

Prof. dr hab. Eugeniusz Rokita  
Zakład Biofizyki  
Collegium Medicum  
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, dn. 6 września 2022 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr Magdaleny Kołodziej pt. „Wykorzystanie technik biomedycznego obrazowania molekularnego w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej”

W ocenianej dysertacji doktorskiej przedstawiono wyniki badań dysplazji oskrzelowo-płucnej, schorzenia bardzo często diagnozowanego u wcześniaków. Eksperyment przeprowadzono na modelu zwierzęcym stosując jako główną metodę badawczą spektroskopię w zakresie podczerwieni. Są to badania o charakterze badań podstawowych. Pozytywnie oceniam podjęcie badań tego zagadnienia. Etiologia dysplazji oskrzelowo-płucnej nie jest, na poziomie molekularnym, w pełni poznana. Automatycznie przekłada się to na skuteczność stosowanych postępowań terapeutycznych.

Rozprawa została przygotowana zgodnie z powszechnie przyjętymi standardami dla dysertacji doktorskich. W rozprawie można wyróżnić kilka wyraźnie oddzielonych części, które zostały uzupełnione streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz bibliografią. Zawarte w dysertacji piśmiennictwo obejmuje prawie 200 pozycji. Dowodzi to rozbudowanych studiów literaturowych przeprowadzonych przez Autorkę.

Pierwsza część dysertacji (rozdziały 1÷3) ma charakter wprowadzający do tematyki rozprawy. Ponieważ praca ma charakter interdyscyplinarny Autorka przedstawia zarówno aspekty medyczne dysplazji oskrzelowo-płucnej jak i podaje kilka bardzo ogólnych informacji o spektroskopii w zakresie podczerwieni. Część medyczna zawiera dane, które są powszechnie znane i łatwo dostępne w różnych źródłach. Z racji stosowanej metody eksperymentalnej, spodziewałem się w tej części pracy przeglądu literatury dotyczącej zmian składu chemicznego na poziomie komórkowym związanych z dysplazją oskrzelowo-płucną, a nie ogólnych informacji wraz z rysem historycznym popartym ponad 100-u pozycjami piśmiennictwa. Podobnie bardzo ogólny jest zamieszczony w części wstępnej dysertacji opis spektroskopii w zakresie podczerwieni. Spektroskopia w zakresie podczerwieni oparta o wykorzystanie transformaty Fouriera, nawet w wersji mikroskopowej,

jest wykorzystywana w wielu działach nauki od kilkudziesięciu lat. Nie jest dla mnie jasny sens podawania w rozprawie elementarnych danych, które powinny być znane każdemu absolwentowi studiów przyrodniczych. W przeprowadzonych eksperymentach Autorka wykorzystwała spektrometr w zakresie podczerwieni bazujący na wiązce promieniowania synchrotronowego. Moim zdaniem, bardziej adekwatnym do tematyki rozprawy zagadnieniem jest porównanie, zalet i wad spektrometrów opartych o różne źródła promieniowania. Należy pamiętać, że promieniowanie synchrotronowe nie jest powszechnie stosowane jako źródło promieniowania w spektroskopii w zakresie podczerwieni.

Druga część rozprawy (rozdziały 4-8) zawiera jasno sformułowany cel pracy, opis stosowanej metodyki, szczegółowy opis wykonanych badań wraz z dyskusją wyników i finalnymi wnioskami. W mojej ocenie, opis metodyki badań nie jest wystarczająco szczegółowy. Zarówno stosowany model zwierzęcy jak i procedura histologiczna powinny zostać uzupełnione przynajmniej o cytowanie literatury, w której zawarty jest szczegółowy opis stosowanych metod. Dla preparatów tkankowych wykonano badania morfometryczne, których opis w rozprawie praktycznie nie istnieje. Na przykład, po zapoznaniu się z treścią rozprawy nie jest dla mnie jasne jak obliczano stosunek powierzchni do objętości dla dwuwymiarowych obrazów mikroskopowych czy też w jaki sposób wyznaczano współczynnik wymiany gazowej.

