

**Wydział Chemii**  
Zakład Fizyki Chemicznej  
Zespół Obrazowania Ramanowskiego  
[www2.chemia.uj.edu.pl/zor/](http://www2.chemia.uj.edu.pl/zor/)



**Prof. dr hab. Małgorzata Barańska**  
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków  
tel.+48 12 686 2389  
[baranska@chemia.uj.edu.pl](mailto:baranska@chemia.uj.edu.pl)

**Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków**  
Grupa Badawcza Spektroskopii Ramanowskiej  
<http://www.jcet.eu/>

Kraków, 30 kwietnia 2018

### Recenzja pracy doktorskiej

*Wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej  
do klinicznych badań lipidów i lipoprotein krwi człowieka*

wykonanej przez Pana Adama Oleszko pod kierunkiem  
Pani Prof. dr hab. Małgorzaty Komorowskiej  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska  
Dr hab. Jadwigi Hartwich  
Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński  
Dr inż. Marleny Gąsior-Głogowskiej (promotor pomocniczy)  
Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wrocławska

Recenzowana rozprawa dotyczy spektroskopowej analizy lipidów i lipoprotein w krwi w kontekście potencjalnego zastosowania tej metody w klinicznej diagnostyce. Motywacją badań są choroby zespołu metabolicznego charakteryzujące się zaburzoną gospodarką lipidową, której śledzenie jest niezwykle istotne z punktu widzenia leczenia i zapobiegania poważnym powikłaniom takim jak zmiany miażdżycowych, cukrzyca, udar.

Stosowane metody diagnostyczne dyslipidemii opierają się na oznaczaniu stężenia cholesterolu dwóch frakcji lipoprotein: LDL (lipoproteiny małej gęstości) i HDL (lipoproteiny dużej gęstości), zakładając, że ilość cholesterolu jest wykładnikiem ilości frakcji. Błędy oznaczeń są wynikiem niedokładności modelu (formuł i małej liczebności grupy). Zdarza się, że w przypadku dyslipidemii związanej z podwyższonym stężeniem triglicerydów a cholesterolem w normie, klasyczny lipidogram nie daje poprawnego obrazu o chorobie tj. o ilości i zmienionej strukturze lipoprotein. W świetle prowadzonych badań wydaje się, że informacja o ilości VLDL (lipoprotein bardzo małej gęstości) względem triglicerydów może być powiązana z ryzykiem rozwoju choroby sercowo-naczyniowej czy powikłaniami ciężowymi. Stąd wynika motywacja badań

prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy, w doświadczonych zespołach naukowych specjalizujących się w biomedycznych zastosowaniach spektroskopii (p. Prof. dr hab. Małgorzata Komorowska, Politechnika Wroclawska) oraz klinicznych badaniach dyslipidemii (p. Dr hab. Jadwiga Hartwich, Collegium Medicum UJ). Dodatkową opiekę sprawowała p. Dr inż. Marlena Gąsior-Głogowska (Politechnika Wroclawska), która pracowała już w projektach interdyscyplinarnych łączących badania medyczne/diagnostyczne i spektroskopię oscylacyjną. Nie mam wątpliwości, że cel badań i środowisko, w którym praca była realizowana było bardzo dobrze wybrane.

## OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Recenzowana rozprawa napisana jest w języku polskim na 117 stronach maszynopisu, dodatkowo przedstawiono wykaz dorobku naukowego, szereg dokumentów związanych z przebiegiem pracy oraz pełne teksty 3 publikacji Doktoranta z tematyki pracy. Choć układ pracy wydaje się klasyczny (*Streszczenie i Abstrakt, 1. Wstęp, 2. Cel badań tezy pracy i zadania badawcze, 3. Metody badawcze, 4. Wyniki, 5. Dyskusja, 6. Wnioski, Konkluzje, Literatura*) to zawartość niektórych podrozdziałów jest nieco inna niż zwyczajowo. Mam tu na myśli np. *Metody badawcze*, które podzielone zostały ze względu na zadania badawcze realizowane w pracy, a nie *explicite* na stosowane metody. Z jednej strony to może ułatwiać lekturę pracy, ale z drugiej powoduje szereg powtórzeń w opisie stosowanych metod, gdyż pojawiają się one przy wielu zadaniach badawczych. Również cel badań połączony z tezami pracy oraz zdaniem badawczym wydaje się powtarzać te same treści sformułowane innymi słowami przez co trudniej uchwycić najważniejszy cel.

