



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

dr hab. Grzegorz Tylko

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
tel. 12 664 53 36
e-mail: grzegorz.tylko@uj.edu.pl

Kraków, 2016-12-01

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr. inż. Artura Dawida Surówki

pt. „Development of analytical approaches for molecular and fully quantitative elemental micro-imaging of brain tissue with X-ray and infrared radiation”

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Techniki mikroanalityczne są coraz częściej wykorzystywane przez biologów komórki, fizjologów oraz patologów do oceny stanu funkcjonalnego komórek i tkanek a także zmian, które zachodzą w wyniku wpływu różnorodnych czynników wewnętrznych (np. stany zapalne) i zewnętrznych (np. substancje toksyczne, metale ciężkie). Ostatnie lata dostarczają nam metod analitycznych, które z powodzeniem można stosować w hodowlach komórek i tkanek *in vitro*, biopsjach tkankowych pobieranych od pacjentów lub zwierząt laboratoryjnych lub wręcz *in situ*. Te możliwości wynikają z minimalizacji rozmiarów i postępującego wzrostu zdolności rozdzielczych instrumentów, które ze skali mikrometrycznej wnikają powoli w skalę nanometryczną. Już nie tylko komórki i ich otoczenie możemy definiować pod kątem wielu parametrów biologicznie ważnych, ale obserwacje prowadzimy w obrębie cytoplazmy czy jądra komórkowego. Nadal jednak ogromną przeszkodą jest odpowiednie przygotowanie materiału biologicznego do prac doświadczalnych a następnie pomiaru lub obserwacji. Tutaj, zachowanie tzw. stanu „za życia” (*ang.* life-like state), w przypadku analiz biologicznych materiałów utrwalonych, jest kluczem dla uzyskania informacji o stanie funkcjonalnym tkanki, komórki lub jej organelli. Niestety, wiele artykułów pojawiających się nawet w bardzo dobrych czasopismach, obarczone są błędnie zastosowaną metodologią przygotowania żywych obiektów do użytej techniki pomiarowej. Inny problem, dotyczący bardzo często badaczy nauk biologicznych, to „ślepe” wykorzystywanie instrumentów bez zapoznania się z ich możliwościami analitycznymi, artefaktami towarzyszącymi pomiarowi oraz właściwej interpretacji wyników. Zaobserwować można dzisiaj ciekawe zjawisko polegające na wymuszaniu przez producenta instrumentu takiego działania ze strony użytkownika, aby ten opierał się wyłącznie na „wszechwiedzącym” oprogramowaniu. Tutaj, magiczny (najczęściej jeden) przycisk uruchamia pomiar a po chwili dostarcza badaczowi tzw. „dokładny” wynik.

Mgr inż. Artur Surówka wyszedł naprzeciw wspomnianym przeze mnie problemom. Skupił się na optymalizacji pomiarów materiałów biologicznych dwoma technikami spektroskopowymi: rentgenowskiej mikroanalizie fluorescencyjnej (*ang.* Fluorescence X-ray Spectroscopy; XRF) oraz mikrospektroskopii podczerwieni z transformatą Fouriera (*ang.* Fourier Transform Infrared Microspectroscopy; FTIRM). Celem nadrzędnym było korygowanie artefaktów płynących z topografii lub struktury wewnętrznej próbki biologicznej, których obecność znacząco zmienia właściwy tkance/komórce obraz

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

rozmieszczenia i zawartości pierwiastków (XRF) czy odczytanych ilości frakcji białkowo-lipidowych (FTIRM). Ponadto, zastosowanie takich schematów postępowania w trakcie i po analizie materiału, aby przyjęty sposób opracowania otrzymanych widm mógł być dostosowany do typu tkanki i realizowany na licznej ich grupie. Doktorant również bardzo trafnie wybrał metodologię przygotowania tkanek do obserwacji i analiz biochemicznych, polegającą na zamrażaniu próbki i sublimacji zawartego w niej lodu w temperaturach poniżej 0°C (*ang.* freeze-drying). Wpływ tego procesu na ostateczną grubość próbki weryfikował następnie przy pomocy profilometru, aby ustalić rzeczywisty udział struktury i składu materiału na ostateczny wynik pomiaru.

