

Prof. dr hab. Anna Sułkowska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamili KOCHAN**

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

**na stopień doktora nauk chemicznych**

Definicja niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (*non-alcoholic fatty liver disease* – NAFLD) obejmuje stłuszczenie wątroby w badaniach obrazowych lub w badaniu histologicznym oraz brak przyczyn wtórnego nagromadzenia tłuszczu w wątrobie, takich jak przyjmowanie leków powodujących stłuszczenie lub choroby dziedziczne.

U większości chorych NAFLD jest związana z metabolicznymi czynnikami ryzyka: otyłością, cukrzycą i dyslipidemią. Według wytycznych American Gastroenterological Association z 2012 roku otyłość jest częstym i dobrze udokumentowanym czynnikiem ryzyka NAFLD. Dotyczy to zwiększonej wartości czynnika BMI. Wytyczne amerykańskich i europejskich towarzystw naukowych na temat diagnostyki i leczenia NAFLD są bardzo ostrożne, gdyż mają na uwadze ochronę pacjentów przed nadmiernymi badaniami diagnostycznymi i terapeutycznymi.

Na tym tle praca doktorska Pani Kamili Kochan jawi się jako próba aktualnego i dającego nadzieję na poprawę diagnostyki uczestnictwa w badaniach. Wybór tematu uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań biomedycznych. Temat ocenianej rozprawy doktorskiej jest częścią tematyki prowadzonej przez zespół Pani prof.dr hab. Małgorzaty Barańskiej, promotora rozprawy.

1. Informacje ogólne

Praca, oprócz streszczenia w języku polskim, została przygotowana w języku angielskim.

Stanowi ją 8 publikacji z lat 2013-2015 o współczynniku oddziaływania IF 30,93.

1. A comprehensive approach to study liver tissue: spectroscopic imaging and histochemical staining, **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, 2013, 2(4), 331-337; (1. autor)
2. Pathological changes in the biochemical profile of the liver in atherosclerosis and diabetes assessed by Raman spectroscopy, **Analyst**, 2013, 138, 3885-3890; (1. autor)
3. Raman spectroscopy analysis of lipid droplets content, distribution and saturation level in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in mice, **Journal of Biophotonics**, 2015, 8(7), 597-609; (1. autor)

4. Raman imaging providing insights into chemical composition of lipid droplets of different size and origin: in hepatocytes and endothelium, **Analytical Chemistry**, 2014, 86(13), 6666-6674. (2. autor)
5. The liver-selective NO donor, V-pYRRO/NO, protects against liver steatosis and improves postprandial glucose tolerance in mice fed high fat diet, **Biochemical Pharmacology**, 2015, 93(3), 389-400. (1. autor)
6. Raman spectroscopic studies of vitamin A content in the liver: a biomarker of healthy liver, **Analyst**, 2015, 140, 2074-2079. (1. autor)
7. FT-IR imaging for quantitative determination of liver fat content in Non-Alcoholic Fatty Liver, **Analyst**, 2015, 140, 4997-5002. (1. autor)
8. Comparison of FTIR transmission and transfection substrates for canine liver detection, **Analyst**, 2015, 140(7), 2402-2411. (1. autor)

Po streszczeniu w języku angielskim i polskim i spisie 8 publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Autorka prezentuje listę dodatkowych 5 publikacji swojego współautorstwa z lat 2012-2016, nie wchodzących w skład rozprawy, autoreferat (64 strony) pomyślany jako komentarz do zamieszczonych następnie pełnych tekstów ośmiu publikacji. Doktorantka bardzo wnikliwie opracowała zbiorczo swoje wyniki z jednorodnych tematycznie 8. publikacji w Komentarzu, opartym dodatkowo o 92 pozycje literaturowe.

Po suplemencie zawierającym wyniki badań spektroskopowych przedstawione są oświadczenia współautorów o ich udziale w poszczególnych publikacjach. Oświadczenia współautorów oraz Doktorantki o ich wkładzie w tworzenie publikacji są niezbędnym dokumentem dla oceny rozprawy, ponieważ publikacje, stanowiące rozprawę doktorską, są wieloautorskie.

