

Dr hab. Agnieszka Michota-Kamińska
Instytut Chemii Fizycznej
Polska Akademia Nauk
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Warszawa, 08.08.2017

**Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej:
„Spektroskopowe badania mózgu w zaburzeniach neurologicznych”
mgr inż. Julii Sacharz**

Praca doktorska Pani mgr inż. Julii Sacharz została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Aleksandry Weseluchy–Birczyńskiej, prof. UJ na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z Prof. Baydenem Wood'em z Center for Biospectroscopy, School of Chemistry, Monash University, Melbourne w Australii, a także z pracownikami Zakładu Kryminalistyki Instytutu Ekspertyz Sądowych im. Prof. Dra Jana Sehna w Krakowie i pracownikami Zakładu Neurofizjologii i Chronobiologii Wydziału Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Celowość podjętych badań.

Tematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Julii Sacharz wpisuje się w nurt nowatorskich badań dotyczących wykorzystania metod spektroskopowych w analizie układów biologicznych. Obecnie, zarówno spektroskopia ramanowska jak i spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni są metodami coraz szerzej stosowanymi w badaniach biomedycznych i analitycznych. W swojej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Julia Sacharz wykorzystuje te dwie techniki spektroskopii oscylacyjnej do analizy wybranych struktur mózgowia, które wydają się być odpowiedzialne za wystąpienie pewnych zaburzeń układu nerwowego tj. chorób neurodegeneracyjnych. Obie techniki należą do czułych i nieinwazyjnych metod diagnostycznych, które pozwalają uzyskać informacje na temat badanych układów (komórek, tkanek) na poziomie molekularnym dając możliwość monitorowania mechanizmu chorób. W pracy poddane zostały analizie dwie wybrane choroby związane z dysfunkcją układu nerwowego – epilepsja i stwardnienie rozsiane, które są obecnie jednymi z najpoważniejszych problemów zdrowotnych a liczba chorych ciągle wzrasta. Dodatkowo, mechanizm większości chorób neurodegeneracyjnych nie jest poznany, badania tkanki mózgowej są trudne zarówno ze względu na jej delikatną strukturę jak i ograniczoną dostępność a stosowane do ich analizy metody badawcze tj. biochemiczne, tomografia komputerowa czy rezonans magnetyczny mają też swoje wady i ograniczenia jak chociażby konieczność integracji w strukturę próbki czy też cenę a co za tym idzie dostępność badania. Dlatego też niezwykle istotne jest poszukiwanie i opracowywanie nowych metod pozwalających na diagnozowanie i monitorowanie chorób układu nerwowego.

Kompozycja i zawartość merytoryczna pracy.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Julii Sacharz napisana jest zgodnie z zasadami przyjętym dla prac w dziedzinie nauk przyrodniczych. Praca liczy 105 stron, zawiera 30 rycin, 4 wykresy, 12 tabel. W bibliografii Autorka przytoczyła 130 pozycji literaturowych, na które składają się głównie artykuły zamieszczane w fachowych czasopismach z Listy Filadelfijskiej oraz 12 odnośników do stron internetowych. Struktura pracy jest logiczna i przejrzysta. Rozprawa doktorska rozpoczyna się krótkim, liczącym 15 stron Wstępem, w którym Pani mgr inż. Julia Sacharz przedstawia charakterystykę obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego ssaków z wyraźnym naciskiem na analizę struktury i chemii mózgu ssaków. W tym rozdziale, kolejno Autorka płynnie przeprowadza czytelnika w tematykę chorób układu nerwowego, zwłaszcza chorób neurodegeneracyjnych takich jak epilepsja i stwardnienie rozsiane z podkreśleniem mechanizmów ich powstawania i opisem zarówno stosowanych metod ich leczenia jak i perspektyw dotyczących ich diagnozowania. W końcowym rozdziale Wstępu Autorka przedstawiła główny cel i szczegółowe cele badawcze, które podjęła się rozwiązać w trakcie wykonywania pracy doktorskiej.

W rozdziale drugim zatytułowanym: „Charakterystyka metod badawczych” Pani mgr inż. Julia Sacharz przedstawiła podstawy spektroskopii Ramana i spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni IR – technik oscylacyjnych wykorzystywanych przez Autorkę w swoich badaniach. Rozdział ten kończy się krótkim przeglądem zastosowań tych dwóch metod badawczych w diagnostyce mózgu i chorób neurodegeneracyjnych. Czytając ten rozdział czuje pewien niedosyt informacji. Autorka podaje odnośniki aż do 31 artykułów naukowych ale ich dyskusja jest przedstawiona na niespełna dwóch stronach co nie daje mi pełnego obrazu możliwości badawczych i aplikacyjnych technik oscylacyjnych w badaniach zaburzeń neurologicznych. W rozdziale trzecim zatytułowanym: ”Charakterystyka badań i metod obliczeniowych” Autorka opisuje techniki wykorzystywane do analizy uzyskanych danych spektralnych w badaniu epilepsji i stwardnienia rozsianego tj. metodę analizy głównych składowych PCA (ang. Principal Component Analysis) i dwuwymiarową spektroskopię korelacyjną (2D-COS). Technika PCA była wykorzystywana do analizy statystycznej widm ramanowskich tkanek mózgowia zdrowych i epileptycznych osobników szczurów oraz w badaniach stopnia demielinizacji warstwy molekularnej tkanki mózdzku ze stwardnieniem rozsianym. Osobiście uważam, że dla czytelnika, który nie jest zaznajomiony z ideą tej metody, jej opis powinien być przedstawiony bardziej wyczerpująco, aby czytelnik mógł łatwo zrozumieć i zinterpretować uzyskane przy pomocy tej techniki wyniki. Do dogłębnej analizy danych spektralnych, w funkcji długości linii promieniowania wzbudzającego, badanych struktur mózgowia szczura zdrowego i epileptycznego Autorka wykorzystwała z dużym powodzeniem technikę 2D-COS, której idea została przedstawiona zrozumiale i wyczerpująco.

Część doświadczalna pracy rozpoczyna się od charakterystyki przedmiotu badań pracy doktorskiej czyli modeli zwierzęcych stosowanych w badaniach epilepsji i modelu mózdku ludzkiego wykorzystywanego w badaniach stwardnienia rozsianego. Na uwagę zasługuje dokładny opis sposobu przygotowania próbek tkanek mózgowia do badań spektroskopowych ze zwróceniem uwagi na zachowanie zasad dobrej praktyki klinicznej (GCP) czy zasad etycznych w eksperymencie medycznym z udziałem ludzi (Deklaracja Helsińska). W opisie parametrów pomiarowych stosowanych do eksperymentów metodą spektroskopii ramanowskiej zabrakło mi jedynie wskazania wartości mocy stosowanych do wzbudzeń wiązek laserowych.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały przedstawione i przedyskutowane w bardzo dogłębny i metodyczny sposób w kolejnym rozdziale, który stanowi kluczową część pracy.

Badania molekularnego mechanizmu epilepsji były prowadzone z wykorzystaniem modeli zwierzęcych tj. szczepu szczurów WAG/Rij reprezentującego grupę epileptyczną i szczepu Wistar reprezentującego grupę kontrolną (zdrową). Dla każdego ze szczepów badania obejmowały trzy obszary mózgu: DLG (grzbietowa część ciała kolankowego bocznego wzgórza), Sc (kora somatosensoryczna) oraz Cc (kora mózdku). Przy czym należy podkreślić, że w przypadku epilepsji analizę przeprowadzono na nowatorsko przygotowanych nieutrwalonych tkankach mózgowia utrzymywanych w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym. Część pracy obejmująca badania stwardnienia rozsianego była wykonywana na odpowiednio spreparowanej w parafinie próbce mózdku ludzkiego. Eksperymenty obejmowały analizę czterech różnych struktur kory mózdku tj. istotę białą, warstwę ziarnistą i molekularną oraz obszary z wyraźną demielinizacją warstwy molekularnej.

Oto kilka przykładów obrazujących klarowność i logikę zaprojektowanych i przeprowadzonych eksperymentów. Widma ramanowskie badanych struktur mózgu (tj. Sc, DLG, Cc) w przypadku tkanek ze stwierdzoną epilepsją i zdrowych zostały zmierzone przy czterech długościach fali lasera 442 nm , 514.5 nm , 785 nm oraz 1064 nm w zakresie spektralnym od 1000-3050 cm^{-1} i bardzo szczegółowo przeanalizowane (przypisanie pasm odpowiednim elementom tkanki mózgowej, ich charakterystyka i porównanie w stanie zdrowia i choroby, analiza fluorescencji w widmie Ramana pomiędzy tkankami rakowymi i nie rakowymi jako markera stanu zapalnego czy określenie procentowej zawartości drugorzędowej konformacji białek grupy epileptycznej i zdrowej dla wszystkich analizowanych struktur mózgu). W celu poprawienia czułości rozróżnienia próbek mózgu zdrowego (WISTAR) a epileptycznego (WAG/RJ) przeprowadzono analizę głównych składowych PCA. Zaprezentowane wyniki analizy potwierdziły różnorodność poszczególnych badanych struktur mózgu, które wizualnie były widoczne jedynie jako niezmiernie subtelne zmiany w intensywnościach pewnych pasm. Analiza metodą dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej pozwoliła na dalszą, dogłębną charakterystykę badanych struktur mózgu. Z przeprowadzonych przez Autorkę badan wynika, że analizowana dysfunkcja mózgu,

