

Dr hab. inż. Magdalena Szczerbowska-Boruchowska
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
Al. Mickiewicza 30
30-059 Kraków

Kraków, 19.08.2015 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Mateusza Kozickiego pt. "Analiza ramanowska elementów morfotycznych krwi ludzkiej w stanie zdrowia i choroby", wykonanej pod kierunkiem dr hab. Aleksandry Wesełuchy-Birczyńskiej. Praca powstała w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii UJ.

Rozprawa doktorska mgr M. Kozickiego jest pracą aplikacyjną i interdyscyplinarną. Dotyczy wykorzystania współczesnych technik analitycznych, głównie spektroskopii ramanowskiej w zastosowaniach medycznych/klinicznych. Część analityczna pracy wspierana jest przez metody chemometryczne. Szereg problemów z zakresu medycyny, dotyczących zarówno diagnostyki jak i terapii na poziomie biochemicznym, biomolekularnym wymaga wsparcia współczesnych technik chemii czy fizyki. Tym samym opiniowana praca doktorska wpisuje się w nurt aktualnych zagadnień z zakresu (bio)chemii, analityki i medycyny, a tematyka podjęta przez Autora jest w pełni uzasadniona.

TREŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ I JEJ STRUKTURA

Całość pracy doktorskiej mgr Mateusza Kozickiego liczy 142 strony, włączając w to streszczenie pracy w języku angielskim, spis rysunków i tabel jak również wykaz publikacji Doktoranta. Wszystko razem zebrane jest w 8 rozdziałach, przy czym rozdział pierwszy, zatytułowany „Wstęp” nie zawiera treści (o czym piszę również w dalszej części recenzji).

Rozdział drugi pracy stanowi wprowadzenie teoretyczne, w którym Autor zamieszcza informacje literaturowe nt. elementów morfotycznych krwi, poddanych analizie w ramach realizowanej tematyki badawczej tj. erytrocytów i leukocytów (ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów oraz neutrofilii). W paragrafie drugim znajdują się również informacje o wybranych stanach patologicznych takich jak malaria, sepsa, infekcja wywołana bakterią *Clostridium difficile*, grypa, które skutkują zaburzeniami w obrębie elementów morfotycznych krwi i stanowią przedmiot badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Część literaturowa pracy obejmuje również przedstawienie podstaw teoretycznych technik badawczych wykorzystanych w części doświadczalnej pracy, tj. spektroskopii ramanowskiej z uwzględnieniem rezonansowej spektroskopii ramanowskiej, spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR) oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). W odniesieniu do spektroskopii ramanowskiej Autor krótko przedstawia potencjalne możliwości wykorzystania tej techniki w analizie głównych molekuł i makromolekuł biologicznych takich jak hemoporfiryny, białka i lipidy (np. w błonach biologicznych).

Część trzecia pracy, doświadczalna, stanowiąca zarazem „rdzeń” recenzowanej rozprawy doktorskiej poświęcona jest identyfikacji zmian biochemicznych w poszczególnych elementach morfotycznych krwi w stanach fizjo – i patologicznych. Przy czym, najobszerniejszą część stanowią badania nad erytrocytami. Poszczególne sekcje tego rozdziału dotyczą odrębnych zagadnień,

realizowanych w ramach tematyki niniejszej pracy doktorskiej i zawierają obok informacji nt. materiału badawczego i metody pomiarowej (niestety niejednokrotnie dość lakonicznie przedstawionych) również wyniki analizy oraz zestawienie literatury wykorzystanej w danym podrozdziale. W odniesieniu do erytrocytów, Autor przedstawia wyniki swoich prac, dotyczących analizy składu biochemicznego zdrowych krwinek, ich błon biologicznych oraz zmian zachodzących w naturalnym procesie starzenia się erytrocytów. Kolejne aspekty dotyczą badań nad erytrocytami w przypadku zmian patologicznych. I tak, Doktorant przedstawia wyniki eksperymentów dotyczących:

- wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do badania erytrocytów zainfekowanych zarodźcem sierpowym (*Plasmodium falciparum*);
- wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do badania erytrocytów zainfekowanych *Plasmodium falciparum* po dodaniu leku antymalarycznego, chlorochiny (CQ);
- wykorzystania spektroskopii ATR-FTIR w badaniach erytrocytów zainfekowanych zarodźcem sierpowym po dodaniu CQ;
- wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do badania erytrocytów zainfekowanych *Clostridium difficile*.

