



Wrocław, 5.06.2017

Dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka, prof. UW

Uniwersytet Wrocławski

Wydział Chemii

e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl

Tel: +48713757347

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Emilii Staniszewskiej-Ślęzak

pt. „Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni w diagnostyce cukrzycy i nadciśnienia”

wykonanej w Zespole Obrazowania Ramanowskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

pod kierunkiem Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej i dr hab. Kamilli Małek

Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni, w tym FTIR, jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną biospektroskopii i znajduje szerokie zastosowanie jako narzędzie badawcze w analizie układów biologicznych. Technika ta pozwala charakteryzować struktury kluczowych biomolekuł, m.in. białek, kwasów nukleinowych, cukrów i lipidów, a w kontekście diagnostyki klinicznej znalazła zastosowanie do bardziej skomplikowanych układów biologicznych, takich jak osocze czy surowica krwi. Dla danej próbki biologicznej, widmo spektroskopowe jest charakterystycznym, unikatowym ‘odciskiem biochemicznym’ (ang. *fingerprint*) wszystkich jej molekularnych składników i może zostać wykorzystane do jednoznacznej identyfikacji jednego lub wielu związków lub ich subtelných zmian. Istnieje wiele doniesień naukowych wskazujących identyfikację specyficznych biomarkerów różnych stanów fizjologicznych i zmian patologicznych w składnikach krwi (głównie osoczu) z wykorzystaniem spektroskopii FTIR. W podobnym nurcie badawczym mieści się praca doktorska Pani mgr Emilii Staniszewskiej-Ślęzak, która w ramach rozprawy podjęła próbę opracowania nowatorskiej metodyki wykorzystującej spektroskopię absorpcyjną w podczerwieni wraz z analizą chemometryczną do szybkiej oceny zmian biochemicznych wybranych składników krwi dla trzech wybranych jednostek chorobowych związanych z dysfunkcją śródbłonna: cukrzycy typu 2, nadciśnienia tętniczego oraz nadciśnienia płucnego.

Biorąc pod uwagę wskazania statystyk, które mówią, że na świecie żyje ponad 1 mld osób z nadciśnieniem, a do 2025 roku liczba ta ma wzrosnąć o kolejne kilkaset mln osób, oraz fakt, że skutki współistniejącego nadciśnienia tętniczego oraz innych metabolicznych czynników ryzyka wzajemnie się wzmacniają prowadząc do wyższego ryzyka sercowo-naczyniowego, tematyka dysertacji jest bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na badania ukierunkowane na rozwój metod analitycznych oraz poszukiwania nowych markerów, szczególnie wykonywanych z krwi. W pracy badano profile spektralne wszystkich składników krwi, z naciskiem na osocze i/lub surowicę, wskazując na różnorodność i unikatowy charakter markerów zmian patologicznych w poszczególnych jednostkach chorobowych. Rozprawa doktorska została wykonana w grupie Profesor Małgorzaty Barańskiej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, która

od wielu lat prowadzi badania nad rozwojem spektroskopowych metod diagnostycznych wybranych chorób cywilizacyjnych.

Rozprawa doktorska mgr Emilii Staniszewskiej-Ślęzak przedstawiona została w formie opracowania (165 stron), w którym przybliżone zostały tezy oraz najważniejsze osiągnięcia rozprawy, uzupełnionego 15 stronicowym aneksem zawierającym dodatkowe widma i wykresy. Doktorantka zamieściła również prace wchodzące w skład rozprawy (3 artykuły naukowe opublikowane w czasopismach z listy JCR, 1 artykuł spoza listy, oraz 1 artykuł będący w trakcie procesu wydawniczego – brak manuskryptu), a także listę publikacji tematycznie niezwiązanych z rozprawą doktorską, których jest współautorką (6 prac oraz 6 rozdziałów w książkach).

