania do przestrzeni pozakomórkowej kropli lipidowych (tak zwanych LDs, Lipid Droplets, ang.) o jednoznacznie zdefiniowanej kompozycji molekularnej, charakterystycznej dla komórek śródbłona naczyniowego ale różnicującej specyficznie rodzaj stanu chorobowego. Rezultat taki jest w mojej ocenie nie tylko bardzo interesujący ale również ważny w aspekcie poszukiwania markerów molekularnych chorób układu krwionośnego. W ramach pracy doktorskiej podjęto również wartościową próbę charakterystyki spektroskopowej badanych linii komórkowych na różnych etapach cyklu komórkowego. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na problem właściwego zestawiania grup komórek badanych i kontrolnych, w celu unikania artefaktów związanych potencjalnie z różnymi stadiami podziałów komórkowych. Rozprawę zamyka rozdział V. pt. „Podsumowanie i Wnioski Końcowe” oraz zestawienie cytowanych pozycji piśmiennictwa, jako nienumerowany rozdział pt. „Literatura”.

Poza wysokim poziomem merytorycznym, zaznaczyć chciałbym, iż rozprawa doktorska pana mgr. Krzysztofa Czamary jest opracowaniem wyjątkowo dobrze zredagowanym w aspekcie edycji tekstu oraz jakości grafik. W trakcie jej lektury praktycznie nie napotkałem miejsc, w których zaproponować mógłbym jakiegokolwiek korekty. Może jedynie trzy drobne propozycje:

1. str. 158., 1. wiersz pod rysunkiem: zamiast „pozwalana na” raczej „pozwala na”,
2. str. 164., 15 wiersz od dołu: zamiast „zawartości” proponuję „zawartość”



3. str. 166, 2. Wiersz od dołu: w miejsce „na tematach” lepiej brzmi „w tematach” bądź „na temat”.

Uwagę zwracają, natomiast, klarowność opisów i dyskusji oraz bardzo wysoka jakość grafik zestawiających zarejestrowane widma rozpraszania Ramana jak i obrazy uzyskane w oparciu o technikę mikro-obrazowania ramanowskiego oraz AFM.

Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim jest rozprawa doktorska pana mgr. Krzysztofa Czamary, dostarcza wiele ważnych informacji, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Zgodnie z przedstawianą w rozprawie interpretacją widm rozpraszania ramanowskiego, zarejestrowanych z próbek zawierających komórki HMEC-1, kontrolne oraz inkubowane z dodatkiem LPS (Rys. 40, str. 120), obecność tego czynnika nie wpływa istotnie na poziom białek. Z drugiej strony, pobieżna analiza kształtu widm w obszarze pasma amid I wskazuje na bardziej wyraziste zbrocze, zlokalizowane na krawędzi pasma (w rejonie 1600 cm^{-1}), w próbkach zawierających LPS, mogące wskazywać na tendencję do formowania agregatów białkowych. Odwrotny efekt daje się zaobserwować, moim zdaniem, w przypadku inkubacji komórek tej samej linii z czynnikiem TNF- α (Rys. 33, str. 110). Ciekaw jestem czy bardziej szczegółowa analiza widmowa pasma amid I potwierdza tę obserwację?
2. W dyskusji prezentowanej na str. 146 rozprawy, drgania rozciągające grupy karbonylowej wiązania peptydowego białek przypisuje się pasmu amid III (11 wiersz od góry). Wydaje się, iż te mody drgań mają swoje odzwierciedlenie całkowicie w składowych widma oscylacyjnego w paśmie amid I, w granicach $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$.
3. Bardzo ciekawa obserwacja, moim zdaniem, wypływa z analizy składu chemicznego frakcji LDs będącej odpowiedzią komórek na indukowanie stanu zapalnego na drodze stymulacji czynnikiem TNF- α oraz LPS. Ciekaw jestem, czy różnice w składzie chemicznym frakcji lipidów, przede wszystkim istotnie różny stopień nienasyconości, mogą mieć bezpośredni związek z odmiennymi ścieżkami reakcji komórek na stan zapalny i aktywowanymi w jego następstwie mechanizmami obronnymi?



Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Krzysztof Czamara przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w cyklu pięciu artykułów, opublikowanych w opiniotwórczych czasopismach specjalistycznych, o międzynarodowym zasięgu oraz w dwóch rozdziałach w monograficznych wydawnictwach książkowych. Wśród prac tych, pozytywnie wyróżnić można bardzo nośny, z poznawczego punktu widzenia, a zarazem niezwykle elegancki artykuł ogłoszony na początku bieżącego roku w renomowanym czasopiśmie Scientific Reports (IF>5) oraz obszerną i bardzo wartościową pracę przeglądową, która ukazała się na łamach opiniotwórczego czasopisma Trends in Analytical Chemistry (IF~8). Swój warsztat naukowy w obszarze biospektroskopii, Doktorant doskonalił również w innych badaniach, nie związanych bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej, których wyniki zamieszczone zostały w kilku wartościowych publikacjach. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Krzysztofa Czamarę spełnia z nadmiarem warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś ogromna liczba rezultatów oraz ich znaczenie w obszarze poszukiwania wiarygodnych markerów molekularnych stanów chorobowych układu krwionośnego, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam zdecydowanie jako wyróżniającą. Gratulując Doktorantowi oraz Pani Promotor, tak wartościowych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Czamarę do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, uprzejmie wnoszę o rozważenie możliwości uznania ocenianej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.