



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA

Dr hab. inż. Joanna Chwiej, prof. uczelni  
Joanna.Chwiej@fis.agh.edu.pl  
Zespół Biospektroskopii Atomowej i Molekularnej  
Katedra Fizyki Medycznej i Biofizyki

Kraków dn., 19.07.2023

## Opinia o pracy doktorskiej

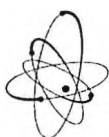
***„Phenotypic and chemical changes in the adipose tissue in atherosclerosis and obesity analyzed using Raman techniques and complementary methods”***

**Pani mgr Zuzanny Majki**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Zuzanny Majki została wykonana pod kierunkiem Pani promotora – profesora UJ, dr hab. Agnieszki Kaczor na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET). Została ona przygotowana w formie hybrydowej i stanowi połączenie cyklu powiązanych ze sobą tematycznie trzech opublikowanych już artykułów oraz manuskryptu, który w formie opisowej przedstawiono w autoreferacie. Autoreferat, napisany w języku angielskim i liczący wraz ze spisem publikacji 83 strony, podzielony został na 6 głównych części: Wstęp, Cele pracy, Dyskusja wyników, Wnioski, Perspektywy oraz Literatura. Dodatkowo, poprzedzają go lista skrótów, streszczenia w języku angielskim i polskim, lista publikacji będących częścią rozprawy oraz pozostałych prac Doktorantki. Sama rozprawa zawiera jeszcze kopie artykułów włączonych do cyklu oraz oświadczeń wszystkich, z Doktorantką włącznie, współautorów tych prac.

Tkanka tłuszczowa stanowi nie tylko magazyn energetyczny, ale jest aktywnym narządem endokrynnym. Wydzielane przez nią adipokiny wpływają na

**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej**  
**Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej**  
Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków  
tel: +48 12 617 2951, +48 12 633 3740, fax: +48 12 634 0010  
e-mail: fizagh@ftj.agh.edu.pl, www.fis.agh.edu.pl



homeostazę energetyczną organizmu, procesy zapalne, a także funkcjonowanie układu hormonalnego. Dodatkowo, pełni ona istotną rolę w regulacji masy ciała i utrzymaniu równowagi energetycznej organizmu. Kompleksowy układ komunikacji między tkanką tłuszczową a układami hormonalnym, nerwowym i odpornościowym wpływa na apetyt, termogenezę oraz rozkład glukozy i lipidów w organizmie. Badania nad tkanką tłuszczową, w które doskonale wpisuje się praca doktorska Pani mgr Zuzanny Majki, pozwalają na lepsze zrozumienie procesu rozwoju otyłości i związanych z nim zaburzeń metabolicznych, identyfikację biomarkerów związanych z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycą typu 2, a nawet nowotworami. Innowacyjne metody leczenia, takie jak terapia genowa czy blokowanie określonych szlaków metabolicznych w komórkach tłuszczowych, stają się obiecującymi kierunkami w zwalczaniu wspomnianych chorób. Dlatego też, biorąc powyższe fakty pod uwagę, podjęty przez Panią Zuzannę Majkę w doktoracie temat uważam za ogromnie ważny i aktualny.

Zacznę od kwestii formalnych związanych z recenzowaną pracą. Wszystkie trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Zuzanny Majki opublikowane zostały w czasopiśmie z listy JCR o wysokim współczynniku przebiccia, a mianowicie w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 5.924), *Analyst* (IF: 5.227) oraz *BBA – Molecular Basis of Disease* (IF: 6.2). Wszystkie trzy prace są pracami wieloautorskimi. Doktorantka jest równorzędnym pierwszym autorem dwóch pierwszych prac oraz pierwszym autorem pracy opublikowanej w czasopiśmie *BBA*. Do artykułów dołączono oświadczenia wszystkich współautorów, które jasno wskazują nie tylko na ich indywidualny merytoryczny wkład w powstanie tych publikacji, ale także na wiodącą rolę Doktorantki w tym procesie.

Układ rozprawy doktorskiej, a właściwie autoreferatu, jest w pełni akceptowalny. Cele rozprawy zostały jasno sformułowane i zamieszczone w niezależnym rozdziale. Jako recenzent chciałabym zwrócić jedynie uwagę na brak wyraźnie wyodrębnionej części „Materials and methods”, która powinna zawierać opis materiału badawczego, zastosowanych metod pomiarowych czy warunków eksperymentalnych. Mimo, że informacje na temat przebadanych grup eksperymentalnych, analizowanych tkanek i ich preparatyki można znaleźć w formie rozproszonej w części „Dyskusja wyników” autoreferatu oraz w poszczególnych artykułach, to jednak syntetyczne podsumowanie tych wiadomości w niezależnym rozdziale uczyniłoby pracę łatwiejszą w odbiorze dla czytelnika.

Niniejszą recenzję sporządzam biorąc pod uwagę w ocenie, całościowo, publikacje będące przedmiotem cyklu oraz autoreferat stanowiący przewodnik po

nim. Zdaję sobie sprawę, iż wszystkie trzy artykuły przeszły pozytywnie proces ewaluacji w czasopismach, dlatego przy ocenie publikacji skupię się, przede wszystkim, na najistotniejszych wynikach i wnioskach w nich zamieszczonych.

*Publikacja 1:*

W pierwszej pracy z cyklu, w oparciu o myszy model miażdżycy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup>, analizowano wywołane rozwojem schorzenia zmiany w zakresie składu chemicznego okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej aorty brzusznej i piersiowej oraz samej ściany naczynia. Uzyskane, przy wykorzystaniu prototypowego układu do światłowodowej spektroskopii ramanowskiej, wyniki ujawniły u zwierząt modelowych zmiany w zakresie poziomu nienasycenia tłuszczów (wzrost) w tkance tłuszczowej wokół aorty brzusznej, ale nie wokół części piersiowej naczynia, co wskazuje na różną podatność tkanki tłuszczowej na towarzyszące miażdżycy zmiany patologiczne w zależności od jej fenotypu.

*Publikacja 2:*

Uzyskane w pracy 1 rezultaty skłoniły Doktorantkę i Zespół, w którym realizuje badania, do weryfikacji, czy towarzyszące zmianom miażdżycowym u myszy ApoE/LDLR<sup>-/-</sup> nieprawidłowości w zakresie poziomu nienasycenia lipidów, charakterystyczne są również dla okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej cierpiących na zaawansowaną miażdżycę pacjentów. Dzięki współpracy ze Szpitalem Jana Pawła II w Krakowie możliwe było pozyskanie materiału tkankowego stanowiącego pozostałość po zabiegach pomostowania aortalno-wieńcowego, który przeanalizowano wykorzystując metodę światłowodowej spektroskopii Ramana. Zamieszczone w publikacji 2 wyniki uważam za szczególnie cenne. Po pierwsze dlatego, że dane uzyskane z badań ramanowskich skorelowano z parametrami opisującymi stan/obraz kliniczny pacjentów, jak wiek, BMI, obecność cukrzycy czy wreszcie stopień zaawansowania dławicy piersiowej wg czterostopniowej skali opracowanej przez Kanadyjskie Towarzystwo Kardiologiczne. Po drugie dlatego, że otrzymane widma molekularne ujawniły różnice w zakresie składu ludzkich adipocytów w porównaniu do mysich. Ludzkie komórki, obok trójglicerydów, zawierały jeszcze karotenoidy, których poziom w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej był obniżony u pacjentów, u których równocześnie z miażdżycą występowała cukrzyca. I wreszcie, wyniki zamieszczone w pracy 2 dają ogromne nadzieje, na możliwość wykorzystania światłowodowej spektroskopii Ramana do obiektywnej, śródoperacyjnej diagnostyki pacjentów cierpiących na schorzenia, którym towarzyszą zmiany w zakresie okołonaczyniowej, ale nie tylko, tkanki tłuszczowej.

