

Lublin, 26 sierpnia 2019 r.

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

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kamińskiej pt. „Molecular characteristics of platelet and urinary extracellular vesicles and their possible applications in nanomedicine”

Historia nauki wskazuje, iż postęp w medycynie, w szczególności w technikach związanych z diagnostyką medyczną, związany jest ściśle z postępowaniem w obszarze metod eksperymentalnych fizyki. Nowoczesne metody instrumentalne, rozwijane w odpowiedzi na coraz to bardziej śmiało wyzwania poznawcze, formułowane w obszarze fizyki, zwykle bardzo szybko przenoszone były, niemalże bezpośrednio, do medycyny i nauk o życiu. Wśród licznych przykładów, które można przytoczyć na poparcie tej tezy, chętnie wymienia się klasyczną diagnostykę medyczną w oparciu o zastosowanie promieniowania X bądź, bardziej współcześnie, tomografię opierającą się na spektroskopii MRJ czy też na anihilacji pozytonów. Rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Agnieszkę Kamińską jest efektem aktywności badawczej ukierunkowanej na rozpoznanie możliwości zastosowania zaawansowanej analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, między innymi z wykorzystaniem spektroskopii rozpraszania ramanowskiego oraz spektrometrii mas, w diagnostyce stanów chorobowych w organizmie człowieka związanych z cukrzycą. W świetle przytoczonych powyżej spostrzeżeń, tematykę zaprezentowanej pracy doktorskiej uważam nie tylko jako interesującą ale również bardzo ważną.

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



Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem prof. Ewy Ł. Stępień, w Zakładzie Fizyki Medycznej, na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa zredagowana została w języku angielskim, na 110. stronach standardowego maszynopisu, według typowego układu. Po streszczeniach, w języku polskim oraz angielskim, zamieszczony został obszerny wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, niezmiernie pomocny, a w zasadzie niezbędny przy lekturze rozprawy pani mgr Agnieszki Kamińskiej, obficie wykorzystującej możliwość stosowania akronimów. Jeszcze przed właściwym tekstem rozprawy, Autorka zamieściła zestawienie pozycji swojego dorobku naukowego opierającego się na 5. oryginalnych artykułach badawczych, 3. zgłoszeniach patentowych oraz 14. doniesieniach konferencyjnych. Jak często stosuje się w tego typu opracowaniach, rozprawę otwiera część wstępna, zatytułowana „Theoretical Background”, posiadająca charakter wprowadzenia w tematykę badań, na zasadzie przeglądu literaturowego. Rozdział 1., w tej części, poświęcony został zdefiniowaniu oraz klasyfikacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) zaś rozdział 2. przedstawia zagadnienia związane z podejściami eksperymentalnymi możliwymi do zastosowania przy charakterystyce tych struktur biologicznych, w oparciu o szereg współczesnych metod instrumentalnych, włączając dynamiczne rozpraszanie światła (DLS, ang. Dynamic Light Scattering), śledzenie trajektorii ruchu nanocząstek (NTA, ang. Nanoparticle Tracking Analysis), dostrajalną, impulsową detekcję rezystancji (TRPS, ang. Tunable Resistive Pulse Sensing), mobilność elektroforetyczną, spektrometrię mas w wariacie MALDI-TOF, spektroskopię ramanowską oraz transmisyjną i skaningową mikroskopię elektronową. Dobór technik zaprezentowanych w ramach tego rozdziału odpowiada bezpośrednio arsenałowi zastosowanemu przez panią mgr Agnieszkę Kamińską w ramach jej pracy doktorskiej. Prowadzone badania wzmocnione były również istotnie, dodatkowym zastosowaniem współczesnych metod biologii molekularnej, w tym obejmujących analizy profilu miRNA pęcherzyków zewnątrzkomórkowych za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. New Generation Sequencing). W tym miejscu swojej oceny pracy doktorskiej chciałbym zwrócić uwagę na wyjątkową jej wartość wynikającą z umocowania poszczególnych zadań badawczych na wielu technikach i podejściach metodologicznych. Jak wynika z uzyskanych rezultatów, właśnie takie podejście doprowadzić może do odkrycia nowych metod diagnostyki. Dodatkową wartością, w tym aspekcie, okazało się