Rozprawa doktorska liczy sobie 204 strony, łącznie ze stroną tytułową i podziękowaniami oraz znajdującymi się na końcu tekstu spisami rycin i tabel. Rozprawa napisana jest w języku angielskim a jedynie streszczenie otwierające pracę w języku polskim. Napisana jest poprawnie, może prócz kilku literówek jakie znalazłem i drobnych uchybień związanych najprawdopodobniej z działaniem skopiuj-wklej i automatycznym korektorem słów (na stronie 119 pojawia się „hipopotamus” zamiast „hippocampus”). Muszę także wspomnieć, że rozprawa doktorska jest pracą naukową i nie powinna zawierać zwrotów, które czyta lub słyszy się na co dzień, np.: get rid of, scale up, to account for i inne.

Autor, na początku rozprawy, przedstawia wykaz artykułów stanowiących pracę doktorską oraz pozostałych, opublikowanych lub będących w recenzji. Muszę podkreślić, iż wykaz ów mile mnie zaskoczył. Wszystkie pozycje dotyczące rozprawy (sześć) zostały opublikowane w liczących się czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, a jedna z nich czeka na recenzję. Oby działania badawcze młodych naukowców kończyły się właśnie taki spisem publikacji przed rozpoczęciem przewodu doktorskiego!

Wreszcie, spis treści otwiera właściwe części rozprawy. Wkradł się tutaj drobny błąd, gdyż lista literatury rozpoczyna się na stronie 170 a nie na 195. Praca została podzielona na pięć dużych rozdziałów, w których każdy zawiera wstęp, opis części eksperymentalnej oraz wyniki dyskutowane w oparciu o dostępną literaturę. Pozycji literatury znajdujemy aż 287, co świadczy o doskonałym przygotowaniu Doktoranta do realizacji postawionych przed nim zadań badawczych. Ta imponująca liczba zawiera w sobie także prace z dziedzin nauk biologicznych, które autor musiał opanować, zrozumieć i odpowiednio przedyskutować na bazie otrzymanych wyników.

Ponadto, rozprawa zawiera 76 rycin, 7 tabel i 144 wzory ilustrujące otrzymane wyniki oraz podstawy teoretyczne zastosowanych technik badawczych.

Część I rozprawy to wstęp ukazujący problemy związane z analizą materiałów biologicznych metodami wybranymi przez Doktoranta, ale i ich możliwości badawcze względem szeroko pojętej tkanki nerwowej. Cele pracy są jasno określone. Ogólnie mówiąc – autor poszukuje skutecznej metodologii korygowania uzyskanych wyników, aby otrzymane dane dokładnie odzwierciedlały stan analizowanych neuronów i ich otoczenia a w konsekwencji, mogły stać się efektywnym narzędziem diagnostycznym zmian zachodzących w tkance nerwowej.

Część II wprowadza czytelnika w teoretyczne podstawy wzbudzenia i emisji promieniowania X oraz jego oddziaływania z materią biologiczną. Autor podejmuje się oceny wpływu grubości analizowanej tkanki nerwowej (konkretnie istoty czarnej) na intensywność emitowanego promieniowania X

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

charakterystycznego dla pierwiastków biologicznie ważnych (tj. P, S, Cl, K, Fe, Cu i Zn). Wskazuje, kiedy można tkankę nerwową, przygotowaną metodami zamrażania-suszenia, traktować jako cienką warstwę, pośredniej grubości lub grubą. Znajomość owych granic pozwala dalej na stosowanie (bądź nie) odpowiednich poprawek na absorpcję promieniowania X. Jest to niezwykle ważny element pracy, który może wskazać kolejnym badaczom kiedy, w jakich warunkach analitycznych i z jakim materiałem powinni rozważać korygowanie otrzymanych wyników.