Zmiany biochemiczne w limfocytach pod wpływem infekcji wirusowej Autor bada na przykładzie grypy. Ostatnim problemem zaprezentowanym w rozdziale trzecim jest analiza ramanowska neutrofilii podczas sepsy.

Po części doświadczałnej Autor zamieszcza bardzo krótkie, ogólne podsumowanie prac wraz z wnioskami wypływającymi z poszczególnych eksperymentów.

Jak wspomniano uprzednio, pracę kończą cztery rozdziały, w kolejności streszczenie pracy w języku angielskim, spis rysunków i tabel jak również wykaz publikacji Doktoranta, które wykorzystane zostały w rozprawie doktorskiej.

Wyniki swoich badań Autor prezentuje w postaci graficznej na 43 rysunkach oraz w 17 tabelach.

W odniesieniu do badań erytrocytów niepatologicznych Doktorant zmierzył i zidentyfikował pasma ramanowskie molekuł biologicznych typowe dla prawidłowych krwinek czerwonych. W swoich badaniach Autor skupił się również na jednym z fizjologicznych procesów zachodzących w krwinkach czerwonych, a mianowicie procesie starzenia się tych komórek. Erytrocyty zostały poddane badaniom pomiędzy trzecim a dwudziestym siódmym dniem od pobrania krwi. Do analizy wyników uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej, oprócz typowej analizy spektralnej, Autor zastosował uogólnioną dwuwymiarową analizę korelacji. Wyniki tych prac pozwoliły Doktorantowi na wyciągnięcie wniosków wskazujących na postępującą separację globin od hemu oraz rozpad globin na aminokwasy, z dominującą obecnością wśród nich tyrozyny. Ponadto, Autor stwierdził, że proces starzenia się erytrocytów jest inicjowany zmianami w strukturach białkowych, co może się wiązać z procesem fragmentacji błony białkowo-lipidowej. Jako badania uzupełniające zostały wykonane pomiary z wykorzystaniem spektroskopii EPR. W tym przypadku próbki były poddane badaniom dzień, miesiąc i dwa miesiące po pobraniu. Badania wykazały obecność głównie hemowych i niehemowych jonów żelaza oraz kompleksów miedzi jak również potwierdziły postępującą separację żelaza od hemu w procesie starzenia erytrocytów.

Wśród badań patologii erytrocytów Autor przedstawił przypadek zainfekowania tych krwinek zarodźcem sierpowym, stanowiącym jeden z najgroźniejszych dla człowieka gatunków pierwotniaka. Należy podkreślić, że malaria nie jest typową chorobą dla naszej strefy klimatycznej, więc w badaniach tego rodzaju choroby należy się liczyć z ograniczeniami dostępu do materiału badawczego, co również znajduje odzwierciedlenie w pracy p. Mateusza Kozickiego poprzez

relatywnie niewielką liczbę przebadanych próbek. W pracy prezentowane są wyniki z badań trzech „reprezentatywnych”, jak stwierdza Autor, pacjentów dotkniętych malarią. Niemniej jednak, są to prace pionierskie, które mogą się przyczynić do lepszego poznania procesów biochemicznych towarzyszących zakażeniu zarodźcem sierpowym. Autor, w oparciu o analizę spektralną widm ramanowskich stwierdził obecność zmian wywołanych procesem chorobowym, obejmujących m. in. spadek płynności błony komórkowej erytrocytów i jej postępujące nieuporządkowanie, dominującą obecność deoksyhemoglobiny z hemem zawierającym Fe^{3+} . Autor przedstawia również wyniki wskazujące na destrukcję komórek wywołanych obecnością pasożyta, przejawiającą się wzrostem ilości nieuporządkowanych form polipeptydów (kłębków statystycznych). Ma to związek z postępującą degradacją hemoglobiny i zmianami struktury białek błonowych. Przeprowadzone badania pozwoliły również na identyfikację procesu związanego z formowaniem hemozoiny, co jest typowe dla początkowego stadium infekcji.

