



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej
Laboratorium Laserowej Spektroskopii Molekularnej

Dr hab. inż. Beata Brożek-Płuska

Łódź, 20.08. 2015 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Kozickiego
pt.: Analiza ramanowska elementów morfotycznych krwi ludzkiej w stanie zdrowia i choroby.

Praca doktorska Pana mgra Mateusza Kozickiego została wykonana w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej Zakładu Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Wesełuchy-Birczyńskiej.

Celem przedłożonej do recenzji rozprawy były badania składników morfotycznych krwi ludzkiej pozyskanej od zdrowych ochotników oraz pacjentów chorych na: malarię, posocznicę, zarażonych bakteriami *Clostridium difficile* odpowiedzialnymi za rzekomobłoniaste zapalenie jelit z zastosowaniem metod spektroskopowych.

Badania opisane w rozprawie wypisują się w bardzo aktualną tematykę obejmującą opracowanie nowoczesnych i mało inwazyjnych technik analizy komórek i tkanek ludzkich.

Opracowywanie nowych metod diagnostycznych zwiększa szanse ludzkości na podjęcie skutecznej walki z najbardziej śmiertelnymi chorobami takimi jak np.: malaria poprzez szybką i jednoznaczną diagnozę zmian patologicznych. Recenzowana rozprawa przyczynia się również do upowszechnienia wykorzystania metod spektroskopowych w analizie układów biologicznych.

Mgr Mateusz Kozicki wykonując badania w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej realizował je w zespole należącym do najwyższej cenionych laboratoriów w Polsce wykorzystujących w metodyce badawczej spektroskopię wibracyjną. Część badań realizowana była z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik spektroskopowych, w tym obrazowania ramanowskiego, we współpracy międzynarodowej z laboratorium prof. Baydena Wood'a z Uniwersytetu Monash w Melbourne, Australia.

O wysokiej randze przeprowadzonych, w ramach rozprawy doktorskiej, badań świadczą także publikacje w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) np.: *Anlyst*.

Realizacja zaplanowanych w pracy doktorskiej badań niewątpliwie wymagała od mgra Mateusza Kozickiego zarówno znakomitego przygotowania teoretycznego w zakresie zaawansowanych metod spektroskopowych (spektroskopii Ramana, IR i EPR) jak i praktycznych umiejętności stosowania metod fizykochemicznych w pracy z materiałem biologicznym.



W części literaturowej Autor skoncentrował się na opisie elementów morfotycznych krwi ludzkiej, a następnie pokrótce opisał stany chorobowe takie jak: malaria, posocznica, zakażenie *Clostridium difficile*. W części tej Autor opisał również postawy wykorzystanych w badaniach technik: spektroskopii Ramana, techniki ATR wykorzystywanej w pomiarach w podczerwieni oraz spektroskopii EPR. Materiał przedstawiony w części literaturowej rozprawy został dobrany trafnie w kontekście celu jaki Doktorant postawił sobie w prowadzonych badaniach.

Niestety Autor nie ustrzegł się pewnych błędów:

- Brak w rozprawie jawnie sformułowanego celu i zakresu prowadzonych badań.
- Na stronie 5 przededagowaniu powinno ulec zdanie rozpoczynające się od słów „Obydwie konformacje zachodzące po przyłączeniu atomów tlenu...”.
- Na stronie 6 podano dwa różne udziały procentowe spektryny.
- Na stronie 8 pada sformułowanie: „informacje o stanie aktywacji leukocytów mogą być podstawą kondycji zdrowotnej pacjentów...”
- Na stronie 9 w opisie neutrofilii obok informacji o wielopłatowych jądrach powinna znaleźć się także informacja np. o centrioli jako podstawowym elemencie budowy i pseudopodiach wytwarzanych w procesie aktywacji tych komórek.
- Na stronie 10 brak objaśnień skrótów CAMP oraz DAG, a rysunek nr 3 prezentowany jest w wersji angielskiej.
- Na stronie 11 występuje sformułowanie „odporności komórkowej i humoralnej...”
- Wysoce niefortunne sformułowanie występuje na stronie 13: „Liczbę przypadków przywleczonych do Europy ...”
- Błędy stylistyczne występują także na stronach: 14, 16, 18, 27, 32.
- Na stronie 21 Autor opisuje stosunek obsadzeni poziomów energetycznych jaki można oszacować na podstawie rozkładu Boltzmanna. Uważam, że celowym byłoby doprecyzowanie, iż mowa o poziomach wibracyjnych.
- Przededagowane powinno być również pierwsze zdanie na stronie 21 opisujące zależność między indukowanym momentem dipolowym a natężeniem promieniowania elektromagnetycznego.
- Na stronie 23 nieprawidłowo zapisano równie Lagrange'a a na stronie 24 równanie pozwalające wyliczyć energię oscylacyjną.
- W kontekście zastosowania technik spektroskopii Ramana w sekwencjonowaniu peptydów odsyłam Autora do prac np. V. Deckert'a i E. Bailo.
- Na stronie 27 w niezbyt czytelny sposób opisano interpretację pasm z zakresu 3000-2850 1/cm.

