



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Szymona Andrzeja Totta
pt. "Obrazowanie ramanowskie w analizie pierwotnych komórek śródbłonka w mysim
modelu niewydolności serca"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Szymona Andrzeja Totta pt. "Obrazowanie ramanowskie w analizie pierwotnych komórek śródbłonka w mysim modelu niewydolności serca" została wykonana w Zespole Obrazowania Ramanowskiego (ZOR), w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej we współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków.

Rozprawa doskonale wpisuje się w tematykę prac badawczych realizowanych w ZOR kierowanym przez prof. dr hab. Małgorzatę Barańską, które charakteryzuje najwyższy poziom merytoryczny i innowacyjność potwierdzone licznymi pracami naukowymi w czasopismach międzynarodowych o najwyższym współczynniku oddziaływania (IF).

Nadrzędnym celem badań podjętych w ramach ocenianej rozprawy była spektroskopowa charakterystyka fenotypu pierwotnych komórek śródbłonka, czyli komórek śródbłonka izolowanych z wybranych organów głównie serca ale również mysiej: wątroby, płuc, aorty, nerek, mózgu, w warunkach *ex vivo*.

Szczególną uwagę poświęcił Autor porównaniu komórek śródbłonka wyizolowanych z serca myszy zdrowych oraz wykazującym niewydolność tego organu. Analiza komórek wątroby, płuc, aorty, nerek, mózgu pozwoliła zaś na weryfikację hipotezy, że niewydolność serca może mieć wpływ na stan śródbłonka innych organów i tym samym całego organizmu. Wyniki badań dla izolatów poszerzono o analizę dla komercyjnie dostępnego modelu mysiego śródbłonka w postaci linii komórkowej H5V.

Szczegółowo, mgr Szymon Andrzej Tott w toku badań eksperymentalnych dokonał analizy spektroskopowej następujących typów komórek: pierwotnych komórek śródbłonka serca (ang. CMEC), komórek nieśródbłonkowych w izolacie komórkowym z tkanki serca, komórek linii H5V – komercyjnie dostępnej linii komórek śródbłonka myszy, pierwotnych komórek śródbłonka myszy izolowanych z serca, płuc i wątroby myszy z rozwiniętą niewydolnością serca, część pomiarów wykonano także dla komórek CMEC poddanych działaniu cytokin prozapalnych.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma postać opracowania składającego się z 15 podrozdziałów. Część Teoretyczna złożona jest z 9 części i poprzedzona jest Streszczeniem w języku polskim oraz rozdziałem Abstract w języku angielskim. Po Części Teoretycznej rozprawy przedstawiona została Część Eksperymentalna złożona z 3 podrozdziałów, po której Autor załączył dział Podsumowanie i Najważniejsze wyniki i wnioski. Rozprawa zawiera także część poświęconą Bibliografii obejmującą 216 pozycji, Wykaz publikacji i wystąpień konferencyjnych Autora, Listę publikacji bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej.

Układ formalny pracy nie budzi żadnych zastrzeżeń, rozprawa zawiera wszystkie elementy niezbędne do zapoznania się, tak recenzenta jak i innych zainteresowanych podjętą tematyką naukowców, ze spektroskopową charakterystyką komórek śródbłonka. Układ pracy jest przejrzysty, a zaproponowana kolejność analizy wyników również ułatwia zapoznanie się z nimi.

Tematyka rozprawy doktorskiej należy do najbardziej aktualnych podejmowanych obecnie w kontekście możliwości stosowania technik obrazowania spektroskopowego, w tym obrazowania Ramana w diagnostyce zmian chorobowych w modelach zwierzęcych czy też diagnostyce chorób

człowieka. Ważkość podjętej tematyki uzasadnia analiza przeprowadzona również przez Doktoranta dotycząca zapadalności ludzi na niewydolność serca.