Generalnie, poszczególne rozdziały pracy pokazują motywację, metodologię i efekty prowadzonych badań. *Wstęp* przedstawia pokrótce szereg zagadnień tj. biologiczne znaczenie lipoprotein, kliniczny obraz dyslipidemii, metody izolacji i badań lipoprotein, a także stres oksydacyjny i jego powiązanie z miażdżycą, i w końcu zarys potencjalnych zastosowań diagnostycznych spektroskopii oscylacyjnej. Z tego widać, że jest szereg metod oznaczeń lipoprotein, ale Doktorant poszukuje nowych rozwiązań, które mogłyby być tanie i szybkie, a więc potencjalnie wprowadzone do diagnostyki medycznej. Co do zastosowań klinicznych spektroskopii oscylacyjnej to faktycznie już się takie pojawiają, ale przykłady tu przytoczone chyba nie najlepiej to odzwierciedlają – szereg badań podstawowych o potencjalnym zastosowaniu to jeszcze daleka droga do kliniki, ponadto wiele z przytoczonych tu przykładów dotyczy badań tkanek, choroby nowotworowej, a bardzo nieliczne tylko zagadnień analizy lipoprotein. Faktycznie literatura na te temat nie jest bogata, ale może warto wspomnieć też generalnie o zastosowaniu spektroskopii oscylacyjnej w analizie krwi i jej frakcji. Można powiedzieć więc, że *Wstęp* to właściwie motywacja pracy, przekonująco przedstawiona, ale brakuje szerszego tła literaturowego.



*Cel pracy* to pokazanie potencjału spektroskopii oscylacyjnej w analizie lipoprotein w surowicy krwi. Oprócz innych, pobocznych, też ważnych celów, ten stanowi oś całej pracy. Doktorantowi udało się go zrealizować uprzednio dobrze wyznaczając poszczególne etapy badań.

*Metody badawcze* to spektroskopia oscylacyjna (FT-IR-ATR i FT-Raman) i metody referencyjne oznaczania zawartości triglicerydów, białek, cholesterolu, fosfolipidów we frakcji VLDL oraz spektroskopia UV-vis. Analiza widm opierała się głównie na metodzie PLS pozwalającej na ilościowe oznaczania analitów.

*Wyniki i Dyskusja*, dwa niezależne rozdziały, w tym samym układzie, przedstawiają jakościową ocenę frakcji lipidowej oraz składników surowicy, ilościową analizę TG-VLDL w surowicy krwi, ocenę frakcji VLDL na agregację, wpływ stresu oksydacyjnego na lipidy w osoczu oraz wpływ kwasu palmitynowego na strukturę albuminy. Jako szczególnie interesujące oceniam rozszerzenie badań na zmiany oksydacyjne zachodzące w lipidach osocza w modelu gdzie zwierzęta poddawane były zabiegom hemodializy prowadzącym do aktywacji układu odpornościowego i wydzielania przez neutrofile reaktywnych form tlenu. Jak pokazano, technika FT-IR-ATR wykazuje przydatność do monitorowania uszkodzeń oksydacyjnych lipidów.

Najważniejszym wnioskiem pracy wydaje się pokazanie przydatności techniki ATR-FT-IR w oznaczaniu zawartości TG-VLDL oraz fosfolipidów bezpośrednio w surowicy krwi bez konieczności izolacji frakcji VLDL. Pokazano też, że zwiększona zawartość fosfolipidów zwiększa podatność lipoprotein VLDL na agregację.

Praca jest dobrze zaplanowana, rysunki wykonane są starannie, jednak sporo jest błędów edytorskich (powtórzeń, literówek), których na tym etapie skorygować się nie da, jednak na przyszłość warto poświęcić tej kwestii więcej czasu bo praca zyskuje, lub traci, przez swą edytorską oprawę. Lektura pracy jest interesująca, przystępnie opisano wszystkie zagadnienia, wyniki są dobrze udokumentowane.

## **UWAGI SZEGÓŁOWE**

Kilka pytań i drobnych komentarzy nasunęły się podczas czytania rozprawy, oto niektóre z nich:

1/ Kilka uwag edytorskich podałam już wcześniej. Dodam jeszcze, że różnie oznaczana jest główna technika badawcza stosowana w pracy (FT-IR, FTIR-ATR). Ponadto, w spisie treści jest niespójność pomiędzy punktami 3.1, 4.1. i 5.1 (str. 4). W zasadzie wszystkie dotyczą jakościowej oceny frakcji lipoprotein, tyle, że w *Metodach* podano, że chodzi o osocze, zaś w *Wynikach* i *Dyskusji*, że o surowicę. Z treści wynika, że wszędzie mowa o surowicy.

2/ Na str. 8 w *Streszczeniu* mowa jest o symulacji komputerowej na drodze dynamiki molekularnej. Nie znalazłam jej w pracy; kto ją przeprowadzał i czego dokładnie dotyczyła?