W obszernym opracowaniu Doktorantka przedstawiła cel pracy, wstęp teoretyczny, część eksperymentalną, dyskusję wyników oraz wnioski, po których znajduje się bibliografia zawierająca 189 pozycji literaturowych. Podoba mi się sposób prezentacji informacji, który we wstępie wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą chorób związanych z dysfunkcją śródbłonka, oraz składu i zmian biochemicznych krwi jako markerów zmian patologicznych z uwzględnieniem wpływu antykoagulantów. Pokazuje też możliwości oraz ograniczenia stosowanych technik spektroskopowych (transmisyjnej oraz transfleksyjnej FTIR) oraz metod chemometrycznych w oznaczeniach próbek biologicznych, szczególnie rozpoznaniu stanu chorobowego na podstawie składników krwi. W rozdziale poświęconym opisowi eksperymentu Doktorantka w sposób zwięzły scharakteryzowała modele zwierzęce, sposób pobrania materiału biologicznego oraz przygotowania próbek do badań spektroskopowych, a także sposób analizy widm. Dalej Doktorantka w sposób bardzo uporządkowany i klarowny przeprowadza czytelnika przez opis wyników, kompleksowo dyskutując najważniejsze osiągnięcia wynikające z poszczególnych eksperymentów. Ta część opracowania zawiera wiele widm i rysunków (dodatkowo widma oryginalne umieszczone zostały w aneksie) ułatwiających czytelnikowi zrozumienie procesu analizy uzyskanych wyników. Na podstawie przedstawionego opisu można z całą pewnością stwierdzić, iż Doktorantka zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników. W ostatnim rozdziale przewodnika mgr Staniszevska-Ślęzak podsumowała wyniki swoich badań, wskazując potencjał wybranych metod i markerów spektroskopowych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Emilii Staniszewskiej-Ślęzak stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Wykazanie użyteczności spektroskopii FTIR jako narzędzia do biochemicznej charakterystyki oraz wskazania zmian w osoczu zwierzęcych modeli chorobowych związanych z dysfunkcją śródbłonka (cukrzycy, nadciśnienia tętniczego oraz nadciśnienia płucnego), a także monitorowania efektów terapii farmakologicznej;

- Opracowanie metodologii pomiarów osocza ubogopłytkowego oraz surowicy krwi dla zwierzęcych modeli wymienionych wyżej chorób;

- Udokumentowanie różnic w obrazie spektralnym tej samej próbki powstających w zależności od wybranej techniki rejestracji – transmisji i transfleksji; ze względu na niewytłumaczalne przesunięcie pasma amidowego I w widmach rejestrowanych metodą transfleksji zarekomendowano konieczność wykonywania pomiarów składników krwi w trybie transfleksji;

- Wskazanie wpływu antykoagulantów na obraz spektralny składników krwi i znaczenia ich odpowiedniego doboru w planowaniu eksperymentów dla różnych modeli chorobowych; wykluczenie EDTA w prowadzonych badaniach;

- W modelu chorobowym cukrzycy typu 2 potwierdzenie korelacji wyników biochemicznych wskazujących na zmiany ilości wybranych składników z intensywnością ich charakterystycznych pasm w widmach FTIR; wskazanie użyteczności zmiany długości łańcuchów kwasów tłuszczowych, tworzenia się białek fibrylarnych oraz fosforylacji tyrozyny jako istotnych markerów procesu chorobowego, oraz możliwości ich wykorzystania do monitorowania efektów terapii perindoprilem;

- Rozpoznanie na podstawie spektroskopii FTIR wczesnego stanu niedoboru NO, a tym samym wczesnego etapu rozwoju nadciśnienia tętniczego, przy niewielkim tylko wzroście ciśnienia krwi mierzalnym metodą klasyczną; wyróżnienie grup biomolekuł (białek o strukturze α -helisy oraz antyrównoległej β -kartki, białek tyrozylowych oraz lipidów i fosfolipidów), jako potencjalnych markerów subtelnych zmian składu osocza;

- Scharakteryzowanie zmian chemicznych występujących w surowicy oraz osoczu ubogo- i bogatopłytkowym zwierzęcych modeli nadciśnienia płucnego, ze wskazaniem etapów rozwoju choroby; należy zaznaczyć, że są to pierwsze doniesienia pokazujące wykorzystanie spektroskopii FTIR do badania tej patologii i pomimo, że proponowana metodologia nie pozwoliła na wskazanie różnic na skutek terapii sildenafilem, wyniki badań poszerzają dotychczasową wiedzę na jej temat.