W tym fragmencie (jak i w kolejnych) unikałbym słowa „sample morphology”. Raczej stosowałbym wyrażenie „sample structure”, gdyż nie tylko zewnętrzna część (morfologia) ma wpływ na mierzone intensywności, ale cała wewnętrzna struktura tkanki również (anatomia)! Opis do wzoru (19) zawiera drobny błąd, gdyż „mass density of the sample” i „sample electron density” są jednakowo oznaczone. Kilka podobnych niedociągnięć można znaleźć w niektórych wzorach oraz ich opisach, ale nie umniejsza to ich wartości dla zrozumienia dalszych treści pracy.

Za niezwykle cenne uważam wykorzystanie pomiarów grubości tkanki nerwowej po procesie mrożenia-suszenia. Autor wskazuje na niemal 80% redukcję grubości tkanki nerwowej suchej względem nominalnie ciętej w formie, jak miemam, uwodnionej-zamrożonej! Chciałbym jednak dowiedzieć się, czy podobny pomiar został wykonany w niskiej temperaturze, właśnie dla skrawków zamrożonych-uwodnionych? Czy grubość nominalna 20 μm , to faktycznie 20 μm ?

Zastosowanie korekcji zmian masy powierzchniowej (g/cm^2) analizowanych materiałów biologicznych na podstawie intensywności rozpraszania Comptona i transmisji promieniowania X charakterystycznego dla serii K_{α} krzemu (Si) wydaje się być trafnym wyborem. Autor wskazuje, że bazowanie wyłącznie na wzorcu zewnętrznym podczas obliczeń ilościowych pierwiastków nie musi być poprawne, jako że sam wzorec może różnić się od materiału eksperymentalnego masą powierzchniową. Zgadzam się z tym, jako że podobny problem istnieje w mikrowiązkowej analizie elektronowej i nie zawsze otrzymane zawartości zgadzają się z wzorcowymi. Toteż biolodzy najczęściej skłaniają się ku metodzie Peak-to-Background (P/B, szczytu emisyjnego do tła), gdzie znosi ona (częściowo) efekty związane z natężeniem wiązki elektronowej, topografią materiału oraz różnicami w jego masie powierzchniowej. Ten sam skutek może dotyczyć użycia intensywności rozpraszania Comptona jako tła. Warunek jednak jest taki, aby swoim składem i topografią próbka nieznana przypominała użyty do obliczenia zawartości pierwiastków wzorec. W jakim zakresie ma ona być podobna do wzorca? Nadal nie wiemy.

Więcej korzyści korekcyjnych powinniśmy mieć z wyznaczonych przez Doktoranta zależności pomiędzy grubością tkanki nerwowej i transmisją promieniowania X dla Si K_{α} . Tutaj bowiem, jeśli tylko wspomniana zależność jest liniowa, a taką przedstawia autor na rycinie 13, to wyznaczenie stopnia absorpcji promieniowania X dla poszczególnych pierwiastków biologicznie ważnych, w określonym punkcie preparatu, powinno dać pewną elastyczność w ocenie zawartości pierwiastka.

Doktorant pokusił się o lokalne zdefiniowanie masy powierzchniowej materiału biologicznego w oparciu o zmiany fazy monochromatycznej i spójnej wiązki promieniowania X transmitowanej przez skrawek tkanki nerwowej (*ang.* X-ray

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Phase Contrast Imaging). Równocześnie, otrzymywał obrazy struktur tkanki, które dokładnie dopasował do obrazów uzyskanych mikroskopią świetlną. Jest to o tyle cenne, że nie zmusza badacza do spekulacji czy aby miejsce analizy jest poszukiwaną strukturą, np. komórką, czy też złożeniem tkanki łącznej, czy wreszcie artefaktem pochodzącym z wadliwego przygotowania materiału biologicznego. Korygowanie map rozmieszczenia pierwiastków biologicznie ważnych w powyższy sposób uwidocznilo znaczące różnice (na obrazach) w intensywnościach rejestrowanych kwantów promieniowania X, szczególnie w przypadku pierwiastków o małej liczbie atomowej (tutaj Cl; rycina 23). Patrząc jednak na mapy rozkładu pierwiastków można być nieco zdezorientowanym, gdyż skale na mapach korygowanych i niekorygowanych różnią się między sobą zakresem (Fe i Cu).

