



Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. "Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą epilepsji na przykładzie modeli zwierzęcych"

autorstwa Pani mgr Justyny Kutorasińskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. "Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych w badaniach nad patogenezą epilepsji na przykładzie modeli zwierzęcych" wykonana została przez Panią mgr Justynę Kutorasińską w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Wojciecha Łuźnego i dr inż. Joanny Chwiej występującej w roli promotora pomocniczego.

Mikrospektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana należą do ważnych technik analitycznych fazy skondensowanej a ostatnio do badań materii biologicznej. Rozwój technik fizycznych pozwala na prowadzenie badań interdyscyplinarnych m.in. w biologii i medycynie. Równocześnie rośnie świadomość, że poprzez jednoczesne zastosowanie różnorodnych technik możliwe jest uzyskanie komplementarnej informacji o badanej próbce, co może skutkować postawieniem diagnozy o znacznie wyższej jakości, do tego często w krótszym czasie potrzebnym na badania. Zacieśnienie współpracy pomiędzy medykami i fizykami owocuje prowadzeniem wielu ciekawych i ważnych prac badawczych. Do takich prac niewątpliwie należą badania prowadzone w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie, czego dowodem jest recenzowana rozprawa doktorska.

Jak słusznie zauważa doktorantka na wstępie swojej rozprawy, że *... "Epilepsja jest przewlekłym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującym się występowaniem spontanicznie powtarzających się napadów drgawkowych. ...a ... Sam proces epileptogenezy nie został jeszcze*



dogłębnie poznany. Dlatego też ...Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na badaniach zmian w akumulacji oraz strukturze głównych makromolekuł biologicznych w tkankach hipokampa mózgu szczura w dwóch różnych modelach drgawek epileptycznych”... Badania te przeprowadzono przy zastosowaniu mikrospektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii Ramana.

Strona | 2

Jak już wspomniałem, tematyka pracy jest niezmiernie ważna i ciekawa a po zastosowaniu specjalistycznych metod badawczych niewątpliwie należy spodziewać się interesujących wyników. Pani Kutorasińska ukończyła studia fizyki i ubiega się o nadanie jej stopnia doktora nauk fizycznych. Ponieważ praca jest pracą interdyscyplinarną i trudno jest jednoznacznie określić jej walory naukowe tylko w jednej dziedzinie, dlatego też mając nadzieję, że drugim recenzentem tej pracy jest osoba, która potrafi ocenić medyczny jej aspekt, to ja jako fizyk odniosę się głównie do przedstawianych zagadnień wskazujących na rozwój, nowatorstwo i wkład do strony fizycznej tej rozprawy.

Z przykrością muszę stwierdzić, że po przeczytaniu tej rozprawy mam poważne wątpliwości czy jej autorka wniosła jakikolwiek nowatorski aspekt w rozwój fizyki. Mam poważne wątpliwości czy samo wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej, nawet pracując na źródle promieniowania synchrotronowego, ograniczające się do wykonania standardowych już dzisiaj pomiarów widm, upoważnia Radę Naukową do nadania stopnia doktora w dziedzinie fizyki. Rozumiejąc trudność oceny prac interdyscyplinarnych, sam takowe prowadzę, nie mam zamiaru ujmować zasług doktorantce ale chciałbym móc „zobaczyć” fizykę w tej pracy, skoro ma to być doktorat z fizyki. Dodatkową trudnością w wydaniu pozytywnej oceny tej rozprawy jest dość duża liczba błędów merytorycznych świadcząca o nie pełnym rozumieniu fizyki przez doktorantkę. Mam też zastrzeżenia do samej edycji tej rozprawy, co jest sprawą drugorzędną, nie mniej jednak ważną.

Inna wątpliwość jaka mi się nasuwa, to wkład doktorantki w powstanie tej pracy, czego nie potrafię jednoznacznie ocenić. Jak wiadomo, cały eksperyment na zwierzętach i preparatyka próbek były prowadzone w Instytucie Zoologii UJ. Kto konkretnie prowadził te eksperymenty? Obawiam się, że wkład doktorantki był niewielki, bądź wręcz zerowy, skoro całość była prowadzona zgodnie w wymogami Komisji Bioetycznej, a ta wydaje zgodę jedynie dla osób posiadających odpowiednie wykształcenie. Być może doktorantka posiada



odpowiednie kwalifikacje i uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej, ale takiej informacji w pracy nie zawarto. Doktorantka powołuje się też na wcześniejsze badania prowadzone wspólnie z promotorem pomocniczym, czego efektem są wspólne publikacje. Warto by jednoznacznie określić wkład doktorantki w te prace.

Dość poważnym mankamentem tej pracy jest brak jakichkolwiek wniosków. Przedstawione podsumowanie jest narracją otrzymanych wyników jak np. ...*Spadek zawartości lipidów względem białek...jest skorelowany ze wzrostem skumulowanej intensywności i czasu trwania następczych drgawek...* Co z tego wynika???. Dla fizyka niewiele, być może dla medyka jest to istotna informacja, czego nie potrafię ocenić. Szkoda, że doktorantka nie uwypukliła strony fizycznej tej pracy. Nie ma w niej ani aspektu fizycznego w zakresie preparatyki próbek np. poprzez odpowiedni dobór metodyki, ani modyfikacji czy doboru parametrów pomiarowych w zakresie spektroskopii oscylacyjnej, ani specyfiki analizy widm czy danych eksperymentalnych.

Po tych wstępnych uwagach pozwolę sobie na dokonanie szczegółowej analizy tej rozprawy.

Recenzowana rozprawa zawiera się na 96 stronach, posiada indeks skrótów, wstęp, 5 rozdziałów merytorycznych, podsumowanie, dodatki oraz bibliografię zawierającą 66 pozycji oraz wykaz 4 stron internetowych. Tekst ilustrowany jest kolorowymi rysunkami, wykresami oraz tabelami.

Pierwszy rozdział merytoryczny rozprawy – *Wprowadzenie do zwierzęcych modeli epilepsji* – zawiera opis zagadnienia medycznego. Niestety, nie mam odpowiednich kwalifikacji aby móc dokonać oceny tego rozdziału rozprawy doktorskiej.

Drugi rozdział merytoryczny – *Opis metod badawczych* – poświęcony jest opisowi podstaw fizycznych spektroskopii w podczerwieni i elementów spektrofotometru IR. Rozdział ten zawiera błędy merytoryczne świadczące o dość pobieżnym rozumieniu fizyki. Zbyt wielki skrót myślowy zawarty jest w zdaniu (str. 19) „*W zależności od zakresu energetycznego padającego promieniowania, wyróżniamy spektroskopię w podczerwieni (IR), w zakresie widzialnym i ultrafiolecie (UVi VIS), elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR), oraz magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)*”. Nie zrozumiałym jest też



zdanie „*Biorąc pod uwagę złożoność takiego układu, opis jego energii musi uwzględniać zarówno energię wynikającą z ruchu samej molekuly, jak i energię elektronów oraz wewnętrzną energię jader atomowych*” o jakiej energii elektronów czy energii wewnętrznej jader jest tu mowa?

Strona | 4

Wzór III.3 w ogólnym przypadku powinien zawierać fazę φ .

Na stronie 23 i w wielu miejscach tej rozprawy mamy do czynienia z „kalectwem” języka polskiego. Nie można powiedzieć „*Ilość molekuł*”. Nie rozumiem dlaczego autorka wymiennie stosuje *liczba molekuł* i *ilość molekuł*. Nie rozumiem, co autorka miała na myśli pisząc (str. 24) „*W trakcie oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią zachodzą mogą zjawiska takie jak absorpcja, transmisja, bądź rozpraszanie fal EM*” . Wzór III.15 jest błędny skoro λ wyrażona jest w metrach to powinno być $\bar{v} = 100/\lambda$.

Tabela III.1. zawiera błędy. Podane zakresy liczb falowych nie odpowiadają zakresom długości fal. Niestety błędy są w oryginale z którego pochodzi ta tabela. Należało dołożyć starań i ją sprawdzić a nie bezkrytycznie skopiować.

Nazwisko Bouguera (str. 25) jest napisane błędnie podobnie jak Nernsta na str. 26. Opis, dość lakoniczny, promieniowania synchrotronowego jest nie do przyjęcia w pracy doktorskiej. A opis powstawania promieniowania synchrotronowego (nie rozumiem co to jest *bending magnet radiation*?) mówiący o tym, że *...tor ruchu cząstek jest zakrzywiany przez magnesy zakrzywiające przez co pojawia się przyspieszenie kątowe poruszającej się paczki cząstek...* świadczy o całkowitym braku rozumienia działania synchrotronu. Czy zakrzywienie toru powoduje powstanie przyspieszenia kątowego, czy może na odwrót?

Zawarty opis interferometru jest niezrozumiały. Nie wiem o jakim kierunku (str. 28) równoległym – do jakiej wiązki – jest mowa w opisie i kiedy oraz gdzie powstają fale, które następnie interferują.

O jakiej fotokomórce jest mowa na str. 29?

Dlaczego autorka opisuje detektor dla bliskiej podczerwieni skoro pomiary były prowadzone w zakresie środkowej podczerwieni.

W celu pracy jest mowa o spektroskopii Ramana, natomiast ani słowo nie pada w rozdziale teoretycznym o tej metodzie. Dlaczego?



Trzeci rozdział merytoryczny – *Cel pracy* – pokrótce precyzuje cel pracy .

Najistotniejsze rozdziały rozprawy są rozdziały piąty i szósty prezentujące wyniki i ich analizę. Rozdział merytoryczny czwarty – *Analiza zmian biochemicznych hipokampa zachodzących na skutek drgawek wywołanych pilokarpiną* – zawiera opis zaplanowanych badań. Zawarte w nim wyniki świadczą o ogromie pracy eksperymentalnej jaki został włożony przez autorkę rozprawy. Podobnie jak następny rozdział – *Analiza zmian biochemicznych hipokampa zachodzących na skutek wielokrotnej stymulacji elektrycznej (model drgawek rozniecanych)*. W obydwu tych rozdziałach zaprezentowano wyniki eksperymentalne uzyskane pod czas realizacji projektów na synchrotronie SOLEIL we Francji.

Strona | 5

Nie rozumiem, dlaczego pomiary wykonywano ze zdolnością spektralną 6 cm^{-1} skoro poszukiwane były subtelne różnice w widmach, oraz dlaczego próbki wykonywano przy 64 skanach a tło 124?

Rys. V.1 porównuje widma kreatyny z inkluzją oraz warstwami komórek piramidowych zaznaczając, że widmo kreatyny pochodzi z biblioteki widm podczas gdy w publikacji [ref. 41] podano, że jest to widmo kreatyny zmierzonej przez autorów.

Czym kierowano się przy doborze grubości preparatów? Raz wynosi ona $10 \mu\text{m}$ (str. 34) a innym razem $12 \mu\text{m}$ (str. 50).

Szkoda, że w pracy nie pokazano żadnego widma na bazie których powstały mapy rozkładów pasm prezentowanych na rys. VI.1. Czym kierowano się przy doborze pasma 1660 cm^{-1} normalizując mapy? W tabeli VI.1 brak takiego przypisania natomiast występuje pasmo 1655 cm^{-1} . Czy znaczy to, że widmach występowało pasmo 1655 cm^{-1} ? O jakich wartościach **medialnych** (str. 53) jest mowa w pracy? Wyjaśnienia wymaga też różne podejście do obliczeń istotności różnic między grupami (tab. VI.3, str. 54) – raz obliczano absorbancję jako pole powierzchni masywu a drugi raz jako wysokość? Brak komentarza w tej sprawie. Dlaczego w przypadku stosunku pasm 1631/1657 nie obliczono absorbancji jako pole powierzchni i dlaczego obliczono stosunek do pasma 1657 cm^{-1} a nie 1660 cm^{-1} ?



Jak należy interpretować wykresy VI.2 i VI.3? Czy kolejność ułożenia próbek ma znaczenie? Co autorka rozumie przez parametr behawioralny? Nie rozumiem też znaczenia poziomu istotności $p = 0,0$?

Podsumowując, z wielką przykrością stwierdzam, że w obecnym stanie przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Kutorasińskiej **nie spełnia** wymagań stawianych pracom doktorskim określonych 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 jej poprawę oraz uzupełnienie, aby móc ją rekomendować do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Strona | 6


Prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek