



Wrocław, 29.08.2016

Dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka

Uniwersytet Wrocławski

Wydział Chemii

e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl

Tel: +48713757347

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Kamili Kochan

pt. „*In situ* spectroscopic analysis of lipids and other biochemical changes in the selected models of liver injury”

wykonanej w Zespole Obrazowania Ramanowskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej

Spektroskopia oscylacyjna/wibracyjna, w tym spektroskopia Ramana, jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną biospektroskopii i znajduje szerokie zastosowanie jako narzędzie badawcze w analizie układów biologicznych. Technika ta pozwala charakteryzować struktury kluczowych biomolekuł, m.in. białek, kwasów nukleinowych, cukrów i lipidów, a w kontekście diagnostyki klinicznej znalazła zastosowanie do bardziej skomplikowanych układów biologicznych, jakimi są tkanki, płyny komórkowe i kultury komórkowe. Dla danej próbki biologicznej, widmo spektroskopowe jest charakterystycznym, unikatowym ‘odciskiem biochemicznym’ (ang. *fingerprint*) wszystkich jej molekularnych składników i może zostać wykorzystane do jednoznacznej identyfikacji jednego lub wielu związków lub ich subtelných zmian. Obecnie analiza histopatologiczna tkanki opiera się w dużym stopniu o obserwację zmian w strukturze tkanek; możliwe, że zmiany biochemiczne wykrywalne za pomocą spektroskopii mogą poprzedzać takie zmiany, tym samym torując drogę do wczesnego wykrywania chorób i ułatwiając szybsze podjęcie terapii. Od kilkunastu lat potencjał spektroskopii wibracyjnej jest z powodzeniem wykorzystywany do określania zmian patologicznych i rozróżniania stanów chorobowych, w tym szczególnie procesów nowotworowych. W podobnym nurcie badawczym mieści się praca doktorska Pani mgr Kamili Kochan, która w ramach pierwszej części rozprawy badała możliwości wykorzystania technik spektroskopii oscylacyjnej (spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera, FT-IR, oraz spektroskopii Ramana) do określania patogennych zmian wątroby w wybranych schorzeniach (*vide infra*). W drugiej części rozprawy Doktorantka rozszerza profil badań

poszukując odpowiedzi na pytanie 'czy można?' i 'jak?' wykorzystać spektroskopię oscylacyjną do badań diagnostycznych (tzw. screening) tkanek.

Do identyfikacji i badania zmian składu chemicznego tkanki wątroby Doktorantka wybrała mysie modele trzech chorób: niealkoholowego stłuszczenia wątroby (z *ang.* **Non-Alcoholic Fatty Liver**, NAFLD), cukrzycy typu II oraz miażdżycy. Biorąc pod uwagę fakt, że NAFLD dotyczy około 20-30% populacji i ściśle wiąże się ze współistnieniem chorób metabolicznych (otyłością, cukrzycą, czy hipertriglicydemią), tematyka dysertacji jest bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na badania ukierunkowane na rozwój metod analitycznych. Jako markery zmian patologicznych badano głównie zmiany lipidów oraz zawartość witaminy A. Możliwość zastosowania technik oscylacyjnych do tzw. rutynowego *screeningu* tkanek przeprowadzono na tkankach nowotworowych. Rozprawa doktorska została wykonana w grupie Profesor Małgorzaty Barańskiej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, która od wielu lat prowadzi badania nad rozwojem spektroskopowych metod diagnostycznych wybranych chorób cywilizacyjnych.

Rozprawa doktorska mgr Kamili Kochan przedstawiona została w formie zbioru 8 publikacji naukowych (5 pełnych artykułów oraz 3 komunikatów opublikowanych w czasopismach z bazy JCR), opatrzonych komentarzem w języku angielskim, w którym przybliżone zostały tezy oraz najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej. Doktorantka zamieściła również listę 5 prac tematycznie niezwiązanych z rozprawą doktorską, których jest współautorką.

W obszernym (54-stronicowym) komentarzu Doktorantka przedstawiła cel pracy, wstęp teoretyczny, dyskusję najważniejszych wyników oraz wnioski, po których znajduje się bibliografia zawierająca 92 pozycje literaturowe. Podoba mi się sposób prezentacji informacji, który we wstępie wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą chorób wątroby i powiązań między nimi, oraz zmian biochemicznych lipidów i witaminy A jako markerów zmian patologicznych. Pokazuje też możliwości oraz komplementarność stosowanych technik spektroskopowych (FT-IR oraz Ramana) w oznaczeniach próbek biologicznych. Doktorantka w sposób bardzo uporządkowany i klarowny przeprowadza czytelnika przez opis wyników, grupując i kompleksowo dyskutując najważniejsze osiągnięcia przedstawione w poszczególnych artykułach. Ta część opracowania zawiera wiele widm i rysunków (często pominiętych w publikacjach) ułatwiających czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników. Na podstawie przedstawionego opisu można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników. W ostatnim rozdziale przewodnika mgr Kochan podsumowała wyniki swoich badań, wskazując potencjał wybranych metod i markerów spektroskopowych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Kamili Kochan stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Wykazanie użyteczności oraz komplementarności metod spektroskopii oscylacyjnej (FT-IR oraz Ramana) w identyfikacji oraz biochemicznej charakterystyce patologicznych zmian tkanki wątroby;
- Potwierdzenie występowania niealkoholowego stłuszczenia wątroby NAFLD, jako stanu towarzyszącego chorobom cywilizacyjnym - cukrzycy typu II oraz miażdżycy; przeprowadzone badania wskazywały na większy stopień zaawansowania NAFLD w modelach cukrzycy typu II niż miażdżycy. Nie zaobserwowano zmian składu chemicznego tkanki wątroby pomiędzy tymi stanami patologicznymi.