Na ich podstawie można stwierdzić, że Pani mgr Kamila KOCHAN była odpowiedzialna za część doświadczalną (pomiar, analiza i interpretacja danych spektroskopowych [1-8]), a także za planowanie eksperymentu [2] oraz przygotowywanie i korektę manuskryptów.

W komentarzu do zestawu 8. publikacji Autorka dodatkowo podaje nazwiska współwykonawców analiz (str. 30, 59). Wskazuje to na odpowiedzialny i indywidualny wkład Doktorantki w część doświadczalną, stanowiącą istotę przeprowadzonych badań oraz interpretację i dyskusję wyników. Ciekawie napisane Wstępy do 8 publikacji oraz praca w *Journal of Raman Spectroscopy* nie wchodząca w skład doktoratu [2] świadczą o posiadaniu przez Doktorantkę ogólnej wiedzy teoretycznej w dziedzinie, będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej.

## 2. Ocena merytoryczna

Pani mgr Kamila KOCHAN obrała za cel swojej rozprawy doktorskiej wykorzystanie obrazowania spektroskopii oscylacyjnej FT-IR oraz Ramana do oceny chorobowych zmian w tkance wątroby. W założeniu perspektywnym - zastosowanie obrazowania spektroskopowego do badań diagnostycznych a także śledzenia patogenezы chorób nowotworowych wątroby. Jako metodę referencyjną zastosowała barwienie histochemiczne.

Postawiła sobie odważne wyzwanie – znaleźć markery zmian chorobowych wątroby, które byłyby możliwe do identyfikacji technikami spektroskopowymi. Badała lipidy oraz zawartość witaminy A. Zmiana ich zawartości wraz z postępowaniem stłuszczenia wątroby jest znana. Autorka natomiast znalazła spektralne markery, które dowodnie zinterpretowały wzrost kropli lipidowych i zmniejszenie stopnia nienasyceń lipídów, jak również zmniejszenie zawartości witaminy A, charakterystyczne dla postępu choroby. Najbardziej obiecujące są zauważalne zmiany w widmie na wczesnym etapie choroby, trudne jeszcze do zauważenia za pomocą innych technik. Należy podkreślić, że nie-alkoholowe stłuszczenie wątroby jest schorzeniem bezobjawowym. Dlatego Autorka za model wzięła choroby cywilizacyjne: miażdżycę (AS) i cukrzycę typu II (T2DM). Gdyby udało się wykorzystać metodę spektroskopową, zaproponowaną przez Panią mgr Kamilę KOCHAN, do opisu stanu wątroby we wczesnym stadium stłuszczenia, byłby to przewrót w diagnostyce.

Pani mgr Kamila udowodniła także, że znalezione przez nią markery spektroskopowe stanu wątroby mogłyby być wykorzystane w ocenie skuteczności terapii lekowej. Uczyniła to na przykładzie metforminy, perindoprilemu oraz dwóch związków, uwalniających tlenek azotu (V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO), które mogłyby być stosowane w stłuszczeniu wątroby.

W tym przypadku Autorka także zauważyła, że prawidłowo zinterpretowała markery spektralne stłuszczenia wątroby, a w szczególności te, związane z witaminą A.

Najtrudniejszą do interpretacji częścią pracy doktorskiej jest zastosowanie technik obrazowania spektroskopowego do diagnostyki chorób nowotworowych [8]. Przy współpracy z Michigan State University i zastosowaniu innego modelu (pies z *histiocytic sarcoma*) oraz spektroskopii FT-IR w trybie transmisji i transfleksji otrzymano obiecujące wyniki *screeningu* tkanek na przykładzie nowotworów wątroby przy wykorzystaniu wybarwienia histochemicznego, jako metody odnośnikowej.