Wreszcie, mgr Artur Surówka wykorzystał połączone obrazowanie tkanki nerwowej (*ang.* Scanning Transmission X-ray Microscopy) z rejestracją dyfrakcji promieniowania X na strukturach o odmiennej masie powierzchniowej (*ang.* Small-Angle X-ray Scattering; SAXS). Jej użycie potwierdziło wcześniejsze obserwacje techniką XPCI o znaczącej różnicy w wartościach tegoż parametru pomiędzy rejonami zajmowanymi przez neurony i wypustki nerwowe. Pomocną była rejestracja dyfrakcji w identyfikacji mniejszych niż neurony obiektów obecnych w tkance i wykluczenie ich komórkowego charakteru. Tutaj, obraz dyfrakcyjny wskazuje na obecność zmineralizowanych struktur, co wspomóżone widmem rentgenowskim umożliwia jakościową ocenę obecnych w nich pierwiastków. Niestety, zabrakło mi takiego posumowania powyższej części pracy, które wskazywałoby na wady i zalety przedstawionych metod korekcyjnych. Która, zdaniem doktoranta, byłaby optymalną metodą dla w pełni ilościowych analiz składu pierwiastkowego materiałów biologicznych?

Część III rozprawy doktorskiej dotyczy wykorzystania spektroskopii oscylacyjnej absorpcyjnej, a konkretnie spektroskopii w podczerwieni połączonej z metodami fourierowskimi. Autor dostarcza czytelnikowi najważniejsze informacje dotyczące oddziaływań promieniowania podczerwonego z materią, zasady działania interferencyjnego spektrometru fourierowskiego oraz sposobów opracowania otrzymanych widm. Przedstawione zostają zagadnienia związane z rozdzielczością metody tak w skali widmowej (rozdzielczość spektralna), jak i przestrzennej obrazu. Jest to o tyle cenne, iż ujawnia mocne i słabe strony metody, co w przypadku materiałów biologicznych ma kolosalne znaczenie dla interpretacji otrzymanych wyników. Jest to widoczne w przedstawionych na stronach 102-103 widmach (rycina 39 i 40), gdzie liczba szczytów absorpcyjnych oraz ich wzajemne położenie nie pozwala w sposób jednoznaczny ich rozdzielić. Trafnym było zatem zastosowanie wzorcowych widm białek przedstawionych w Tabeli 2, wprowadzenie pochodnej widma dla jednoznacznej identyfikacji szczytów absorpcyjnych oraz oceny dopasowania widma eksperymentalnego do widm wzorcowych na podstawie współczynnika korelacji Pearsona (rycina 42). Dzięki temu interpretacja poszczególnych elementów widmowych otrzymała określony poziom ufności, który przy ocenie zmian powinien być brany pod uwagę. Szczególnie dotyczy to frakcji struktur zwrotnych β (β -turns) oraz form nieustrukturyзовanych (random-coils), gdzie wartość współczynnika korelacji jest nieistotna statystycznie.

Zwrócenie uwagi doktoranta na problemy wynikające z natury analizowanego materiału uwidaczniają się podczas omawiania czynników wprowadzających do