- Udokumentowanie użyteczności lipidów i witaminy A jako spektralnych markerów rozwoju NAFLD i zmian chemicznych tkanki wątroby, także procesów postępu leczenia (tutaj z zastosowaniem leków o ustalonym działaniu: metmorfiny i perindoprilu, oraz NO-donorami o potencjalnej aktywności farmakologicznej: V-PYRRO/NO oraz V-PROLI/NO);

- Wskazanie, za pomocą spektroskopii Ramana, wzrostu ogólnego poziomu lipidów (potwierdzonych obrazowaniem FT-IR oraz odpowiednimi metodami barwień histochemicznych) oraz znaczących zmian w obrębie kropli lipidowych (obniżenie stopnia nienasycenia lipidów, czyli stosunku nienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych kwasów tłuszczowych) w tkance wątroby, jako zmian towarzyszących rozwojowi NAFLD; badania prowadzono na mysich modelach miażdżycy z różnym stopniem zaawansowania NAFLD;

- Uzyskanie szczegółowych informacji o poziomie lipidów (szczególnie istotne na poziomie różnic niewidocznych za pomocą metod barwień histochemicznych) za pomocą spektroskopii FT-IR;

- Zdefiniowanie *all-trans* retinolu jako formy witaminy A będącej markerem kondycji tkanki wątroby; szczególnie ciekawe było pokazanie wzrostu (a raczej powrotu) zawartości witaminy A w procesie leczenia NAFLD.

- Wskazanie użyteczności spektroskopii FT-IR do rutynowych badań diagnostycznych wątroby (z zaznaczeniem braku spełnienia wymogu nieinwazyjności metody); badania przeprowadzono na próbkach wątroby psów z chorobą nowotworową *Histiocytic sarcoma*, zwracając szczególną uwagę na sposób przygotowania próbki (standardowe procedury, czas, koszt), uniwersalność otrzymanych wyników (ze względu na rasę, wiek czy płeć) i koszt techniki eksperymentalnej (pomiar w trybie transmisji, refleksji).

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone właściwie. Dla NAFLD trafny wybór markerów w połączeniu z zastosowanymi technikami obrazowania – RS i FT-IR pozwolił na uzyskanie wysokiej czułości analitycznej i obrazowanie zmian na wczesnym etapie rozwoju patologii, co często trudne jest do obserwacji innymi technikami.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, jak *Analyst*, *Analytical Chemistry*, *Biochemical Pharmacology*, czy *Journal of Biophotonics* (wszystkie o wysokim współczynniku oddziaływania), i przedstawione wyniki były już poddane ocenie merytorycznej przez recenzentów poszczególnych artykułów. Poniżej, raczej z ciekawości, wymieniam najważniejsze pytania ogólne pojawiające się po lekturze prac (i przewodnika):

1. Analiza próbek biologicznych z wykorzystaniem spektroskopii wibracyjnej ma wiele potencjalnych zalet jako narzędzie diagnostyczne i zostały one podkreślone w pracy. Jakże jednak cechy/ograniczenia metodologiczne/inne trudności sprawiają, że pomimo wielu badań i dowodów eksperymentalnych użyteczności metod oscylacyjnych w diagnostyce klinicznej, jak dotąd nie znalazły one praktycznego zastosowania?

2. Czy inne, niezależne ale współistniejące z NAFLD/nowotworami choroby i przyjmowane leki, dla których wątroba jest głównym organem metabolizmu, mogą wpływać na widma oscylacyjne tej tkanki?

3. Czy istnieją biblioteki widm oscylacyjnych próbek biologicznych (tkanek/komórek itd.), przedstawiające szereg prawidłowych i patologicznych stanów, skorelowane z analizą histopatologiczną każdej próbki, a jeśli nie czy realne i potrzebne byłoby stworzenie takich baz danych?

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za bardzo istotny wkład w lepsze poznanie i zrozumienie roli lipidów i witaminy A jako markerów zmian patologicznych wątroby towarzyszących NAFLD. Pani mgr Kamila Kochan pokazała, że techniki spektroskopii oscylacyjnej (RS oraz FT-IR) oferują wiele potencjalnych korzyści w postaci narzędzi do diagnostyki klinicznej. Zdolność tych metod do wykrywania subtelnych zmian biochemicznych otwiera możliwość ich wykorzystania w diagnostyce, i może spowodować wzrost wykrywalności chorób wątroby na wczesnym etapie ich rozwoju.

Praca powstała w ramach projektu finansowanego przez NCN oraz Krakowskie Konsorcjum Naukowe im. Mariana Smoluchowskiego „Materia – Energia – Przyszłość” (status KNOW 2012-2015 ufundowany przez MNiSzW). Należy podkreślić pokaźny dorobek publikacyjny Doktorantki, pokazujący owocną współpracę z kilkoma ośrodkami i grupami badawczymi, co dobrze wróży rozwojowi jej dalszej kariery naukowej. Prace będące podstawą rozprawy doktorskiej są wieloautorskie, ale oświadczenia, Doktorantki i współautorów, wyraźnie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w przeprowadzeniu eksperymentów, opisie i interpretacji otrzymanych wyników spektroskopowych, a także przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Pani mgr Kamila Kochan jest pierwszym autorem w 6 z 8 prac.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), i wnoszę do Rady Wydziału Chemii UJ o dopuszczenie Pani mgr Kamili Kochan do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy z uwagi na bardzo ciekawe wyniki i wysoki poziom naukowy prowadzonych badań.

Barbara Gumińska-Kocetko