



dr hab. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM  
Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego  
Wydział Biomedyczny  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin 25.01.2022 r

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Szymona Andrzeja Totta** zatytułowanej „*Obrazowanie ramanowskie w analizie pierwotnych komórek śródbłonna w mysim modelu niewydolności serca*” wykonanej pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej w Zespole Obrazowania Ramanowskiego w Zakładzie Fizyki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi cykl dwóch publikacji z listy filadelfijskiej, opracowane w latach 2018-2021, a ich sumaryczny Impact Factor (IF) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi IF 9,803. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant jest pierwszym autorem w każdym z tych artykułów co wskazuje na Jego wiodącą rolę.

Temat podjęty przez doktoranta wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu dysfunkcji śródbłonna w niewydolności serca. Doktorant przedstawił w ciekawy sposób wady i zalety zastosowania komórek pierwotnych w badaniach spektroskopowych. Ponieważ komórki pierwotne charakteryzują się wysoką niestabilnością fenotypu, protokoły izolacji są skomplikowane i wieloetapowe, a ilość uzyskiwanego materiału jest niska, co znacznie ogranicza możliwości eksperymentalne pojedynczych populacji. Z tego względu, pierwotne komórki śródbłonna nie są powszechnie wykorzystywanym modelem do badań, natomiast rozwijanie metodologii badań z zastosowaniem spektroskopii ramanowskiej jest w pełni potrzebne i uzasadnione.

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie spektroskopowo fenotypu pierwotnych komórek śródbłonna, izolowanych z serca i innych organów myszy, w warunkach *ex vivo*. Doktorant opracował uniwersalny protokół izolacji komórek śródbłonna z poszczególnych organów myszy, wykonał pomiary spektroskopowe, a następnie wykonał analizy chemometryczne, które pozwoliły na wskazanie różnic pomiędzy fenotypem wyizolowanych pierwotnych komórek śródbłonna serca z myszy zdrowych a fenotypem komórek pochodzących z myszy z niewydolnością serca, a także tymi hodowanymi w warunkach *in vitro*. Hipoteza badawcza zakładała zbadanie zależności

między niewydolnością serca a stanem komórek śródbłonka z różnych organów. Dlatego oprócz komórek wyizolowanych z serca zbadano izolaty komórek z wątroby, nerek, mózgu, płuc a także aorty. Takie podejście z zastosowaniem pierwotnych komórek śródbłonka jest unikatowe i nie było dotychczas stosowane.

W części teoretycznej rozprawy doktorant opisuje stan fizjologiczny komórek śródbłonka oraz problemy związane z niewydolnością serca oraz dysfunkcją śródbłonka. Dalszy opis w części teoretycznej jest poświęcony spektroskopii ramanowskiej, oraz analizie danych spektroskopowych za pomocą metod chemometrycznych. Prezentuje zastosowanie metod obrazowania spektroskopowego z podkreśleniem przydatności technik spektroskopii ramanowskiej w badaniach nad poszukiwaniem komórkowych biomarkerów niewydolności serca.

**Część eksperymentalna** oraz metodyka pomiarowa jest szczegółowo zaprezentowana na 5 stronach. Część pracy dotycząca wyników i wniosków jest opisana na 38 stronach.

W pierwszej części badań izolowano komórki śródbłonka serca CMEC oraz z komórek linii H5V. Wszystkie opisane protokoły pomiarowe opracowano optymalizując warunki pozyskania i przygotowania materiału do badań, ilość dostępnego materiału, czas całego eksperymentu, w tym czas pomiaru, oraz charakterystykę otrzymanych izolatów. Pomiar spektroskopowy zostały wykonane zarówno na izolatach komórek CD31 pozytywnych, to jest komórek śródbłonka serca, jak i CD31 negatywnych stanowiących mieszaninę komórek nieśródbłonkowych oraz izolat stanowiący mieszaninę wszystkich komórek budujących ten organ. Czystość otrzymanych izolatów szacuje się na 70 %. Doktorant nie podejmuje dyskusji czy udało mu się osiągnąć wyższą czystość izolatów ani nie komentuje czy optymalizował ten proces.

Z przeprowadzonych analiz obrazów ramanowskich uzyskano informacje o obecności lub braku kropli lipidowych co stanowiło podstawę w rozróżnianiu komórek w uzyskanych izolatach. Następnie protokoły izolacji komórek opracowano z wykorzystaniem komórek pierwotnych z tkanek serca myszy 4- i 12- miesięcznej, modele FVB i myszy Tgaq\*44 jako model rozwoju niewydolności serca. W opisie metodologii brakuje informacji z ilu komórek i w jakich powtórzeniach wykonano pomiary ramanowskie.

Doktorant opisuje proces izolacji komórek posiadające markery komórkowe CD144 i CD31 a następnie analizy ramanowskie. Prezentuje ciekawe zestawienie analiz chemometrycznych opartych metodzie analiza skupień metodą k-średnich KMC oraz analizie głównych składowych PCA, ciekawym zestawieniem byłoby odniesienie się do innych metoda klastrowania. Doktorant poddaje analizie zmiany w pasmach lipidowych głównie porównując dystrybucję lipidów (pasmo  $2852\text{ cm}^{-1}$ ) oraz lipidów nienasyconych ( $3012\text{ cm}^{-1}$ ) można zauważyć, że nie we wszystkich komórkach obecne są lipidy nienasycone. Jako charakterystyczne dla kropli lipidowych wskazuje pasmo  $3015\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające =C-H),  $2932\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające symetryczne C-H w grupach  $-\text{CH}_3$ ),  $2883\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające asymetryczne C-H w grupach  $-\text{CH}_2-$ ),  $2852\text{ cm}^{-1}$  (drgania rozciągające symetryczne C-H w grupach  $-\text{CH}_2-$ ),  $1666\text{ cm}^{-1}$  (drganie rozciągające C=C),  $1445\text{ cm}^{-1}$ ,  $1310\text{ cm}^{-1}$  (drgania zginające grup  $\text{CH}_2$  i  $\text{CH}_3$ ),

1260  $\text{cm}^{-1}$  (drżania zginające grup  $=\text{CH}$ ). Widoczne są także różnice w intensywności pasma 702  $\text{cm}^{-1}$  zależnego od ilości cholesterolu w kroplach.