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

widm artefakty związane z falą stojącą pola elektrycznego (*ang.* electric field standing wave artifact) oraz rozpraszaniem światła na cząsteczkach sferycznych (tzw. rozpraszanie Mie). Stopień wpływu owych artefaktów przedstawione zostają odpowiednio na rycinach 35-37 a zastosowane z powodzeniem podczas korygowania widm otrzymanych z analiz złogów amyloidowych mózgowia myszy będących modelem choroby Alzheimerera. Autor podejmuje więc skrupulatny przegląd widm FTIRM polegający na korygowaniu tła, ich normalizacji (by pominąć wpływ topografii próbki), aż wreszcie dopasowaniu do wybranych szczytów absorpcyjnych krzywych Lorentza wspomóżonych algorytmem nieliniowym Levenberga-Marquardta. Opracowuje kod, który automatycznie wykonuje powyższe czynności dla otrzymywanych widm. To sprawia, iż wartości netto mierzonych intensywności absorpcji mogą być ekstrahowane z kilkuset widm i porównywane między sobą. Ponadto, doktorant wykorzystuje sztuczne sieci neuronalne, aby otrzymana informacja ze szczytów absorpcyjnych była minimalnie obciążona błędem.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Metodologię dopasowania krzywych do szczytów absorpcyjnych, w formie zautomatyzowanej, wykorzystał doktorant podczas szacowania składników białkowych i lipidowych tkanki nerwowej we wczesnych stadiach rozwijającej się choroby Parkinsona. Tutaj również przedstawił skuteczność procedury normalizacji widm, aby znacząco obniżyć ich zmienność wynikającą z topografii analizowanej tkanki (rycina 43). Ma to o tyle istotne znaczenie, gdyż celem nadrzędnym analiz było ujawnienie subtelnych zmian w drugorzędowych strukturach białek pasma amidu I oraz stopnia nasycenia i nienasycenia lipidów zawartych w paśmie drgań rozciągających CH. Modelem rozwijającej się choroby Parkinsona, były samce szczurów Wistar. Autor postawił tutaj ciekawą hipotezę, bazując na przesłankach o związku fizjologiczno-biochemicznym pomiędzy jądrem ruchowym nerwu błędnego a elementami układu dopaminergicznego mózgu. Założył, że nerw błędny chronicznie stymulowany impulsami elektrycznymi spowoduje zmiany w układzie molekularnym struktur dopaminergicznych, takich jak obszary pola brzusznej nakrywki (*area tegmentalis ventralis*), prążkowiec (*striatum*) wraz z jądrem półleżącym (*nucleus accumbens*) oraz istoty czarnej (*substantia nigra*). W konsekwencji rozpocznie się kumulacja degeneracyjnych zmian ww. obszarów, typowych dla rozwijającego się parkinsonizmu a ich ujawnienie techniką FTIRM może być krokiem do stosunkowo prostego identyfikowania zmian chorobowych w tkance nerwowej. I rzeczywiście, tak udział poszczególnych struktur drugorzędowych białek, jak i stopień nasycenia lipidów okazały się być statystycznie istotne w niektórych miejscach mózgu pomiędzy grupą zwierząt drażnioną impulsami elektrycznymi i grupą kontrolną. Ponadto, niektóre wyniki wskazują niesymetryczność owych zmian, jeśli pod uwagę weźmie się prawą i lewą półkulę mózgu. Nie będę ukrywał, iż prezentowane na stronie 109, 113 i 116 wykresy słupkowe (rycina 44, 47 i 50) są jednak dla mnie mało czytelne. Liczba oznaczeń statystycznie istotnych różnic w obrębie grup eksperymentalnych (drażnione – kontrolne), półkul (lewa – prawa) oraz oznaczenia wzrostu lub obniżenia się wartości analizowanych frakcji lipidowych i białkowych maskują przekaz otrzymanych wyników. Jeśli zmniejsza się jakaś wartość w stosunku do drugiej a obie są zestawione tuż obok siebie, to wprowadzania strzałki w dół nie ma większego sensu. Wystarczy zaznaczyć zmianę istotną statystycznie. Ponadto, jeśli zaprezentowano wyłącznie położenie średniej wartości wraz z jej odchyleniem standardowym/błędem standardowym dla danych z kontroli, to w takiej samej formie powinny być wartości z grupy

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

eksperymentalnej. Tymczasem pojawia się słupek, dodatkowo znaczony odmiennym kolorem, który na pierwszy rzut oka sugeruje obecność jeszcze jednej średniej! Zręcznie byłoby przedstawienie na osobnych wykresach wyników odpowiadających testowanym hipotezom, czyli 1) jakie zmiany spowodowało drażnienie nerwu błędnego oraz 2) jak owe zmiany ujawniają się w półkuli prawej i lewej.