Oprócz monitorowania zmian zachodzących w zainfekowanych erytrocytach Doktorant poświęcił osobny podrozdział swojej pracy badaniom jednego z leków antymalarycznych, chlorochiny. W badaniach tych oprócz spektroskopii ramanowskiej, zastosowanej głównie do oceny stanu utlenowania hemoglobiny po podaniu chlorochiny Autor przeprowadził również pomiary techniką spektroskopii ATR-FTIR, w celu pozyskania informacji nt. głównych makromolekuł biologicznych. Jako narzędzia wielowymiarowej analizy danych zastosowane zostały analiza skupień metodą k-średnich oraz analiza składowych głównych.

Oceny zmian biochemicznych zachodzących w patologicznych erytrocytach podjął się również Doktorant w przypadku infekcji bakterią *Clostridium difficile*. W tym przypadku grupa badawcza objęła 20 pacjentów zainfekowanych, hospitalizowanych i 20 zdrowych. Autor dokonał analizy porównawczej widm ramanowskich dla pacjentów zdrowych oraz zainfekowanych bakterią *Clostridium difficile* w pierwszym i siódmym dniu leczenia. Dla porównania grup badawczych została zastosowana również analiza składowych głównych. Badania wskazują na wzrost utlenowania hemoglobiny po zastosowanej terapii (pomiędzy pierwszym a siódmym dniem), jak również pozwalają na identyfikację szeregu zmian w obrębie hemu i aminokwasów erytrocytów jako efektu działania toksyn.

Krwinkami, poddanymi w analizie w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej są również limfocyty, których aktywację w wyniku popularnej infekcji wirusowej, a mianowicie grypy bada Doktorant. Nośnikiem informacji o aktywowanych krwinkach są immunoglobuliny a konkretnie drganie mostków disiarczkowych. Znaczący wzrost intensywności tego pasma markerowego wiąże Doktorant właśnie z formowaniem i agregacją immunoglobulin w aktywowanych komórkach. Różnice pomiędzy nieaktywowanymi a aktywowanymi limfocytami Autor pokazuje nie tylko w oparciu o widma ramanowskie ale również w oparciu o dystrybucję immunoglobin i tyrozyny w pojedynczych komórkach. Zmiany w dystrybucji tyrozyny, które pojawiają się w limfocytach w wyniku infekcji wirusowej są wymownym przykładem zmian składu białek zarejestrowanych przez Doktoranta.

Doktorant podjął się również oceny zmian aktywacji neutrofilii ludzkich następującej w wyniku sepsy. Przebadanych zostało 10 pacjentów z tą infekcją oraz 10 zdrowych osób. Jako marker aktywacji komórek wykorzystana została mieloperoksydaza, którą można rejestrować przy wykorzystaniu spektroskopii Ramana na poziomie pojedynczej komórki. Przeprowadzona przez Doktoranta analiza miała charakter ilościowy i topograficzny. W ramach niniejszej pracy doktorskiej zostało doświadczalnie wykazane wewnątrzkomórkowe wydzielanie mieloperoksydazy, jako reakcji aktywowanych neutrofilii na infekcję wirusową, toczącą się w organizmie człowieka, co również świadczy o pionierskim charakterze prezentowanych badań naukowych.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY I UWAGI

