

Lublin, 26 kwietnia 2018 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Adama Oleszko pt. „Wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej do klinicznych badań lipidów i lipoprotein krwi człowieka”

Postęp w obszarze nowoczesnych technik instrumentalnych wytycza szlak, a nawet warunkuje postęp badań przyrodniczych. Teza ta wydaje się szczególnie wyrazista w przypadku badań biomedycznych oraz w przypadku diagnostyki medycznej. W tych obszarach aktywności naukowo-badawczej oraz medycznej postęp związany z wprowadzaniem nowych metod badawczych nie tylko ułatwia i przyspiesza prowadzenie rutynowych analiz ale stwarza perspektywy rozwoju nowych podejść diagnostycznych i badawczych. Praca doktorska przedstawiona przez pana mgr. inż. Adama Oleszko związana jest z oceną możliwości zastosowania technik spektroskopii oscylacyjnej, zarówno absorpcji w obszarze podczerwieni jak i rozpraszania ramanowskiego, w diagnostyce poziomu lipidów i lipoprotein we krwi człowieka, mających bezpośredni związek z wieloma jednostkami chorobowymi. W świetle powyższych uwag, tematykę rozprawy doktorskiej postrzegam nie tylko jako aktualną oraz interesującą ale również bardzo ważną.

Praca doktorska mgr. inż. Adama Oleszko przygotowana została w Katedrze Inżynierii Biomedycznej na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej,

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



pod kolektywnym kierunkiem pani profesor Małgorzaty Komorowskiej oraz pani dr hab. Jadwigi Hartwich z Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, jako współpromotora, przy udziale pani dr inż. Marleny Gąsior-Głogowskiej, w charakterze promotora pomocniczego. Rozprawa zredagowana została na 117 stronach standardowego maszynopisu, w języku polskim, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Ponadto, w ramach rozprawy Autor zamieścił wykaz dorobku naukowego, życiorys oraz kopie dokumentów związanych z przeprowadzonymi badaniami, jak decyzje Komisji Bioetycznej oraz kopie oryginalnych artykułów opublikowanych w języku angielskim w czasopismach specjalistycznych. Po spisie treści, rozprawę otwiera obszerne, niemalże czterostronicowe streszczenie, które ze względu na zakres podawanych informacji, ale również walory redakcyjne, pełni już niejako rolę wprowadzenia w tematykę pracy doktorskiej. Wymaganiom formalnym zadość czyni fakt zamieszczenia również wersji anglojęzycznej streszczenia (Abstract). Rozdział 1., zatytułowany „Wstęp” zredagowany został w formie monografii przedstawiającej aktualną wiedzę oraz poglądy dotyczące roli lipidów i lipoprotein w metabolizmie człowieka. Przybliżone zostały również techniki eksperymentalne stosowane w izolacji oraz badaniu lipoprotein, stosowane powszechnie w praktyce laboratoryjnej, zarówno tej związanej z prowadzeniem badań naukowych jak i w diagnostyce medycznej. W końcowej części rozdziału wstępnego zamieszczony został również przegląd dotychczasowych prób stosowania spektroskopii oscylacyjnej w badaniach lipidowych oraz lipoproteinowych składników krwi. Cele badawcze stawiane w ramach projektu doktorskiego sformułowane zostały w ramach rozdziału 2. pt. „Cel badań, tezy pracy i zadania badawcze”. Jak domyślać się już można było z lektury poprzednich części rozprawy, naczelnym wyzwaniem jakie stawiał sobie doktorant w ramach swojej pracy było sprawdzenie możliwości zastosowania technik spektroskopii oscylacyjnej w analizach próbek krwi, w kierunku diagnozy popularnych jednostek chorobowych, w szczególności miażdżycy. Rozdział 3. zatytułowany „Metody badawcze”, zawiera zestawienie podstawowych informacji dotyczących szczegółów izolacji i preparatyki lipidów oraz lipoprotein jak i parametrów oraz sposobów rejestracji widm oscylacyjnych, zarówno w wykorzystaniem techniki FTIR jak i rozpraszania Ramana. Poziom precyzji opisów zawartych w ramach tego rozdziału umożliwia w zasadzie pełne odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów. Sugerowałbym może, jedynie, podawanie przyspieszeń w miejsce częstości obrotów w eksperymentach z wirowaniami (np. str. 48), zakładając, że ktoś



dysponować może wirówką o odmiennym rotorze. W tym miejscu swojej oceny chciałbym jeszcze zwrócić uwagę na zastosowanie precyzyjnej metody analizy złożonych widm w oparciu o regresję PLS. Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu doktorskiego zaprezentowane zostały w rozprawie w ramach rozdziału 4. pt. „Wyniki”. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odzwierciedlającą poszczególne zadania badawcze, w tym izolację z osocza krwi ludzkiej lipoprotein z klas LDL, HDL oraz VLDL, wyznaczanie stężenia triglicerydów oraz lipoprotein metodami referencyjnymi oraz na podstawie analiz spektroskopowych. Zarejestrowane widma oscylacyjne wyizolowanych frakcji przedstawione zostały w sposób bardzo przejrzysty oraz poddane szczegółowej analizie, z przypisaniem wszelkich rodzajów drgań poszczególnych zrębów atomowych w formie tabelarycznej. Ważną część rezultatów badawczych stanowią korelacje proponowanych parametrów spektroskopowych ze stężeniami uzyskiwanymi na drodze stosowania powszechnie uznanych metod referencyjnych. Podzielam zdanie Autora, iż jest to najlepsza metoda walidacji zaproponowanych nowych podejść analitycznych, w oparciu o techniki spektroskopii oscylacyjnej. Bardzo interesujące są, moim zdaniem, zrealizowane w ramach rozprawy doktorskiej zadania badawcze dotyczące spektroskopowej analizy produktów degradacji oksydacyjnej wielonienasyconych, lipidowych składników krwi oraz lipoprotein oraz wpływu proporcji składników w układzie: kwas palmitynowy-albumina, na strukturę drugorzędową oraz organizację molekularną białka. Wszystkie uzyskane wyniki poddane zostały wszechstronnej dyskusji w ramach rozdziału 5. zatytułowanego „Dyskusja”. Wnioski wyływające z przeprowadzonej dyskusji zawarte zostały w ramach krótkiego rozdziału 6. pt. „Wnioski” i dodatkowo uwypuklone w jednostronicowym rozdziale „Konkluzje”. Część merytoryczną rozprawy kończy zestawienie cytowanego piśmiennictwa („Literatura”), liczące 207 pozycji, w znacznym stopniu pokrywających bogaty obszar wiedzy w zakresie lipoprotein oraz biospektroskopii białek oraz lipidów.

W pełni podzielam zdanie Doktoranta w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach rozdziału „Konkluzje”. Zdecydowanie, bardzo obiecujący wynik stanowi potwierdzenie możliwości zastosowania spektroskopii FTIR jako medycznej metody diagnostycznej w kierunku wielu jednostek chorobowych, w tym miażdżycy. Wyjątkową wartość stanowią również opracowane szczegółowe procedury, na drodze których diagnostyka



taka mogłaby być prowadzona. Podkreślić należy przy tym stosunkowo niskie koszty zaproponowanych analiz przy ich wysokiej precyzji i poziomie pewności.

Na podkreślenie zasługuje również klarowność języka rozprawy oraz jej stosunkowo wysoki poziom edytorski. Mógłbym zaproponować Autorowi niewiele drobnych korekt. Oto ich krótka lista:

1. Str. 7., 4. wiersz od dołu, zamiast „ultrawierowania próbkach” proponuję „ultrawierowania w próbkach”
2. Str. 22., 12. wiersz od dołu, zamiast „lipoprotein o w zakresie” proponuję „lipoprotein w zakresie”
3. Str. 23., 5. wiersz od dołu, zamiast „również z przy” raczej „również przy”
4. Str. 25., 4. wiersz od dołu, zamiast „mikroskopię elektronową mikroskopii elektronowej” proponuję „niskotemperaturową mikroskopię elektronową”
5. Str. 26., 4. wiersz od góry, zamiast „zmian tych zmian” wystarczy „tych zmian”
6. Str. 36., 1. wiersz od góry, proponuję „ramanowskiej” zamiast „Ramanowskiej”
7. Str. 38. oraz inne, proponuję ujednolicić zapis skrótu techniki: FT-IR albo FTIR
8. Str. 64., wiersz 1. nad rysunkiem, „metodą” zamiast „metoda”
9. Str. 68., wiersz 4. od góry, „Amid I” zamiast „amid I” (początek zdania)
10. Str. 75., 4. wiersz od dołu „parametru” zamiast „parametru parametr”.