- Zestawienie podobieństw i różnic w profilach markerów spektralnych składników krwi w zaawansowanych stanach omawianych modeli chorobowych, co pozwoliło uwidocznić ich różnorodny charakter i czułość proponowanej metodologii.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została dobrze zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w bardzo systematyczny i czytelny sposób. Prawidłowe przygotowanie próbek oraz trafny wybór zastosowanej techniki obrazowania pozwolił na uzyskanie wysokiej czułości analitycznej i obrazowanie zmian na wczesnym etapie rozwoju patologii, co często trudne jest do obserwacji innymi technikami.

Należy podkreślić, że rozprawa doktorska opiera się na wynikach opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu i wysokim współczynniku oddziaływania, jak *Analyst*, *Journal of Biophotonics*, i przedstawione wyniki były już poddane ocenie merytorycznej przez recenzentów poszczególnych artykułów. Poniżej, raczej z ciekawości, wymieniam pytania ogólne pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej i prac:

1. Niektóre badania pokazują, że ponad 80 % osób, u których zdiagnozowano nadciśnienie tętnicze było otyłych, u około 50 % stwierdzono podwyższony poziom całkowitego cholesterolu, a 17 % miało zbyt wysoki poziom cukru we krwi. Czy zatem współlistnienie stanów chorobowych, np. nadciśnienia tętniczego i otyłości wpłynęłoby na zmiany w profilu spektralnym FTIR krwi i czy byłoby to przeszkodą we wskazaniu etapu rozwoju choroby?
2. Jak pokazuje lektura przedstawionej pracy, interpretacja widm spektroskopowych wymaga wnikliwej analizy popartej wielkim doświadczeniem. Czy wobec takich wymagań wstępnych analiza próbek krwi z wykorzystaniem spektroskopii FTIR ma szanse na praktyczne wykorzystanie w laboratoriach analitycznych? Jakie mogą być trudności zastosowania takiego narzędzia diagnostycznego?

Na koniec, z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na jedyny, w mojej ocenie, mankament rozprawy - dużą liczbę błędów językowych oraz tzw. literówek. W języku polskim używa się raczej sformułowania „tworzenie” czy „powstawanie”, a nie „formowanie”, a wyrażenia takie jak „kreatyna”, „małe fragment cytoplazmy”, „uzyskali na wysoką zgodność”, „stanowią szybki i proste narzędzie”, „po jaki czasie”, „z przypasaniem”, czy „w niemniejszej rozprawie” mogły w łatwy sposób zostać wyeliminowane.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a uzyskane z dużą starannością wyniki należy uznać za istotny wkład w opracowanie czułych markerów cukrzycy, nadciśnienia tętniczego oraz nadciśnienia płucnego. Pani mgr Emilia Staniszevska-Ślęzak pokazała, że spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni oferuje wiele potencjalnych korzyści w postaci narzędzi do diagnostyki klinicznej, a możliwość wykrywania subtelnych zmian biochemicznych osocza/surowicy krwi otwiera perspektywę wykorzystania w diagnostyce, i może spowodować wzrost wykrywalności chorób związanych z dysfunkcją śródbłonna na wczesnym etapie ich rozwoju.

Należy podkreślić pokaźny dorobek publikacyjny Doktorantki oraz udział w projektach naukowych. Praca powstała w ramach projektu PRELUDIUM5 finansowanego przez NCN, którego Doktorantka była kierownikiem oraz grantu koordynowanego przez Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków JCET i finansowanego ze środków UE w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego. Pierwsze miejsce Doktorantki na liście autorów wszystkich publikacji wchodzących w skład rozprawy, oraz wielu pozostałych, wyraźnie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w przeprowadzeniu eksperymentów, opisie i interpretacji otrzymanych wyników spektroskopowych.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), i wnoszę do Rady Wydziału Chemii UJ o dopuszczenie Pani mgr Emilii Staniszevskiej-Ślęzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy z uwagi na bardzo ciekawe wyniki i wysoki poziom naukowy prowadzonych badań.

Handwritten signature in black ink, reading "Jerzy Gęsiński-Kocetich". The signature is written in a cursive style with a stylized initial.