Istotnym elementem tej rozprawy jest analiza danych i skorelowanie uzyskanych wyników dotyczących pasm lipidowych do obecności pasm białkowych oraz DNA/RNA.

W ciekawy sposób doktorant przedstawił sposób oceny stopnia nienasylenia kwasów tłuszczowych. Został on obliczony jako stosunek integralnej intensywności pasm odpowiadającym drżaniom  $\text{C}=\text{C}$  do  $-\text{CH}_2-$  (pasma 1660  $\text{cm}^{-1}$  oraz 1440  $\text{cm}^{-1}$ ). W celu opracowania krzywej kalibracyjnej zastosowano widma ramanowskie czystych kwasów tłuszczowych w zależności od liczby wiązań podwójnych przypadających na pojedynczą cząsteczkę od stosunku intensywności pasm ramanowskich  $\text{C}=\text{C}/-\text{CH}_2-$ . Na podstawie uzyskanych danych oszacowano średnią ilość wiązań  $\text{C}=\text{C}$  na jedną cząsteczkę lipidu budującą krople lipidowe w kolejnych komórkach.

W przypadku uzyskanych izolatów ze zwierząt chorych i zdrowych na przykładzie komórek śródbłonna płuc również wykazano różnice. Doktorant zidentyfikowany nadmiar lipidów w śródbłonku płuc interpretuje jako wczesną dysfunkcję podczas rozwoju niewydolności serca (strona 73).

**Wnioski końcowe** zostały podsumowanie i przedstawione w punktach.

Doktorant opracował protokoły izolacji komórek a także protokół pomiarowy komórek pierwotnych przyczepionych do podłoża jak i w formie zawiesiny. Wyizolowane z różnych organów pierwotne komórki śródbłonna charakteryzują się podobnym profilem ramanowskim. Dopiero dzięki zastosowaniu analizy chemometrycznej Doktorant wykazał różnice w odpowiedzi na rozwijającą się niewydolność serca w komórkach śródbłonna różnych organów. W przypadku komórek serca obserwowano przede wszystkim wzrost ilości białek oraz spadek ilości tłuszczu w komórkach pochodzących z tkanki myszy chorych. Odwrotną tendencję, to jest wzrost ilości kwasów tłuszczowych, obserwowano w komórkach płuc, zaś w przypadku komórek wątroby nie wykazano istotnych różnic pomiędzy populacjami izolowanymi z myszy zdrowych i chorych. W komórkach CMEC izolowanych z myszy z niewydolnością serca nie obserwowano tworzenia kropli lipidowych.

Natomiast stymulacja komórek pierwotnych czynnikiem TNF-alfa wywołała tworzenie kropli lipidowych wskazującym na obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Na uwagę zasługuje fakt prezentowania przez Doktoranta krytycznych wyników które nie wykazują zmian lub nie są istotne statystycznie. Dotyczy to głównie analizy komórek śródbłonna izolowanych z myszy 12 miesięcznych (Strona 87). Komórki te były niezdolne do biogenezy kropli lipidowych w trakcie hodowli komórkowej, nie wykazywały także różnic pomiędzy populacjami izolowanymi z myszy zdrowych i z niewydolnością serca.

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Tekst obejmuje 121 stron i składa się z następujących części: Streszczenie, Abstrakt, Wykaz skrótów, Część teoretyczna, Cel pracy, Część Eksperymentalna, Wyniki i Dyskusja, Podsumowanie, Najważniejsze wyniki i wnioski, Bibliografia, Wykaz publikacji i osiągnięć autora.

Recenzowana dysertacja Doktoranta została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest przejrzysto opracowana graficznie. Praca zawiera Wykaz skrótów, których Autor prezentuje 28 na 2 stronach maszynopisu. Jest też 1 tabela i 30 rycin. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 216 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.

Niestety, przy redagowaniu pracy Autor popełnił kilka błędów edytorskich, oraz tzw. „literówki” co oczywiście jest nieuniknione i w żaden sposób nie wpływa na wartość pracy, np. str 40, 41.

Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Pan mgr Szymon Tott skutecznie opanował umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazał 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 chciałam podkreślić całokształt pracy Doktoranta. Oprócz dorobku związanego bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej (2 prace o łącznym IF 9,803). Pan mgr Szymon Tott jest współautorem również 4 innych prac oraz 1 rozdziału w książce. Podsumowując jego całkowity dorobek naukowy to 6 prac oraz 1 rozdział w książce. Prowadzone badania finansowane były w ramach projektu naukowego Narodowego Centrum Nauki, projekt Symfonia DEC 2015/16/W/NZ4/00070.

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 **wniosuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Szymona Andrzeja Totta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

KIEROWNIK  
Samodzielnej Pracowni  
Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
*Anna Sroka-Bartnicka*  
dr hab. Anna Sroka-Bartnicka  
Profesor uczelni

dr hab. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM