Zakład Biofarmacji
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
ul. Chodźki 4a, 20-093 LUBLIN
http://www.biopharmacy.umlub.pl

Lublin, 31.01.2020

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne mgr Eweliny Matuszyk zatytułowanej ***„Spektroskopia ramanowska w badaniu rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby z wykorzystaniem izolowanych komórek wątroby oraz modeli komórkowych w warunkach in vitro*** " wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej w Zespole Obrazowania Ramanowskiego w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Wątroba stanowi centrum metaboliczne organizmu a jego dysfunkcja prowadzi do poważnych komplikacji zdrowotnych takich jak niealkoholowe stłuszczenie wątroby (ang. nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD). Jest to najczęstsze schorzenie tego organu, ściśle związanym ze stylem życia i niestety ze względu na brak specyficznych objawów na wczesnej fazie choroby jest ono trudne w diagnozie. Dlatego temat podjęty przez Doktorantkę jest tematem aktualnym, wpisuje się w bardzo popularny nurt badań prowadzonych obecnie na świecie, ale jest też tematem niezwykle potrzebnym, biorąc pod uwagę ciągły wzrost zachorowalności na niealkoholowe stłuszczenie wątroby. Do tej pory nie są do końca wyjaśnione mechanizmy rozwoju tej choroby.

W pracy wykorzystano techniki spektroskopowe i mikroskopowe, w szczególności spektroskopię ramanowską, mikroskopię spójnego antystokesowskiego rozpraszania ramanowskiego (CARS, ang. coherent antistokes raman scattering) oraz spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni ATR FT-IR. Jako technikę wiodącą doktorantka zastosowała obrazowanie ramanowskie.

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było zoptymalizowanie procesu pomiaru i analizy w trzech różnych podejściach badawczych problemów dotyczących badań rozwoju niealkoholowego stłuszczenia wątroby. W tym celu doktorantka zastosowała dwa modele badawcze *in vitro* oraz *in vivo* a badania podzieliła na trzy etapy. Model *in vitro* polegał na analizie komórek wątroby LSEC oraz hepatocytów pochodzących z linii komórkowych indukowany kwasami tłuszczowymi związanymi z dietą wysokotłuszczową. Model *in vivo* to model zwierzęcy oparty o dietę wysokotłuszczową, której stosowanie prowadziło do wykształcenia NAFLD i skupiono się na badaniu izolowanych komórek wątroby. Trzecim etapem pracy było opracowanie metody do szybkiej oceny stopnia stłuszczenia wątroby w mysim modelu NAFLD, na podstawie pomiaru pojedynczych widm ramanowskich i absorpcyjnych w podczerwieni zliofilizowanej tkanki wątroby.

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Tekst obejmuje 117 stron i składa się z następujących części: Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp teoretyczny, Cel pracy, Część Doświadczalna, Wyniki i Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski końcowe, Piśmiennictwo, Wykaz Prac naukowych. Dysertacja zawiera 45 rycin i 4 tabele.

We **Wstępie Teoretycznym** Autorka przedstawia budowę i funkcję wątroby, śródbłonka, typy modeli zwierzęcych oraz komórkowych. Opisała zastosowane techniki badawcze, a także przedstawiała aktualny stan wiedzy. Całość stanowi dobrze opracowane wprowadzenie do tematu dysertacji to ogółem 28 stron tekstu oraz 13 rycin.

Streszczenie i cel pracy są moim zdaniem jasno sformułowane.

Część doświadczalna liczy 9 stron i zawiera dokładny opis przygotowania materiału do badań zarówno pozyskanego dzięki badaniom *in vivo* a także *in vitro*. Doktorantka podkreśla ze samodzielnie przygotowywała materiał do badań *in vitro*. Opisuje sposób wykonywania obrazowania ramanowskiego oraz o badaniach techniką CARS, które wykonywane były w Niemczech w Jenie. Doktorantka szczegółowo opisuje zastosowaną aparaturę.

Część pracy dotycząca **wyników i ich dyskusji** zawarta jest na 47 stronach. Dotyczy ona trzech etapów badań – pierwszy to Heterogeniczność komórek śródbłonka badana spektroskopią ramanowską. Wykonano półilościową analizę różnic spektralnych pomiędzy komórkami śródbłonka linii EA.hy926, HAoEC oraz HMEC-1. Stosunki intensywności integralnych pasm I_{2850} /I_{2937} (lipidy/białka), I_{786} /I_{1005} (DNA/fenyloalanina) i I_{1450} /I_{1005} (lipidy+białka/fenyloalanina) wyznaczone dla uśrednionych widm z obszaru całej komórki, jądra komórkowego i cytoplazmy oraz I_{1656} /I_{1445} (lipidy nienasycone/lipidy nasycone) dla kropli lipidowych.

Drugi etap badań dotyczy analizy modeli komórkowych stłuszczenia wątroby. Duża część badan poświęcona jest analizie metabolicznej oraz analizie zmian chemicznych w kroplach lipidowych komórek LSEC w trakcie rozwoju NAFLD. W celu analizy procesów metabolicznych kluczowa okazała się analiza zmian stopnia nienasycenia oraz powierzchni kropli lipidowych.

Trzeci etap badań zawiera opracowanie metody spektroskopowej do oceny stopnia stłuszczenia wątroby. Badania dotyczą analizy pojedynczych widm połączonych z analizą matematyczną PLS (ang. partial least squares), a także metody referencyjnej w postaci barwienia histologicznego ORO (ang. Oil red O).