Przed przystąpieniem do szczegółowej analizy treści rozprawy na uznane zasługuje także fakt, iż w trakcie badań eksperymentalnych Doktorant wykazał się nie tylko znajomością technik obrazowania ramanowskiego, ale analiza spektroskopowa została uzupełniona o pomiary cytometryczne i analizę chemometryczną, tak niezbędną w pracy spektroskopistów zgłębiających biochemię próbek biologicznych.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorant wyciągnął ostatecznie następujące wnioski:

- Techniki obrazowania ramanowskiego pozwalają na wskazanie spektroskopowych markerów niewydolności serca.
- Możliwym jest opracowanie uniwersalnych protokołów pobierania oraz przygotowywania pierwotnych komórek śródbłonka do dalszych analiz, w tym spektroskopowych.
- Przygotowanie izolatów komórek śródbłonka serca (CMEC) pochodzących z myszy młodych ze względu na ich wysoką zdolność do proliferacji i adhezji, jest relatywnie łatwe.
- Czystość izolatów, zweryfikowano na poziomie około 70% i co cenne obrazowanie Ramana okazało się techniką skuteczną w rozróżnianiu komórek śródbłonka od komórek nieśródbłonkowych.
- Charakterystycznym dla komórek śródbłonka badanych przez Doktoranta, i zgodnym z danymi literaturowymi uzyskanymi dla innych pierwotnych komórek śródbłonka, okazał się brak kropli lipidowych, obserwacja ta posłużyła w badaniach Autora rozprawy do rozróżniania komórek śródbłonka od komórek innych typów.
- Spektroskopowa analiza składu kropli lipidowych w komórkach nieśródbłonkowych pozwoliła na przypisanie tych komórek do fibroblastów.
- Przeprowadzone pomiary komórek linii H5V, czyli unieśmiertelnionych komórek śródbłonka pochodzących z serca myszy pozwoliły na stwierdzenie, że krople lipidowe są czynnikiem różnicującym je od komórek pierwotnych CMEC. Ze względu na rolę kropli lipidowych w biochemii komórki wniosek ten jest bardzo cenny w kontekście stosowania komercyjnych linii komórkowych w badaniach naukowych.
- Fenotyp komórek śródbłonka izolowanych z sześciu różnych organów: serca, aorty, wątroby, nerek, mózgu i płuc scharakteryzowany technikami obrazowania Ramana nie wykazywał heterogeniczności pomiędzy analizowanymi populacjami.
- Badania wykonane dla myszy z niewydolnością serca wykazały, że w oparciu o widma Ramana możliwym jest, w większości przypadków, ich odróżnienie od komórek pobranych od myszy zdrowych. W przypadku komórek śródbłonka serca zaobserwowano obniżenie intensywności pasm charakterystycznych dla kwasów tłuszczowych i kwasów nukleinowych. Inny trend odnotowano w przypadku komórek płuc. Widma komórek śródbłonka pochodzące od zwierząt z rozwijającą się niewydolnością serca były zdominowane przez pasma pochodzące od kwasów tłuszczowych. Obserwowany wzrost ilości lipidów został zinterpretowany jako konsekwencja stresu oksydacyjnego wywołanego chorobą. W przypadku komórek pobranych z wątroby nie zaobserwowano wpływu choroby na fenotyp śródbłonka. Wszystkie różnice wyznaczona w oparciu o wyniki Analizy Głównych Składowych – PCA.
- Analiza pierwotnych komórek CMEC w różnej fazie ich rozwoju pozwoliła na obserwację zaniku kropli lipidowych z czasem, którą zinterpretowano jako proces adaptacyjny do środowiska *ex vivo*



- Hodowle komórek CMEC pobranych od myszy z niewydolnością serca wykazały, że biogeneza kropli lipidowych nie występuje do 21 dnia hodowli. Wyniki te zostały potwierdzone metodami fluorescencyjnymi z wykorzystaniem barwnika ORO. Analogiczne wyniki uzyskano dla analizy aorty.
- Biogenezy kropli lipidowych nie obserwowano także dla myszy starszych, 12-miesięcznych. Wyniki te skonfrontowano z wynikami dla tkanek mysich. Wykazano niewielkie podwyższenie ilości lipidów w stosunku do białek, obserwowane zmiany nie były jednak istotne statystycznie.