W części doświadczalnej mgr Mateusz Kozicki przedstawił wyniki pomiarów uzyskane z zastosowaniem spektroskopii Ramana, IR, EPR koncentrując swą uwagę na przypisaniu obserwowanych pasm do poszczególnych grup funkcyjnych i wskazaniu różnic między układami zdrowymi a zmienionymi chorobowo. Przeprowadzone badania i analiza otrzymanych wyników pozwoliła Autorowi na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Spektroskopia Ramana pozwala na pełną charakterystykę biochemiczną badanych układów.
- Różnice w widmach wibracyjnych między próbkami pochodzącymi od pacjentów zdrowych i chorych pozwalają wnioskować o wysokim potencjale metod spektroskopowych w różnicowaniu stanów prawidłowych od patologicznych.
- Spektroskopia Ramana i EPR 2D mogą być wykorzystane do śledzenia procesu starzenia się i dezintegracji zdrowych ludzkich erytrocytów.
- Pomiar z zastosowaniem spektroskopii Ramana pozwalają na rozróżnienie erytrocytów zdrowych od typowych dla zakażenia zarodźcem malarii, a wniosek ten wyciągnięto tak w oparciu o analizę charakterystycznych częstości jak i stosunków intensywności wyselekcjonowanych pasm.
- Widma Ramana pozwalają na określenie stosunku ilości hemoglobiny utlenowanej do nieutlenowanej.
- Widma Ramana pozwalają na określenie stosunku różnych konformacji charakterystycznych dla białek obecnych w badanych próbkach.

- Widma wibracyjne pozwalają na rozróżnienie grup erytrocytów zainfekowanych od erytrocytów zainfekowanych poddanych działaniu leku (CQ).
- Analiza PCA widm Ramana typowych dla pacjentów zakażonych bakterią *Clostridium difficile* pozwala na wnioskowanie o stadium choroby, dla dnia siódmego wykazano wzrost poziomu utlenowanej hemoglobiny w porównaniu z dniem pierwszym.
- Widma Ramana pozwalają śledzić proces aktywacji limfocytów.
- Obrazowanie Ramana pozwala na monitorowanie aktywacji neutrofilii podczas rozwoju posocznicy.

Po zapoznaniu się z tą częścią pracy mam jednak kilka uwag i pytań:

- Podobnie jak w części literaturowej Autor nie ustrzegł się błędów stylistycznych występujących na stronach: 37, 38 („Moc laserów padających na próbki...”), 39 (podpis pod rysunkiem 11), 43, 68, 80.
- W pracy nie zastosowano ujednoliconego podejścia w opisie rodzaju pasm: „asymetryczne”, „antysymetryczne”.
- Komentarza wymagają dane z Tabeli nr 5, na stronie 61, wartości dla kolumn A i D są bardzo podobne.
- W przypadku opisu analizy PCA Autor na stronie 82 zaznacza, iż złożoność analizy powodowana jest koniecznością wzięcia pod uwagę wielu widm dla wielu próbek, uważam, że należy zauważyć, iż również wiele częstości składających się na pojedyncze widma wibracyjne wpływa na złożoność problemu.
- Na stronie 74 Autor pisze o normalizacji widm, nie ma jednak informacji jak normalizację przeprowadzano.
- Na stronie 78 i 79 podpisy pod rysunkami 26 i 27 powinny być przeredagowane ponieważ widma na rysunku prezentowane są w inne kolejności.
- W przypadku różnych jednostek chorobowych Autor zaprezentował analizę PCA przedstawiając zależności tylko PC1 ver. PC2 lub PC1 ver. PC3, czyli w sposób nieujednolicony. Autor poprzestał także na prezentacji wyników np. dla 2 czynników głównych mimo, że nie przybliżały one do opisu 100% wariancji układu.
- Na stronie 97 bez podania skali w jakiej przedstawiono widma trudno oszacować 10-krotną różnicę intensywności pasm dla chorych tuż po przyjęciu do szpitala i tygodniowej hospitalizacji.
- W literaturze znane są badania z zastosowaniem spektroskopii Ramana dotyczące rozpoznania malarii również w oparciu o badania osocza, chciałabym więc zapytać czy podejmowano lub planuje się podjęcie takich badań.

Mimo wymienionych powyżej uwag i komentarzy należy podkreślić, że mgr Mateusz Kozicki wykonał ogromną pracę i jestem przekonana, iż Doktorant bardzo dużo się podczas realizacji tej pracy nauczył. Na szczególne uznanie zasługuje połączenie wielu technik badawczych, analiza nie tylko częstości charakterystycznych ale i wdrożenie metod chemometrycznych.

Wyniki uzyskane w toku realizacji rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w 4 publikacjach; w jednej z nich mgr M. Kozicki jest pierwszym autorem, w 3 kolejnych autorem drugim. Uważam, że jest to wynik bardzo dobry dla osoby starającej się o stopień doktora chemii.

Podsumowując swoją opinię o pracy chciałabym wyraźnie stwierdzić, że wysoko oceniam poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Doktorant swobodnie posługiwał się w swej pracy wieloma technikami spektroskopowymi a badania układów biologicznych nie należą do łatwych. Przechodząc do końcowej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że stanowi ona bardzo wartościowy wkład do badań spektroskopowych składników krwi ludzkiej.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona przez Doktoranta rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr M. Kozickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Beata Brożek-Pluska

dr hab. inż. Beata Brożek-Pluska