Również opis metodyki badań spektrofotometrycznych zawiera szereg niejasnych punktów. Standardowym postępowaniem dla badań spektrometrycznych w zakresie podczerwieni jest przeprowadzenie szeregu pomiarów wstępnych dla oceny zmienności widm wynikającej z warunków pomiarowych oraz określenie wpływu zastosowanych metod analizy chemometrycznej na końcowy wynik. Z reguły wykorzystujemy pomiary odpowiednio dobranych testowych substancji. W rozprawie nie znalazłem żadnej informacji o przeprowadzeniu tego typu pomiarów. Jest to bardzo istotny problem, ponieważ z dalszej części rozprawy można wnioskować, że przeprowadzono dwie serie pomiarowe dla tych samych próbek. Pierwszą w 2016 roku i drugą w roku 2019. Można się jedynie domyślać, dlaczego obie serie obejmowały badania oskrzeli a tylko jedna seria badania pęcherzyków. Osobnym problemem metodycznym, również pominiętym w rozprawie, jest zagadnienie odejmowania widm parafiny. Moim zdaniem, eksperyment powinien zostać uzupełniony o kilka pomiarów potwierdzających poprawne działanie procedury eliminacji wpływu parafiny,

co jest szczególnie istotne w przypadku pomiarów ilościowych. Uważam za niewystarczające zamknięcie tego problemu stwierdzeniem Autorki „z wykluczeniem pasm pochodzących od parafiny”.

Ostateczną analizę wyników pomiarów jak i obróbkę statystyczną danych wykonano przy pomocy komercyjnego oprogramowania, powszechnie stosowanego dla przeprowadzenia tego typu obliczeń. Jest to standardowa analiza, której skrótowy opis został podany w rozprawie.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawia wyniki pomiarów. Moim zdaniem, podobnie jak w części pracy poświęconej omówieniu metodyki badań, Autorka szczegółowo omawia mało istotne problemy jednocześnie skrótowo przedstawiając wiele istotnych zagadnień. Jako przykład mogę podać sprawdzanie normalności rozkładu danych. Standardem w pracach naukowych jest opis tego problemu jednym zdaniem. Nie jest dla mnie jasny cel umieszczenia w dysertacji tabel 4 i 7 oraz rycin 11 i 12. W przeciwieństwie do sprawdzania normalności rozkładu, bardzo istotny problem selekcji badanych obszarów nie został w tekście rozprawy omówiony. Uważam, że na rycinach 2 i 3 przykładowe badane obszary powinny zostać oznaczone zarówno dla pęcherzyków jak i oskrzeli. Dodatkowo, selekcja badanych obszarów odbywała się w oparciu o seryjne skrawki, co może stanowić źródło systematycznych błędów. Problem ten nie jest w rozprawie dyskutowany.

W dalszej części opisu wyników przedstawiono zaawansowaną analizę statystyczną dla sprawdzenia korelacji wyników uzyskanych w istocie dla dwóch różnych układów pomiarowych. Uwagi dotyczące takiej metodologii pomiarów zostały wyżej wyszczególnione. W mojej ocenie, brakuje w rozprawie jednoznacznego wyjaśnienia celu przeprowadzenia drugiej serii pomiarowej. Kolejno przedstawiono wyniki interpretacji widm w zakresie podczerwieni, najprawdopodobniej w oparciu o ogólnie dostępne biblioteki w dwóch zakresach liczb falowych. Ostatecznym etapem analizy widm było wyznaczenie współczynników absorpcji i porównanie ich wartości dla grupy badanej i grupy kontrolnej. Konsekwentnie Autorka stosuje identyczny schemat opracowania wyników dla próbek oskrzeli i pęcherzyków.

Kończąca rozprawę dyskusja jest częściowo luźno związana z przedstawionymi w dysertacji wynikami. Uważam, że ogólne informacje o wykorzystaniu spektroskopii w zakresie podczerwieni w diagnostyce dysplazji oskrzelowo-płucnej powinny zostać

umieszczone w części wstępnej rozprawy, a wyjaśnienie o konieczności stosowania skrawków parafinowych powinno zostać umieszczone w opisie metodyki. Przyznaje jednak, że znacząca część dyskusji odnosi się do wyników zgromadzonych przez Autorkę eksperymentów. Interpretacja wyników została przeprowadzona w merytorycznie poprawny sposób częściowo oparty na właściwie dobranej literaturze tematu.

Reasumując omówienie dysertacji pragnę podkreślić, że moja ocena merytoryczna rozprawy jest jednoznacznie pozytywna, ponieważ główny cel badań, których podsumowaniem jest recenzowana dysertacja doktorska został osiągnięty. Autorka dobrze definiuje problem, którego rozwiązanie stanowi cel pracy. Stosując standardową metodykę przeprowadza eksperyment i uzyskane wyniki poprawnie interpretuje. Wyżej przedstawione uwagi krytyczne odnoszą się głównie do zagadnień metodycznych.