Należy podkreślić dwie zalety Doktorantki. Jej opis do 8. publikacji zawiera nowe zbiorcze rysunki, porównawcze widma. Po drugie jest bardzo krytyczna w stosunku do własnych wyników. Widzi i podkreśla niedoskonałości zaproponowanych metod. Zapowiada się na dobrego naukowca.

---

### 3. Uwagi

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska jest przygotowana niezwykle starannie. Nie mam uwag krytycznych do doboru publikacji, wchodzących w skład rozprawy. Są one ocenione już przez niezależnych międzynarodowych ekspertów.

- Praca jest tak perspektywiczna, że można zaniechać zarzutu o nierównocенności jej części dotyczącej późniejszego zastosowania eksperymentów w diagnostyce i wykorzystania do oceny patogenezы chorób. Obie warte są rozwinięcia w kolejnych badaniach. Jednak szczególnej uwadze należałoby poświęcić wnioski z badań zarysowanych jedynie, które miałyby kiedyś niezawodnie pomóc w wykrywaniu nowotworów. Mimo zastosowania przez Doktorantkę różnorodnych próbek odniesienia, jednoznaczna ocena wyników obrazowania w podczerwieni wydaje się jeszcze niemożliwa.

- Czy Autorka mogłaby skomentować swoje wyniki na temat NO donorów: V-PYRRO/NO i V-PROLI/NO. Pierwszy jest metabolizowany w wątrobie, drugi – nie. Jest wydalany przez nerki. Te dwa NO-donory wpływają różnie na zawartość lipidów. Pierwszy – redukuje, drugi – zwiększa zawartość lipidów.

- Moje szczegółowe uwagi dotyczą jedynie spisu literatury, która jest niejednolicie zacytowana: -brak czcionki *italic* dla czasopism 38, 61 i 61;

-użycie małych liter w nazwach czasopism: 25, 26, 29, 32, 33, 36, 41-45, 47, 48, 50, 52, 54, 55, 59, 60, 62, 64-72, 75, 83, 89 i 91;

-skrót czasopisma 3, 9 i 12;

-tytuł artykułu [4] na str. 7 napisany wielkimi literami;

- literatura 37 zaczyna się nie od nazwiska autora, lecz od słów „TO BYŁO 16”.

- Rozdziały „Streszczenie” i „Abstract” powinny mieć, moim zdaniem, tę samą treść, a tak się nie stało.

W tytuł rozprawy wkradła się niezręczność spowodowana prawdopodobnie chęcią zwięzłego opisanja obszernych badań: „... analiza lipidów i innych biochemicznych zmian...”.

Błahość tych zarzutów świadczy, że w mojej opinii, wybór i sposób przedstawienia zagadnień wskazują na dużą wiedzę i dobre teoretyczne przygotowanie Doktorantki do badań, będących tematem Jej pracy.

Praca wykonana przez Doktorantkę pod nadzorem merytorycznym Pani prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej, znanej w świecie, doświadczzonej specjalistki w dziedzinie spektroskopii stosowanej do badań biologicznych i medycznych, stanowi kolejny krok w

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej

Medical University of Silesia  
Department of Physical Pharmacy

41-200 Sosnowiec, ul. Jagiellońska 4

POLAND

tel.: +48 32 364 15 80-3

---

stronę wykorzystania spektroskopii Ramana sprzężonej z mikroskopem konfokalnym w diagnostyce.

Po dogłębnym zapoznaniu się z treścią przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej Pani mgr Kamili KOCHAN pt.: „***In situ* spectroscopic analysis of lipids and other biochemical changes in the selected models of liver injury**” stwierdzam, że jest ona oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu i w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami).

Ponadto, biorąc pod uwagę szeroki zakres podjętych badań, ich interdyscyplinarność i aktualność, potwierdzoną współautorstwem w 8 publikacjach w renomowanych czasopismach, a także głębokie zrozumienie problemów i aplikacyjny charakter badań, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili KOCHAN.

Przedkładam Pani Dziekan oraz Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Kamili KOCHAN do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sosnowiec, 29.07.2016