nowatorskie skoncentrowanie uwagi zespołu badawczego na, stosunkowo „mało docenianych” nanostrukturach obecnych w płynach ustrojowych, w formie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Cele projektu doktorskiego, zarówno te strategiczne jak i bardziej szczegółowe, sformułowane zostały w ramach jednostronicowego rozdziału 3. pt. „Thesis objectives”. Wart podkreślenia jest fakt konstrukcji pracy doktorskiej w oparciu o weryfikację ambitnej hipotezy badawczej, według której analizy właściwości fizycznych oraz parametrów spektroskopowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych stanowią mogą podstawę nowej metody diagnostycznej pacjentów cukrzycowych. Część druga rozprawy, zatytułowana „Materials and Methods”, obejmująca rozdziały od 4. do 6., poświęcona została szczegółowej prezentacji protokołów badawczych oraz parametrów pomiarowych przeprowadzonych analiz. W mojej ocenie, poziom szczegółowości tych opisów odpowiada w pełni, standardom obowiązującym w tym zakresie. Zasadniczą częścią rozprawy, z której wynika jej wysoka wartość, stanowi rozdział 7. pt. „Results”. Rozdział ten zredagowany został na zasadzie sekwencyjnego opisu poszczególnych zadań badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego. Z uwagą i zainteresowaniem przeczytałem podrozdziały dotyczące doboru i charakterystyki grup pacjentów zaklasyfikowanych do badań, mikroskopowej analizy morfologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskiwanych z moczu oraz aktywowanych płytek krwi pacjentów, dotyczące analiz rozkładu rozmiarów przestrzennych i potencjału zeta pęcherzyków, w końcu tych, opisujących wyniki analiz profilu miRNA oraz profilu proteomicznego, na podstawie wyników analiz masowo spektrometrycznych. Przyznać się jednak muszę, iż najbardziej zafascynowały mnie zaprezentowane wyniki analiz przeprowadzonych z zastosowaniem spektroskopii rozpraszania ramanowskiego. Jak wynika z tych rezultatów, co znajduje również odzwierciedlenie w ramach wieloaspektowej dyskusji przeprowadzonej w ramach rozdziału 8. pt. „Discussion”, szczegółowa analiza złożonych widm wieloskładnikowych struktur biologicznych, w oparciu o metodologię PCA (ang. Principal Component Analysis), umożliwia identyfikację sygnatur spektralnych jednoznacznie przypisanych zaburzeniom fizjologicznym na poziomie kontroli glikemicznej oraz zaburzeniom wiążącym się z uszkodzeniami nerek. Wynik ten, który uważam osobiście jako reprezentujący najważniejsze osiągnięcie analizowanej rozprawy doktorskiej, otwiera drogę do nowatorskiej metody diagnostyki klinicznej. Podobnej rangi spostrzeżeniem



raportowanym w ramach pracy doktorskiej jest, moim zdaniem, identyfikacja markerów białkowych, charakteryzujących stany chorobowe związane z cukrzycą (m.in. podokaliksynę oraz białko wiążące galektynę 3). Rozprawę niejako „dopina” zestawienie najważniejszych rezultatów, w ramach rozdziału 9. pt. „Conclusions” oraz uzupełniają zestawienia: tytułów 32. rycin, 17. tabel, 173. pozycji cytowanego piśmiennictwa (Bibliography) oraz wyników uzupełniających analiz, głównie biochemicznych, prezentowanych w ramach dodatku (Appendix). Nie mam śmiałości oceny aspektów stylistycznych rozprawy przedstawionej w języku obcym, z pewnością jednak wyrazić chciałbym odczucie, zgodnie z którym zredagowana została ona językiem klarownym i precyzyjnym, co przy wysokiej jakości zamieszczonych grafik czyni lekturę nie tylko cenną, z merytorycznego punktu widzenia, ale również przyjemną.

Jak już wspomniałem powyżej, w sposób szczególny moje zainteresowanie wzbudziły, zamieszczone w rozprawie, opisy eleganckich eksperymentów opierających się na analizach widm rozpraszania ramanowskiego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych izolowanych z płynów ustrojowych różnych grup pacjentów. Pomijając drobny fakt, iż nie mam przekonania co do poprawności przypisania niektórych pasm określonym drganiom zrębów molekularnych (np. na str. 58., Tabela 9., pasma z obszaru $1115-1143\text{ cm}^{-1}$ przypisałbym raczej drganiom rozciągającym grup C-C bądź C-O węglowodorów niż do drgań białek, bądź też str. 56., Tabela 7., pasma z maksimami przy 1744 cm^{-1} oraz 1729 cm^{-1} przypisałbym do drgań rozciągających estrowych grup karbonylowych lipidów zamiast drgań C=C lipidów, których jest znacznie mniej) zainteresowanie budzi fakt, iż w widmach składowych PC-1 oraz PC-2, widm zarejestrowanych z próbek pacjentów cukrzycowych (CD oraz UD, str. 54), dostrzec można istotne różnice w podstrukturze pasma Amid I. Odzwierciedlać to może odmienną strukturę drugorzędową białek, w związku z wykazanymi w pracy różnicami w proteosomie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ale również może się wiązać z odmienną organizacją molekularną komponentów białkowych w zmienionym środowisku lipidowym. Ciekaw jestem jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat.



Formułując konkluzję, chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Agnieszka Kamińska przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Wyniki tych prac zostały upowszechnione w pięciu oryginalnych artykułach badawczych oraz, w części, stały się podstawą trzech zgłoszeń patentowych. Wśród czasopism, na łamach których ogłoszone zostały wyniki badań, znaleźć można renomowane i opiniotwórcze w międzynarodowym środowisku fizyków medycznych, jak *Nanomedicine* (IF>6) oraz *Theranostics* (IF>8). W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Agnieszkę Kamińską zawiera rozwiązania istotnych, oryginalnych wyzwań poznawczych spełniając w pełni 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). W oparciu o powyższą konkluzję, uprzejmie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Kamińskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony. Biorąc pod uwagę ogromny zakres przeprowadzonych prac badawczych, rangę uzyskanych rezultatów oraz ich bardzo wysoki potencjał, w aspekcie możliwych zastosowań w kierunku opracowania nowoczesnych metod diagnostyki medycznej, ukierunkowanych na monitorowanie uszkodzenia nerek oraz na analizę stopnia wyrównania glikemii, związanych z postępem cukrzycy, uprzejmie proszę również o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej pracy doktorskiej za wyróżniającą.