epilepsja, angażuje w swoim przebiegu cały układ nerwowy, zmieniając skład chemiczny mózgu poprzez procesy degradujące struktury białek i lipidów. Ostatni rozdział pracy doktorskiej opisuje wyniki obrazowania spektroskopowego IR w badaniu stwardnienia rozsianego. Analiza skupień (klastrowa) i analiza PCA wykazały istotne różnice w widmach dla dwóch badanych obszarów warstwy molekularnej różniących się stopniem demielinizacji komórek nerwowych. To tylko kilka przykładów obrazujących logiczność i zasadność prowadzonych przez Autorkę badań. Cała dyskusja otrzymanych wyników jest rzetelna, przekonująca i wyczerpująca a wyciągnięte wnioski prawidłowe.

Na pochwałę zasługuje ostatni rozdział pracy, w którym Autorka bardzo przejrzysto i wyczerpująco podsumowuje i streszcza swoje wyniki.

Osiągnięcia pracy i realizacja zaplanowanych celów badawczych.

Wszystkie eksperymenty dotyczące analizy tkanek mózgowia są niezwykle trudne i wymagają wielkiej staranności ze strony eksperymentatora. Na podstawie przedstawionych badań stwierdzam, że Pani mgr inż. Julia Sacharz osiągnęła zasadniczy cel swoich badań i wykazała potencjał technik oscylacyjnych, które w przyszłości z dużym powodzeniem mogą być wykorzystywane w analizie, diagnozowaniu i monitorowaniu szeregu chorób układu nerwowego.

Uwagi/komentarze.

Wyjaśnienia i dyskusji wymagają następujące kwestie:

- 1) Autorka jako jeden z celów i ostatecznie jedno z głównych osiągnięć wymienia opracowanie nowatorskiej techniki przygotowania tkanki mózgowej szczurów do pomiarów spektroskopowych bez jej utrwalania a jedynie proponuje jej utrzymywanie w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym. Płyn mózgowo-rdzeniowy ma swoje charakterystyczne i dość silne widmo ramanowskie, dlatego też istotnym brakiem jest nie pokazanie w pracy jego widma ramanowskiego, co rozwiałoby moje wątpliwości odnośnie możliwości obecności w prezentowanej widmach tkanek mózgowych pasm pochodzących od płynu mózgowo-rdzeniowego. Podobnie dla przekonania czytelnika o braku interferencji pasm pochodzących od paraformaldehydu, parafiny i formaliny, które były używane do utrwalenia tkanek mózgu ludzkiego, widma te powinny być również zaprezentowane.
- 2) W pracy zabrakło mi wyników przedstawiających powtarzalność rejestrowanych sygnałów dla badanych struktur mózgowych. Jak wynika z załączonych widm ramanowskich różnice spektralne pomiędzy tkankami mózgowymi rakowymi i nie rakowymi są bardzo subtelne, dlatego też praca zyskałaby bardzo na wartości gdyby przedstawiono wartości współczynników korelacji zebranych widm czy chociażby wartości względnych odchyłeń standardowych (RSD; ang. Relative Standard Deviation).
- 3) Biblioteka zebranych widm jako dodatkowy rozdział, z opisem parametrów pomiarów byłby bardzo pomocna w ocenie uzyskanych wyników.

Praca doktorska zredagowana została bardzo starannie. Zamieszczone ryciny, rysunki i tabele są czytelne i opatrzone poprawnymi opisami. Jedyne drobne uchybienie występuje na rycinie 29 gdzie na osi x brak jest wartości, a są one bardzo istotne gdyż wskazują na „siłę zróżnicowania badanej grupy danych”. Z rycinami obrazującymi wyniki PCA mam jeszcze uwagę dotyczącą braku wyjaśnienia w tekście czytelnikowi co oznacza i jaki ma sens tytuł angielski „Loadings” obecny na wszystkich prezentowanych wykresach (tytuł „Scores” na tych samych rycinach został wyjaśniony). Drobna uwaga dotyczy też stwierdzenia na stronie 51: „Tabela 4 przedstawia zestawienie procentowej zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych białek dla obu grup badawczych, epileptycznej i zdrowej”, powinno być „dla obu badanych grup”.

Wymienione uwagi krytyczne nie umniejszają bardzo wysokiej oceny jaką stawiam przedstawionej mi rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Julii Sacharz. Praca przedstawia nowatorskie, a jednocześnie bardzo trudne badania, z których wykonaniem i interpretacją Autorka poradziła sobie bardzo dobrze.

Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona wszystkie formalne wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Zatem, wnoszę wniosek o dopuszczenie mgr inż. Julii Sacharz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Michota-Kamińska



Warszawa, 8 sierpnia 2017 r.