Dokonując oceny pracy należy przede wszystkim zgodzić się z wnioskami zamieszczonymi w pracy, wskazującymi na obecność zmian biochemicznych zachodzących w elementach morfotycznych krwi podczas infekcji wirusowych i bakteryjnych. Uzyskane wyniki mogą stanowić cenny wkład w poznanie procesów biochemicznych, zachodzących w krwi człowieka w przypadku ww. infekcji. Zgodnie tytułem pracy Autor wykazał użyteczność spektroskopii ramanowskiej w monitorowaniu zmian zachodzących w krwi w stanach fizjo- i patologicznych. Doktorant trafnie dobrał metody analityczne, aby dokonać identyfikacji tych zmian. Autor opracował procedury związane z przygotowaniem próbek do wykorzystywanych technik analitycznych, właściwie zoptymalizował warunki pomiarowe, dokonał stosownych analiz włączając nowoczesne wielowymiarowe metody analizy danych celem wyciągnięcia nawet subtelnych wniosków z uzyskiwanych wyników. Autor wykorzystał również swoją wiedzę teoretyczną, literaturą do dokonania interpretacji otrzymanych rezultatów prac. Należy podkreślić fakt ścisłej współpracy Doktoranta ze środowiskiem medycznym, co jest warunkiem owocnej pracy interdyscyplinarnej, a czego przykładem jest niniejsza rozprawa doktorska. Uważam, że choć niesprecyzowany jasno w treści rozprawy cel pracy został osiągnięty.

Jednym z moich zastrzeżeń do Autora, przedłożonej mi do zaopiniowania rozprawy doktorskiej, jest występowanie w części doświadczalnej całych podrozdziałów, będących dosłownym tłumaczeniem z języka angielskiego publikacji, których mgr M. Kozicki jest jednym ze współautorów. Są to prace:

1. Weselucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Łabanowska M, Nowak P, Kowalczyk G, Kurdziel M, Birczyńska M, Biesiada G, Mach T, Garlicki A. Human erythrocytes analyzed by generalized 2D Raman correlation spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 2014, 1069: 305-12.
2. Weselucha-Birczyńska A, Kozicki M, Czepiel J, Birczyńska M. Raman micro-spectroscopy tracing human lymphocyte activation. *The Analyst* 2013, 138: 7157-63.
3. Czepiel J, Kozicki M, Panasiuk P, Birczyńska M, Garlicki A, Weselucha-Birczyńska A. Clostridium difficile the hospital plague. *The Analyst.* 2015, 140: 2513-22
4. Kozicki M, Creek DJ, Sexton A, Morahan BJ, Weselucha-Birczyńska A, Wood BR. An attenuated total reflection (ATR) and Raman spectroscopic investigation into the effects of chloroquine on Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Analyst.* 2015, 140: 2236-46

Informacja o tym, że „Badania przedstawione w pracy są częścią prac, opublikowanych na łamach czasopism [...] i rozdziału w książce [...] oraz publikacji wysłanej do recenzji” znajduje się na końcu egzemplarza rozprawy doktorskiej. Nie ma natomiast żadnych odnośników do tych publikacji czy odpowiednich informacji bezpośrednio w sekcjach, dotyczących poszczególnych eksperymentów. Podobnie, zamieszczone w rozdziale 4 wnioski, płynące z pracy, są dosłownym tłumaczeniem sekcji „Conclusions” z ww. publikacjach. Pomimo tego, że udział Doktoranta w zaprezentowanej tematyce jest bez wątpienia znaczący w mojej opinii przyjęta forma pracy doktorskiej powinna mieć również od strony redakcyjnej charakter bardziej twórczy, nie zaś odtwórczy. W związku z tym zastrzeżeniem poprosiłam Doktoranta o załączenie informacji o Jego osobistym wkładzie do ww. publikacji.