Mam jeszcze jedną uwagę dotyczącą interpretacji wyników jako istotnych statystycznie, kiedy autor rozpatruje zmiany we frakcji struktur zwrotnych β (β -turns) pomiędzy grupami eksperymentalnymi i półkulami. Czy rzeczywiście zasadnym jest analiza tychże, jeśli jakość dopasowania otrzymanych widm do widm białek zawartych w Tabeli 2 jest nieistotna? Nie zgadzam się również ze stosowaniem wyrażenia typu „słaba istotna korelacja” (strona 104). Moim zdaniem albo jest ona statystycznie istotna, albo nie.

Drugim zadaniem badawczym, zbliżonym do poprzedniego, była próba wykazania skuteczności metodologii dopasowywania krzywych do widm absorpcyjnych białek i lipidów otrzymanych ze złogów amyloidowych, obecnych w tkance mózgowia myszy będących modelem choroby Alzheimera. Tutaj również najwyższą skuteczność procedury dopasowywania otrzymano dla frakcji α -helis, następnie β -kartek i form nieustrukturyzowanych. Znowu, frakcja struktur zwrotnych β okazała się nie być skorelowana z widmami wzorcowymi białek.

Efektom powyższych analiz widmowych było przedstawienie w formie mapy rozmieszczenia poszczególnych frakcji drugorzędowych białek w złogach i w ich najbliższym sąsiedztwie. Wyniki wskazują na znaczący udział form β białek w rdzeniu złogu amyloidowego przy nieznacznym udziale form α -helikalnych. Dodatkowa analiza map pokazała, iż wszystkie złogi cechuje bardzo podobna konstrukcja białkowa. Mając do dyspozycji dane spektrometryczne w zakresie absorpcji podczerwieni w paśmie lipidów, Doktorant w bardzo „zgrabny” sposób prezentuje związek pomiędzy strukturami drugorzędowymi białek a formami lipidów w złogach amyloidowych i ich sąsiedztwie. Dzięki temu dowiadujemy się, iż wzrost frakcji β białek pociąga za sobą wzrost form fosfolipidowych/fosfodiestrowych, natomiast znaczące obniżenie się ilości form nienasyconych oraz utlenionych lipidów. Autor wskazuje więc, że złogi nie zawierają lipidów utlenionych a raczej przeważa w nich materiał białkowy. Wyniki są bardzo dojrzałe, ostrożnie interpretowane co w naukach biologicznych jest niezwykle ważne; Autor nie stara się spekulować. Sugeruje natomiast prowadzenie równoległych eksperymentów, pomiarów, barwień histologicznych, aby proponowane w literaturze przesłanki i własne dane właściwie wytłumaczyć.

Muszę jednak skomentować, a raczej zapytać, o dość osobliwy opis ryciny 58 (strona 129). Rycina **b** pokazuje stopień korelacji pomiędzy analizowanymi wartościami ujawniając współczynnik Pearsona $-0,68$ ($p=0,13$). Wartość p sugeruje brak korelacji, podczas gdy w tekście opis wskazuje na jej obecność (strona 128). Rycina **c** zaś odwrotnie – opisana zależność jest uznana za nieistotną statystycznie (strona 129), podczas gdy wartość współczynnika Pearsona wynosi $-0,82$ a $p=0,04$, a więc poniżej poziomu ufności.

Kolejne zagadnienie przedstawione w rozprawie to próba wykorzystania a zarazem testowania metody bazującej na sztucznych sieciach neuronalnych do jeszcze dokładniejszego szacowania ilości poszczególnych frakcji białkowych i lipidowych w tkance nerwowej. Tym razem modelem były glejaki o różnym pochodzeniu i

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

stopniu zaawansowania. Końcowo, rozwikłanie rozkładu poszczególnych struktur drugorzędowych białek w zmienionej tkance mogłoby przyczynić się do szybkiego i efektywnego definiowania typu glejaka a co za tym idzie, odpowiednich dla pacjenta terapii przeciwnowotworowych. Wykorzystanie sztucznych sieci neuronalnych do ekstrakcji udziałów form białkowych okazało się trafnym wyborem. Doktorant wykazał, że z ich pomocą, w oparciu o szereg znanych widm białek (wzorcowych), zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych w materiale eksperymentalnym mogą być znacznie skuteczniej odczytane. W tym przypadku osiągnięto korelacje sięgające wartości 0,96-0,99! pomiędzy udziałami α -helis, β -kartek, struktur zwrotnych β w materiałach wzorcowych i eksperymentalnych.