Część pracy dotycząca **Podsumowania i wniosków końcowych** jest zawarta na trzech stronach. Autorka wykazała, że rozwojowi NAFLD towarzyszą zmiany chemiczne w komórkach wątroby związane są ze wzrostem stopnia nienasycenia kropli lipidowych oraz dodatkowo w przypadku komórek LSEC zmiany obejmują również kwasy nukleinowe. Dlatego kluczowa w tych badaniach okazała się analiza widm ramanowskich komórek wątroby w zakresie: 1310-1255 cm^{-1} (lipidy nienasycone i nasycone) oraz 810-770 cm^{-1} (kwasy nukleinowe).

W drugim etapie badań Autorka wykazała, że kwasy tłuszczowe po wniknięciu do w komórek śródbłonka zatok wątroby i hepatocytów ulegają desaturacji oraz akumulacji w kroplach lipidowych, skąd są pobierane i metabolizowane.

W trzecim etapie badań Doktorantka dowiodła, że pojedynczy pomiar ramanowski lub w podczerwieni pozwala na ilościową analizę stłuszczenia wątroby na podstawie zbudowanego modelu PLS.

Recenzowana dysertacja mgr Eweliny Matuszyk została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest bardzo przejrzyście opracowana graficznie. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 143 pozycji, w przeważającej części pochodzi z ostatnich lat jest wykorzystane i zacytowane właściwie. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Obowiązkiem recenzenta jest także krytyczny komentarz ocenianej pracy. Trudne jest to zadanie, kiedy na cykl składa się 5 bardzo dobrze opublikowanych prac, które już przeszły proces recenzji. Prace doktorantki Pani mgr Eweliny Matuszyk opublikowane są z poprzednim nazwiskiem - Szafraniec. Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka pytań:

- Jednym z etapów badań było opracowanie szybkiej i prostej oceny ilościowej akumulacji lipidów w tkankach wątroby na podstawie pojedynczych widm. Równie ważny aspekt badań to analiza lipidów w tkankach. Czy doktorantka rozważała zastosowanie innej techniki do analizy i obrazowania dystrybucji lipidów w tkance np. za pomocą techniki obrazowania spektrometrii mas MALDI MSI (ang. MSI, Mass Spectrometry Imaging)? Moim zdaniem zastosowanie tej techniki mogłoby służyć jako dodatkowa metoda analityczna, zwłaszcza do oceny przemian metabolicznych i śledzenia zmian lipidowych.

- Ocena dorobku mgr Eweliny Matuszyk była utrudniona ponieważ nie było przedstawione CV doktorantki. Dobrze byłoby wiedzieć czy doktorantka brała udział w konferencjach międzynarodowych, czy wygłaszała komunikaty ustne czy prezentowała tylko postery. Brakuje też informacji czy doktorantka brała udział w stażach zagranicznych.
Taka informacja byłaby bardzo przydatna zwłaszcza, że praca opublikowana w *Journal of Biophotonics, 2019* (dotycząca analizy kropli lipidowych) jest wykonana przy współpracy z Uniwersytetem we Francji „Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France" oraz "BioSpecT – BioSpectroscopie Translationnelle, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France". W przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej nie jest wspomniane, która dokładnie część badań czy analiz była wykonywana w Polsce, a która we Francji. Doktorantka jest pierwszym autorem w/w publikacji i zaznacza w dysertacji, że głównie zajmowała się analizą spektroskopową badanego materiału oraz badaniami *in vitro* ale dobrze byłoby zaznaczyć również jaki jest wkład autorów zagranicznych?

-Podobnie jest w części doświadczalnej dysertacji - doktorantka wspomina o wykonywaniu badań techniką CARS w Jenie w grupie prof. Jürgena Poppa ale nie wskazując czy wykonywała je osobiście?

Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka popełniła kilka błędów edytorskich, co oczywiście jest nieuniknione i w żaden sposób nie wpływa na wartość pracy, ale z obowiązku recenzenta przytaczam przykład poniżej:

strona 62 w tekście jest „Pasmo to jest przypisane do drgań fosfodiestrowych (-O-P-O-) w strukturze RNA i pozwala na analizę dystrybucji jego dystrybucji w komórkach tej linii. [111,117]„ gdzie powtórzenie słowa „dystrybucji" wprowadza czytelnika w konsternację.

Wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Pani mgr Ewelina Matuszyk skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnie realizowała badania naukowe. Wykazała dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafi podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Na koniec podkreślić chciałam całokształt pracy Doktorantki. Oprócz dorobku (jeden rozdział w książce oraz 4 prace o łącznym IF 17.334) przedstawionego do oceny w ramach realizacji pracy doktorskiej Pani mgr Ewelina Matuszyk jest współautorem również 5 innych prac. Podsumowując jej całkowity dorobek naukowy to 1 rozdział w książce oraz 9 prac dających sumaryczny IF 33,266. Prowadzone badania finansowane były w ramach czterech projektów naukowych (Symfonia NCN, Harmonia NCN, Preludium NCN, Etiuda NCN) oraz wsparcia stypendialnego KNOW.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z dn. 14 marca 2003 r. z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie **wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Eweliny Matuszyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie ze względu na zaangażowanie w pracę badawczą Doktorantki, wysoką wartość uzyskanych wyników oraz spełnienie wymagań zgodnych z regułami Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pragnę rekomendować niniejszą rozprawę doktorską **do wyróżnienia.**

z poważaniem

ASBartnicka

dr hab. n farm. Anna Sroka-Bartnicka