Tak wieloaspektowe oraz obszerne opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pana mgr. inż. Adama Oleszko, dostarcza wielu ważnych i nowych informacji pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Interesujące podejście analizy struktury drugorzędowej oraz organizacji molekularnej białek, zaproponowane zostało w rozprawie oraz zobrazowane w ramach Rys. 22, na str. 71. Analiza ta opiera się na ocenie drugiej pochodnej widma absorpcyjnego IR w obszarze spektralnym amid I. O ile położenie minimum drugiej pochodnej jednoznacznie wskazać może na położenie maksimum składowej części pasma absorpcyjnego to nie jestem pewien, czy „głębokość” odpowiednich minimów odzwierciedla ilościowo frakcje tych



form spektralnych. Obawiam się, iż na oceniane ilościowo parametry może mieć wpływ bezpośrednie sąsiedztwo innych form spektralnych. Czy w celu rozwiania tego typu niepewności przeprowadzona była może dekonwolucja bezpośrednich widm absorpcyjnych IR w obszarze amid I?

2. Zastanawiam się również nad skutecznością zastosowania parametru r_2 , wprowadzonego przez Krilova w 2009 r., do monitorowania upakowania lipidów w układach złożonych (Rys. 26, str. 76). Parametr ten, de facto, opiera się na stosunku absorbancji pasm składowych widma, odpowiadających drganiom rozciągającym C-H w grupach CH_2 i CH_3 łańcuchów alkilowych lipidów i w ogromnej mierze zależy od długości tych łańcuchów. O ile w prostych układach, zawierających jeden lipid, na parametr ten może mieć wpływ upakowanie dwuwarstwy to w układach bardziej złożonych, a zdecydowanie w układach naturalnych, r_2 odzwierciedlało będzie, przede wszystkim skład lipidowy (długość łańcuchów alkilowych). Może to jest właśnie związane z interesującym przebiegiem zależności przedstawionej na Rys. 26 oraz z faktem, iż wiele z punktów tej zależności odbiega od zaproponowanej linią przerywaną prawidłowości?
3. Zastanawiam się również stosunkowo większym rozrzutem statystycznym wyników pomiarów uzyskanych z zastosowaniem spektroskopii FTIR, w stosunku do analiz kolorymetrycznych produktów persoksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, Rys. 33, str. 81). Intuicyjnie, spodziewałbym się odwrotnej relacji błędów pomiarowych. Analiza widm IR, zarejestrowanych w obszarze drgań C=O, odpowiadających różnym stężeniom H_2O_2 wydaje się wskazywać, iż nie różnią się one jedynie poziomem absorbancji ale również proporcjami składowych, wskazując na złożoność procesów oksydacyjnych (Rys. 30, str. 80). Ciekaw jestem, czy analiza poziomu widma przy jednej liczbie falowej, np. 1730 cm^{-1} , zamiast integracji całego pasma, prowadzić mogłaby do bardziej zbieżnych wyników?
4. Bardzo interesujący wynik wskazuje na zmianę struktury drugorzędowej albuminy pod wpływem wiązania kwasów tłuszczowych (Rys. 38, str. 97). Czy możliwe jest iż struktura



drugorzędowa białka nie ulega tak znamienym zmianom a jedynie organizacja molekularna białka w obecności lipidów? Na poparcie takiej interpretacji można by przytoczyć fakt pojawiania się struktur typu pseudo- β -kartka, na styku oddziałujących ze sobą fragmentów białkowych. Struktury takie dają wkład do komponentów składowych pasma amid I z maksimum przy ok. 1630 cm^{-1} .

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr inż. Adam Oleszko przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Znaczna część wyników tych badań ogłoszona została już równolegle w trzech artykułach opublikowanych w czasopismach specjalistycznych o międzynarodowym zasięgu. Ponadto, Doktorant jest współautorem dwóch rozdziałów w książce monograficznej oraz jednego patentu.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. inż. Adama Oleszko spełnia w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś wysoka wartość aplikacyjna zaproponowanego podejścia analitycznego, sprawiają, iż rozprawę doktorską postrzegam jako wyróżniającą. Gratulując tak wartościowych rezultatów uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Adama Oleszko do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.