Odnoszę wrażenie, że właśnie taka metodologia pomogła w sprawnym rozdzieleniu poszczególnych typów nowotworowych na podstawie analizy struktur białkowych drugiego rzędu. Zastosowana przez doktoranta liniowa analiza dyskryminacyjna (LDA) doskonale to uwidoczniła, segregując glejaki pod względem stopnia ich zaawansowania, postaci histopatologicznej oraz pochodzenia – oligodendrytycznego lub astrocytarnego. Cel zatem został osiągnięty!

Wreszcie w części IV przedłożonej rozprawy doktorskiej, odnajdujemy próbę połączenia obu technik analitycznych – mikrospektroskopii podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIRM) i fluorescencyjnej spektroskopii rentgenowskiej (XRF) do szacowania odpowiednio zmian składu lipidowo-białkowego oraz pierwiastkowego w starzejących się mózgach ludzi, a konkretnie zmian w obrębie istoty czarnej, rejonu dopaminergicznego mózgu. Ponownie, Autor skoncentrował się na udziale nasyconych i nienasyconych form lipidów w budowie struktury komórek oraz neuropilu istoty czarnej. Oceniał rozkład procentowy drugorzędowych struktur białkowych w neuronach i neuropilu – α -helis, β -kartek, struktur zwrotnych β i form nieuporządkowanych (nieustrukturuowanych). Ponadto, rozpatrzono zmiany stosunku obu związków biologicznych w ww. częściach istoty czarnej. Pomiary FTIRM wskazują, iż całkowity poziom białek obniża się wraz z wiekiem w komórkach tworzących tkankę pozostając niezmiennym w obszarze neuropilu. Zmiany dotyczą konformacji helikalnych białek (wzrost) na niekorzyść struktur β białek. Konformacje β -zwrotne oraz formy nieuporządkowane zdają się wymieniać pomiędzy komórkami a neuropilem, gdyż ich obniżenie w neuropilu skutkuje wzrostem w neuronach (struktury zwrotne β) lub odwrotnie (formy nieuporządkowane, nieustrukturuwane). Stosunek zawartości lipidów do białek natomiast wskazał na znaczący jego wzrost w komórkach przy obniżeniu jego wartości w obszarach okołokomórkowych. Świadczyć to może o równoczesnej degradacji składników białkowych neuronów oraz lipidowych neuropilu, a więc powolnej degeneracji tkanki.

Pragnę nadmienić, iż ta część rozprawy mile mnie zaskoczyła już na samym początku lektury. Trafnie zwrócono bowiem uwagę, iż materiał otrzymany od zmarłych może być mocno obarczony redystrybucją pierwiastków oraz degradacją białek/lipidów związaną ze zmianami pośmiertnymi. Toteż, oceniono skład pierwiastkowy, lipidowy oraz białkowy *post mortem*, w szerokim przedziale czasowym – od 20 do ponad 90 godzin po śmierci dawców. Brak istotnych zmian wykluczył obserwacje artefaktów wynikających z degradacji/zmiany chemizmu składników budujących tkankę nerwową. Jednak wątpliwości pozostają w stosunku do tzw. jonów pierwiastków „ruchliwych”, swobodnie przemieszczających się pomiędzy błonami komórek martwych, tj. K oraz Cl. Zwykle, zmiany