W rozprawie doktorskiej mgr Mateusza Kozickiego nie ma jasno sprecyzowanego celu pracy i zadań badawczych, których rozwiązania podejmuje się Doktorant. Wg mnie właśnie to powinno m. in. stanowić treść wprowadzenia, którego świadomie czy też nie, zabrakło w pustym rozdziale 1 zatytułowanym Wstęp. Krótka wzmianka na temat celu pracy znajduje się jedynie w Streszczeniu pracy w języku angielskim „*The aim of the research presented in the PhD thesis includes the*

spectroscopic identification of selected blood cells, and understanding their functions.” Jest to jednak bardzo ogólne stwierdzenie. Biorąc pod uwagę również dość ogólny temat rozprawy, w oparciu o przedstawione rezultaty, można się tylko domyślać, jakie były faktyczne cele pracy.

Przyjęty sposób przedstawienia rozprawy doktorskiej, w znacznym stopniu ściśle bazujący na publikacjach ma jeszcze jeden niekorzystny oddźwięk. Autor pomija przedstawienie/komentarz problemów, które w każdej pracy doświadczalnej trzeba pokonać, a które dałyby realny obraz wkładu Doktoranta w rozwiązanie danego problemu badawczego. Są to zagadnienia związane np. z pozyskaniem materiału badawczego (wytlumaczenie relatywnie małej ilości próbek wykorzystywanych w badaniach), aspekty związane z doбором metod badawczych (dlaczego technika ATR-FTIR była zastosowana tylko w jednym z eksperymentów), optymalizacją warunków pomiarowych. Wg mnie więcej miejsca należało poświęcić również zagadnieniom samej analizy danych poczynszyszy od analizy spektralnej poprzez wielowymiarowe metody analizy danych. Przedstawione w ten sposób wyniki badań znacznie, jak sądzę, umniejszają realnemu nakładowi pracy, który towarzyszy zwłaszcza doświadczalnym pracom interdyscyplinarnym i pozostawia wrażenie jakby cały aparat badawczy był już dobrze ugruntowany, a w ramach pracy włączano do badań jedynie próbki krwi z taką czy inną infekcją. Jak wiem (co również zostało potwierdzone w oświadczeniu, które uzyskałam od Autora), realizacja takiej tematyki badawczej jest znacznie bardziej skomplikowana i wymaga od młodego naukowca pokonania wielu problemów towarzyszących pracy doświadczalnej i opanowania narzędzi, które pozwalają na wyciągnięcie odpowiednich wniosków.

W mojej opinii, w pracy zabrakło również przedstawienia tematyki, realizowanej w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, na tle aktualnych doniesień literaturowych, odnoszących się ściśle do poruszanych w niej problemów. Jedynie w rozdziale dotyczącym aktywacji neutrofilii znajduje się krótka wzmianka o tym, co zostało już zrobione przez innych badaczy w tym zakresie. Autor korzysta ze źródeł literaturowych w części doświadczalnej, ale głównie dla celów interpretacji uzyskanych obserwacji.

Poniżej zamieszczam również szczegółowy wykaz usterek głównie redakcyjnych, mankamentów pojawiających się w tekście pracy oraz informacji, których w mojej opinii w pracy zabrakło:

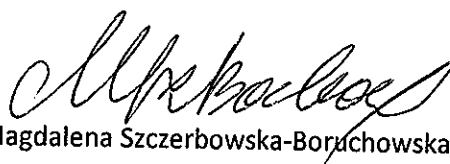
- Na rys. 3 angielskojęzyczne opisy na zamieszczonym schemacie powinny być zastąpione opisami w języku polskim;
- Na rys. 4 brak wyjaśnień (również w tekście) dla fragmentów Fab i Fc
- Kilkakrotne występowanie w tekście pełnej nazwy oraz jej skrótu w nawiasie (np. Analiza składowych głównych (PCA) na str. 94), tymczasem powinno być to zastosowane tylko przy pierwszym przytoczeniu;
- Skrót danej nazwy pojawia się dopiero w kolejnym jej użyciu w tekście nie zaś za pierwszym razem, np. skrót WBC w odniesieniu do krwinek białych pojawia się dopiero na str. 18, podczas gdy po raz pierwszy leukocyty wymienione są na str. 3;
- We wzorze na głębokość penetracji promieniowania IR, na str. 33 brak wyjaśnienia dla „ d_p ”, oraz brak spójności pomiędzy oznaczeniami stosowanymi we wzorze i w wyjaśnieniach.
- Ile próbek krwi zostało przebadane w eksperymencie dotyczącym zdrowych erytrocytów oraz w badaniach starzenia się erytrocytów, również w pomiarach EPR?
- Jaką procedurę/ metodę separacji erytrocytów zastosowano w badaniach?
- Ile erytrocytów z każdej próbki badano?
- Poprawność zdania na str. 37 „Pochodząca od pojedynczych erytrocytów, krew...” budzi moje wątpliwości.

- Czy widma prezentowane w pracy np. te na str. 39 były widmami uśrednionymi np. dla danej grupy, czy są to widma reprezentatywne?
- W zdaniu na str. 38 „Widma ramanowskie były zbierane w ustalonych odstępach czasu na określonym obszarze” należało sprecyzować te informacje.
- Wyniki zaprezentowane na rys. 12 i 13 są mapami pochodzącymi z przykładowej próbki czy uwzględniają już wszystkie próbki wykorzystane w eksperymencie?
- Na rys. 12, 13, 16, 18 brak skali barw;
- Brak spójności w oznaczeniach pasm pomiędzy rysunkiem, tabelą a tekstem (np. dla pasma przy 935 cm^{-1} używane są wartości 933, 935, 936 cm^{-1});
- W tabelach: 5, 8, 10, 13 niepoprawny zapis danych (np. 5.6 ± 0.20) jak również stosowanie w przytaczanych wynikach różnej liczby miejsc znaczących w niepewnościach pomiarowych.
- Jak dokonywano oceny ustania metabolizmu pasożytów (str. 73)? Ile trwa taki proces?
- Jaki rodzaj normalizacji stosowano w analizie widm ramanowskich (m.in. str. 74) oraz ATR-FTIR?
- Na str. 75 brak informacji, o Tabeli 12, w której znajdują się przypisania dla pasm występujących w chlorochinie.
- Na rys. 26 występują różnice pomiędzy kształtem widm uzyskanych w pomiarach a fragmentami widm wykorzystanymi do rozkładu na pasma składowe. Jak podano w tekście zaprezentowane widma są widmami uśrednionymi skąd, więc takie różnice?
- W tabeli 13 zamieszczono porównanie pomiędzy P1f+CQ i P1f. W komentarzu w tekście, na str. 79 i 80 Autor porównuje uzyskane wartości stosunków pasm pomiędzy oksy- i deoksyhemoglobina.
- Na str. 80 pojawia się zdanie: „Obliczone stosunki intensywności są zgodne z obliczeniami przedstawionymi dla nadtonów (Rys. 26 [...]; Tab. 11)”, podczas gdy ani rys. 26 ani tab. 11 nie przedstawiają wyników obliczeń.
- Na str. 81 Autor napisał: „Dla dłuższych linii lasera, jak 568 czy 632.8 nm, intensywność tego pasma spada. Zależność ta jest widoczna na widmach (Rys. 26 i Rys. 27).” Tymczasem, wyniki te nie przedstawiają widm uzyskanych dla różnych długości fal promieniowania.
- W eksperymencie z wykorzystaniem techniki ATR-FTIR brak informacji o liczbie próbek reprezentujących daną grupę. Podana jest tylko informacja, że „W przypadku pomiarów ART-FTIR analizowano 30 losowo pobranych próbek”. Czy analizowana o po 30 dla każdej z grup czy w sumie 30?
- Na str. 85 Autor napisał: „Dla każdej próbki wykonano cztery powtórzenia w celu zapewnienia dokładności i powtarzalności pomiarów”. Wyniki takich właśnie ocen na ile wyniki są powtarzalne, reprezentatywne powinny znaleźć się w pracy analitycznej, skoro już były wykonane. Nie ma w pracy wyjaśnienia jak postępowano z tymi czterema zmierzonymi widmami dla każdej próbki.
- Dlaczego zarówno w widmach ramanowskich jak i ATR-FTIR w próbkach erytrocytów z chlorochiną nie ma obecnych pasm absorpcyjnych pochodzących od tego leku? Widma próbek erytrocytów bez i z chlorochiną są takie same (rys. 26 i rys. 29).
- W podpisie do rys. 34 brak wyjaśnienia, odnoszącego się do wykresów znajdujących się po prawej stronie rysunku. Ponadto w podpisie podany niewłaściwy zakres spektralny $1750 - 150\text{ cm}^{-1}$ zamiast $1800 - 500\text{ cm}^{-1}$.
- Na rys. 36, 37, 39, 40, 41 w panelu C opisy skal są zupełnie nieczytelne.
- Na rys. 38 brak skali barw, przez co wnioski z tej obserwacji zamieszczone np. na str. 102 nie mogą być zweryfikowane. Zakładając jednak, że kolor ciemniejszy odpowiada wartościom najmniejszym, zaskakujące jest, że po niskich wartościach Thr w piątym dniu (B) w wynikach z dnia siódmego poziom Thr jest ponownie większy (C) a potem piętnastego dnia znowu niski (D).

- W eksperymencie dot. aktywacji limfocytów Autor podaje: "Krew pobrana od zdrowych ochotników została porównana z krwią tych samych ochotników podczas przebiegu infekcji wirusowej (grypa)". Jak w praktyce ten zabieg realizowano? Zakładam, że najpierw od osób zainfekowanych została pobierana krew a po pewnym czasie (jakim) po ustąpieniu infekcji pobierano krew jako kontrolną. Nie natomiast w kolejności, którą sugeruje przytoczone zdanie, tzn. najpierw pobierano krew od zdrowej osoby i oczekiwano aż zachoruje na grypę.
- Na rys. 43, 45, 46, 50 przy skali wartości brak jednostek.
- Na str. 118 Autor zamieścił zdanie: „...z powodu rozmiaru plamki lasera, która jest mniejsza niż dla linii 785 nm”. Jak faktycznie były rozmiary ww. „plamek”?
- W eksperymencie dot. aktywacji neutrofilii brak opisu metodyki badań i warunków pomiarowych.
- Na rys. 51 i 52, zgodnie z opisem pod rysunkiem Autor przedstawia wyniki dla pacjenta chorego, raz używając określenia sepsa raz posocznica nie zaś jak podane jest w tekście dla „zdrowego ochotnika (Rys. 51)”.
- We wnioskach na str. 131 niepoprawne zdanie: „Badania wykazały, że pojawia się można potraktować MPO jako marker stanu infekcji bakteryjnej”.

Podsumowując, przedłożona mi do zaopiniowania rozprawa doktorska wraz z wyjaśnieniem dotyczącym udziału Doktoranta w realizowanych pracach, wskazuje na duże umiejętności Autora zarówno w prowadzeniu samodzielnie prac doświadczalnych, stosowaniu zaawansowanych technik analizy danych, jak i interpretacji uzyskiwanych wyników w oparciu o posiadaną wiedzę teoretyczną z dziedziny tematyki badawczej. Dorobek naukowy Doktoranta został upubliczniony w renomowanych czasopismach naukowych i jako rozdział książki, co potwierdza również duże znaczenie problematyki badawczej podjętej przez mgr Mateusza Kozickiego w ramach pracy doktorskiej.

Konkludując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Mateusza Kozickiego pt. "Analiza ramanowska elementów morfotycznych krwi ludzkiej w stanie zdrowia i choroby" spełnia warunki 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 Mateusza Kozickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Magdalena Szczerbowska-Boruchowska