Po omówieniu treści i uzyskanych w rozprawie wyników przechodzę do kilku uwag krytycznych. Pierwsza uwaga wynika z faktu, że nie jestem zwolennikiem podawania w dysertacjach powszechnie znanych i łatwo dostępnych informacji, które nie korelują z tematyką rozprawy. Dysertacja nie dotyczy diagnostyki i terapii dysplazji oskrzelowo-płucnej, czyli zagadnień medycznych o charakterze użytkowym. Celem badań jest określenie zmian składu tkanek na poziomie molekularnym z wykorzystaniem spektroskopii w zakresie podczerwieni, bazując na materiale uzyskanym w eksperymencie zwierzęcym. Uważam, że rys historyczny definicji dysplazji oskrzelowo-płucnej czy też definicja wczesniactwa nie korelują z tematyką rozprawy.

Następna uwaga związana jest z zastosowaniem dwóch różnych układów pomiarowych. W tekście rozprawy nie znalazłem pełnych informacji o stosowanym źródle synchrotronowym. W pracach wykorzystujących promieniowanie synchrotronowe podawane są z reguły informacje o wykorzystywanym synchrotronie czy też parametry stosowanej linii pomiarowej. Osobnym zagadnieniem jest wykorzystywanie bazującego na źródle synchrotronowym spektrometru. Z tekstu rozprawy nie wynika konieczność wykorzystania źródła synchrotronowego. W mojej ocenie podobne badania można przeprowadzić stosując konwencjonalny spektrometr w zakresie podczerwieni. Naturalnym jest pytanie o celowość zastosowania bardziej skomplikowanego i trudniej dostępnego układu pomiarowego. Moim zdaniem, problem ten powinien zostać w rozprawie wyjaśniony.

Kompletując ocenę rozprawy muszę zwrócić uwagę Autorce na szereg uchybień dotyczących strony redakcyjnej. Po pierwsze, Autorka stosuje formę prezentacji wyników w

postaci tabel i wykresów. Ta forma prezentacji wyników jest metodą zwiększenia objętości rozprawy, która nie jest akceptowana w publikacjach naukowych. Pobieźnie szacując mogę stwierdzić, że usunięcie z rozprawy około 20-tu rysunków nie zmieni jej zawartości merytorycznej. Dodatkowo, wiele rysunków jest nieczytelnych ze względu na zły dobór skali wykresu, wielkość czcionki wykorzystywanej do opisu osi czy też palety kolorów stosowanej do prezentacji poszczególnych krzywych. Problem ten dotyczy wielu zawartych w pracy rysunków. Jako przykład można podać ryciny 16 i 17.

Lista uchybień redakcyjnych jest niestety dłuższa. Jeśli umieszczamy w tekście wykaz skrótów, to powinien on być ułożony w porządku alfabetycznym. Autorka w prezentacji graficznej wyników stosuje niezależną numerację dla wykresów i rycin, co znacznie utrudnia czytelnikowi zapoznanie się z tekstem rozprawy. Także zawarte w tabelach liczby cyfr znaczących wymagają refleksji, a wartości  $p = 0.0000$  powinny zostać przedstawione jako  $p < 0.001$ .

Wyżej opisane uwagi dotyczą głównie strony redakcyjnej oraz metodycznej rozprawy i nie umniejszają znacząco w sumie bardzo pozytywnej oceny recenzowanej dysertacji. Uważam, że Autorka zawarła w rozprawie wyniki w większości poprawnie przeprowadzonych eksperymentów, które zostały we właściwy sposób zinterpretowane. Moim zdaniem, recenzowana dysertacja zatytułowana „Wykorzystanie technik biomedycznego obrazowania molekularnego w modelu zwierzęcym dysplazji oskrzelowo-płucnej” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o dopuszczenie pani mgr Magdaleny Kołodziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, uznając merytoryczną wartość rozprawy wnioskuje o jej wyróżnienie. Dysertacja powstała w wyniku poprawnie przeprowadzonego eksperymentu zwierzęcego, pomiary zostały wykonane z wykorzystaniem unikalnego układu eksperymentalnego, a interpretację przeprowadzono stosując zaawansowane metody obliczeniowe.

Kierownik Zakładu Biofizyki  
Katedry Fizjologii CMUJ



Prof. dr hab. Eugeniusz Rokita