3/ W kilku miejscach pracy, m.in. we *Wnioskach* podano, że spektroskopia oscylacyjna jest przyjazna dla pacjenta, zaś w *Streszczeniu*, że spektroskopia oscylacyjna jest bardziej dostępna niż inne metody, w tym NMR. Myślę, że na uczelni obie metody są dostępne, zaś w klinice jak na razie żadna (chyba, że uwzględnimy MRI). Faktycznie koszty aparatury spektroskopowej FT-IR są niższe, szczególnie jeśli mówimy o prostych spektrometrach, takie jak używane w tej pracy. Ważne jest chyba jednak by pokazać równie dobrą a nawet lepszą skuteczność spektroskopii oscylacyjnej, wyznaczonej przez jej selektywność i swoistość (*specificity and selectivity*). Tej dyskusji w pracy zabrakło. Podobnie, stwierdzenie, że spektroskopia oscylacyjna jest przyjazna dla zastosowań klinicznych jest na razie zbyt optymistyczne (str. 34). Jak na razie praktycznie nie ma takich zastosowań, poza próbami różnych badań w klinikach i poza nimi.

4/ Na Rys. 7 pokazano korelację pomiarów obrazowania ramanowskiego z barwieniem histologicznym H&E. Wg mojej wiedzy intensywny kolor na barwieniu histologicznym koreluje ze zmianami nowotworowymi, a tu pokazano, że jest na odwrót...proszę o komentarz.

5/ Na str. 39, punkt 7, podano, że na widmach ramanowskich będzie prowadzona identyfikacja pasm absorpcji. Pasm ramanowskich nie nazywamy pasmami absorpcji, sądzę, że to pomyłka. W tekście wiele razy pojawia się to określenie np. w nagłówku Tabeli 3, str. 61.

6/ W tabeli 3, str.61, podano przypisanie pasm na widmach FT-IR-ATR i Ramana surowicy krwi (która jak wiadomo składa się z białek, wody i lipidów, co widzimy na Rys.11, str. 60). W tabeli 3, w dolnym zakresie spektralnym w zasadzie pominięto lipidy, choć przypisane zostały do drgań rozciągających  $\text{CH}_3$  i  $\text{CH}_2$ . Na Rys. 11 między Amidem II i Amidem III pojawia się przypisanie  $\nu_s(\text{CH}_3)$ , sądzę, że chodziło o drganie deformacyjne tej grupy.

7/ Zastanawia mnie dlaczego w analizie PLS, rysunki na str.66 i 67, wybrano 7 i 5 czynników odpowiednio dla widm ramanowskich i FT-IR-ATR. Z rysunku 17 wydaje się wynikać, że niski błąd RMSEP osiąga się już przy 3 czynnikach dla widm ramanowskich.

8/ Na str. 71 podano, że pozioma i pionowa linia na wykresie na rys. 23 wskazuje na brak agregacji. Trudno mi dostrzec te linie, uprzejmie proszę o komentarz.



Wymienione tu komentarze i uwagi nie zmieniają oceny pracy - błędy edytorskie są drobnymi pomyłkami, a resztę uwag proszę traktować jako pole do dyskusji podczas obrony.

## PODSUMOWANIE

Rozprawę oceniam wysoko i uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pana Adama Oleszko spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Jest to praca interdyscyplinarna, zastosowane podejście metodyczne jest poprawne i oparte na najnowszej wiedzy. Pokazuje ona, że Doktorant posiadał umiejętności prowadzenia analiz spektroskopowych w kontekście diagnostycznym, w zakresie badań lipidów, ale z potencjałem rozszerzenia tej wiedzy na inne zagadnienia.

Dodatkowo należy podkreślić dorobek publikacyjny Doktoranta. Wg zamieszczonego zestawienia z tematyki pracy opublikował 3 dobre publikacje, jako pierwszy autor (*BioMed Research International, Spectrochimica Acta A, Acta of Bioengineering and Biomechanics*), jest współautorem przyznanego patentu, autorem dwóch rozdziałów w książkach, prezentował wyniki w postaci posterów na wielu konferencjach w Polsce. Dodatkowo jest aktywny w zakresie podnoszenia swych kwalifikacji i wiedzy z zakresu optometrii, której jest specjalistą. Należy dodać, że Studia Doktoranckie i pracę doktorską wykonywał równoległe ze Studiami Podyplomowymi-Optometria, dodatkowo pracując zawodowo.

Podsumowując, uważam, że złożona rozprawa spełnia w pełni wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* oraz w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*, i wnioskuję o dopuszczenie Pana Adama Oleszko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

H. Barański