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

apoptotyczne lub nekrotyczne w komórkach szacuje się technikami mikrowiązkowymi na podstawie stosunku K/Na. Jeśli wartość owego stosunku jest duża, przypuszcza się, iż kondycja metaboliczna komórki jest zrównoważona – komórka jest żywa. Mała wartość K/Na z kolei, to rozpoczęcie procesów programowanej śmierci lub nekrozy komórki. Zmiany w przepuszczalności błon biologicznych wyrównują asymetryczny rozkład jonów K i Na. W przypadku analiz techniką SRXRF, odczyt intensywności promieniowania X charakterystycznego dla Na jest utrudniony, stąd brak danych w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej. Tkanka nerwowa należy do grupy tzw. tkanek wysokopobudliwych, których komórki, zwłaszcza neurony, są niezwykle wrażliwe na braki tlenowe czy węglowodanowe. Śmiem twierdzić, również na podstawie literatury, że zmiana środowiska zewnątrzkomórkowego tuż po ustaniu akcji serca rozpoczyna w ciągu kilkudziesięciu sekund procesy prowadzące do degradacji neuronów. Inne komórki, np. hepatocyty, są w stanie utrzymywać asymetrię błon i ich półprzepuszczalność jonową przez kilkanaście minut a komórki naskórka przez wiele godzin od ustania krążenia.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

Bardzo żałuję, że autor nie pokusił się o wykonanie analiz statystycznych ujawniających różnice pomiędzy płciami w badanej próbie. Nie jest wykluczone, że takie różnice mogą istnieć. Zasadniczo, podczas niemal wszystkich doświadczeń na zwierzętach wybiera się jedną płć reprezentatywną dla charakteru eksperymentu i jego celu. Wcześniej, takie właśnie podejście trafnie zastosowano, wykonując stymulacje nerwu błędnego wyłącznie w obrębie grupy samców. Wyklucza to zmienności wynikające chociażby z cyklu owulacyjnego, gdzie zmiany hormonalne mogą pociągać za sobą zmiany parametrów interesujących badacza. Nic jednak straconego, jak sądzę doktorant ma nadal dostęp do danych źródłowych i wykonanie takiej analizy nie powinno być kłopotliwe.

I może jeszcze drobne dwie uwagi, a mianowicie: w tabeli 5, strona 149 warto umieścić przy MDL (minimum detection limit) jednostkę w jakich jest mierzone. Na stronach 151 i 161 autor niepotrzebnie dyskutuje zmiany, których nie ma pomiędzy grupami, gdyż analiza statystyczna nie wykazała różnic statystycznie istotnych pomiędzy otrzymanymi wynikami.

Część V rozprawy jest zbiorem wniosków jakie płyną z przeprowadzonych pomiarów XRF i FTIRM. Ale jak wspominałem wyżej, warto byłoby wskazać, która z metod korekcyjnych w przypadku XRF i która w przypadku FTIRM daje najlepsze rezultaty odpowiednio, w ilościowej analizie pierwiastków oraz określeniu frakcji struktur drugorzędowych białek i form lipidowych w materiałach pochodzenia biologicznego.

Podsumowując, pomimo kilku drobnych uwag, pytań i komentarzy, rozprawę doktorską Pana mgr. inż. Artura Dawida Surówki oceniam jako bardzo wartościową, szczególnie dla biologów i przyszłych użytkowników powyższych metod. Doktorant włożył wiele trudu w przeprowadzenie ogromnej liczby pomiarów, doświadczeń przy zastosowaniu różnych, dość skomplikowanych metod, wymagających wysublimowanego sprzętu. Ponadto, Doktorant musiał się zapoznać z literaturą z dziedzin biologicznych i medycznych, co nie jest łatwe, jeśli na co dzień nie pracuje się z materiałem biologicznym.

30-387 Kraków

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia 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

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99

oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Wnoszę więc do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr. inż. Artura Dawida Surówki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z całą odpowiedzialnością stawiam wniosek o wyróżnienie przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej.

dr hab. Grzegorz Tylko



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Zakład Biologii

i Obrazowania Komórki

30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 9

tel. 12 664 53 37

fax 12 664 50 99