Przedstawione wyniki badań należy uznać więc za imponujące tak pod względem ich różnorodności, jakości badań eksperymentalnych jak i ich opracowania. Przedstawione opracowania skłaniają jednak do zadania kilku pytań oraz sformułowania kilku sugestii:

1. Na str. 16 Autor opisuje wpływ pierwotnych dysfunkcji śródbłonna na rozwój wielu chorób („*Pierwotna dysfunkcja, leżąca u podstaw genezy wielu chorób, jest już w przypadku niektórych z nich dobrze poznana i opisana w literaturze*”). Fragment ten powinien być już na wstępie opatrzony stosownymi odnośnikami, również wymienienie konkretnych chorób byłoby cenne dla czytelnika.
2. Uzasadniając ważkość podjętej tematyki Autor przedstawił statystyki zapadalności na niewydolność serca na świecie oraz w USA. Czy statystyka ta mogłaby być poszarzona o dane dla Polski, czy też nie są one dostępne?
3. Strona 23, zdanie 2. dotyczące opisu rozpraszania Ramana wymaga, zdaniem recenzenta, przeredagowania.
4. Strona 31 Autor dyskutuje ograniczenia Analizy skupień. Proszę o komentarz dotyczący możliwości wsparcia analizy danych ramanowskich selektywnym barwieniem organelli komórkowych i rejestracją widm fluorescencyjnych.
5. Strona 31 Autor pisze o badaniach „*na całych tkankach*”. Mimo, iż domyślam się co Doktorant miał na myśli, proszę o doprecyzowanie tego sformułowania.
6. Strona 38 Autor przedstawił analizę KMC dla komórki HMCE-a1, Rys. 6. Podpis nie jest opatrzony żadnym numerem odnośnika. Proszę o wyjaśnienie czy jest to wynik własny Doktoranta.
7. Proszę również o doprecyzowanie, czy Doktorant by zaangażowany osobiście w przygotowywanie izolatów komórek z tkanek, jeśli tak w jakim stopniu? Analogiczne pytanie dotyczy analiz cytometrycznych.
8. Strona 46 Doktorant wspomina o pokryciu szkiełek CaF₂ żelatyną przed przystąpieniem do analiz spektroskopowych. Proszę o komentarz w kontekście możliwości wpływu składu podłoża na rejestrowane widma Ramana.
9. Proszę także o komentarz dotyczący mocy wiązki wzbudzającej wykorzystanej w pomiarach ramanowskich. Czy rzeczywiście niezbędnym było stosowanie mocy 35 mW?
10. Strona 47 Doktorant wspomina, że liczba klastrów w analizie KMC wahała się od 3 do 7. Proszę o szerszy komentarz dotyczący tej zmienności.
11. Proszę o poszerzony komentarz dotyczący braku możliwości identyfikacji mitochondriów, których średnica, według niektórych źródeł, wynosi około 2 μm.
12. Proszę o wyjaśnienie dlaczego porównania wyników dla myszy zdrowych i z rozwiniętą niewydolnością serca (Str. 69, 70, 71) obejmują tylko wybrane narządy: serce, płuca, wątrobę.



13. Autor nie ustrzegł się także drobnych błędów stylistycznych, są one zauważalne np. na stronach 17, 23, 28, 34, 35, 39. Jest ich jednak bardzo niewiele na liczącą 121 stron rozprawę.

14. W rozprawie brak podrozdziału 9.1.2., do którego odwołuje się Autor na stronie 50.

Wymienione powyżej uwagi i sugestie w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej ocenie merytorycznej tak pracy doświadczalnej wykonanej przez Doktoranta, jak i przedstawionego w postaci rozprawy ich opracowania. Doktorant wykonał bardzo obszerną pracę doświadczalną, w tym obejmującą analizy izolatów. Rozprawa napisana jest przejrzysto co potwierdza dojrzałą jej koncepcję. Na uznanie zasługuje również szata graficzna pracy, bardzo czytelne i szczegółowo opisane rysunki.

Dorobek Doktoranta obejmuje łącznie 6 publikacji i 1 rozdział w książce. W 2 publikacjach bezpośrednio związanych z tematem rozprawy Pan mgr Szymon Andrzej Tott jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje ukazały się w międzynarodowych czasopiśmie o wysokim IF. Doktorant prezentował wyniki badań również w trakcie konferencji, dokumentując 10 takich aktywności.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa mgra Szymona Andrzeja Totta spełnia warunki 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 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Beata Brożek-Pluska, prof. uczelni