### *Publikacja 3:*

W ramach pracy 3 analizowano wpływ diety wysokotłuszczowej na zmiany chemiczne i morfologiczne tkanki tłuszczowej. W badaniach skupiono się nie tylko na okołonaczyniowej tkance tłuszczowej, ale analizie poddano także białą i brunatną tkankę tłuszczową, odpowiednio najądrza oraz międzyłopatkową. Do osiągnięcia założonych celów zastosowano mikroskopię ramanowską, światłowodową spektroskopię Ramana oraz mikroskopię fluorescencyjną. Krótkotrwała dieta wysokotłuszczowa prowadziła do hipertrofii adipocytów okołonaczyniowej, ale nie białej i brunatnej tkanki tłuszczowej. Przy krótkotrwałym stosowaniu diety wysokotłuszczowej, zaobserwowano spadek poziomu nienasyceń tłuszczów tylko w białej tkance tłuszczowej. Co więcej, efekt ten, wynikający najprawdopodobniej z gromadzenia się w tkance nasyconych tłuszczów, nasilał się z czasem stosowania tej diety. Zastosowanie diety wysokotłuszczowej u starszych zwierząt doprowadziło do spadku poziomu nienasyceń tłuszczów również w okołonaczyniowej tkance tłuszczowej aorty brzusznej, a wydłużenie czasu jej trwania także w tkance tłuszczowej wokół części piersiowej aorty. Podsumowując, uzyskane w pracy 3 rezultaty wskazują na istotny wpływ nawet krótkotrwanie stosowanej diety wysokotłuszczowej na morfologię i skład adipocytów oraz ujawniają różną podatność poszczególnych typów tkanki tłuszczowej na zmiany patologiczne indukowane tą dietą i prowadzące do otyłości.

### *Nieopublikowane wyniki:*

Celem nieopublikowanych jeszcze badań było określenie bezpośredniego i pośredniego wpływu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych na tkankę tłuszczową w mysim modelu otyłości indukowanej dietą wysokotłuszczową. Zwierzętom eksperymentalnym podawano z pożywieniem maślan sodu będący jednym z takich związków albo  $\beta$ -glukan, z którego w jelitach produkowane są właśnie krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Uzyskane wyniki pokazały, że zarówno pośrednia, jak i bezpośrednia suplementacja krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi przeciwdziała nadmiernemu wzrostowi masy ciała zwierząt karmionych dietą wysokotłuszczową. Co ciekawe, nie stwierdzono tutaj hipertrofii adipocytów okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej po 4-tygodniowym okresie karmienia dietą wysokotłuszczową. Dieta wysokotłuszczowa podawana zwierzętom niesuplementowanym przyczyniła się, natomiast, do wzrostu poziomu nasycenia lipidów w obu typach okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej oraz w białej tkance tłuszczowej. Suplementacja zwykle niwelowała obserwowane nieprawidłowości w tkance okołonaczyniowej, ale nie w białej tkance tłuszczowej. Badania mikroflory jelitowej zwierząt wykazały, że  $\beta$ -glukan pozytywnie wpływa na mikrobiom zwierząt na diecie wysokotłuszczowej, które dzięki suplementacji zachowują zbliżony profil bakteryjny do grupy kontrolnej.

Jako recenzent rozprawy chciałabym zwrócić uwagę również na pewne kwestie, które skłoniły mnie do głębszej refleksji w czasie lektury pracy, a także drobne niedociągnięcia, których nie uniknęła Doktorantka przygotowując dysertację. Celem ich przedstawienia nie jest wytykanie niedoskonałości rozprawy, a raczej skłonienie do refleksji i motywacja do dalszego doskonalenia się. Uwagi te, które nie umniejszają mojej bardzo wysokiej ocenie pracy, przedstawiam poniżej.

*Uwaga 1:*

W części 1.2.2. Doktorantka wiąże epidemię otyłości ze zwiększoną dostępnością i zawartością tłuszczów w pożywieniu, co oczywiście w prosty sposób uzasadniałoby zastosowanie do realizacji celów rozprawy mysiego modelu otyłości wywołanej dietą wysokotłuszczową. A przecież dieta wysokotłuszczowa eliminująca węglowodany, czyli dieta ketogeniczna, stosowana jest obecnie nie tylko jako metoda leczenia padaczki lekoopornej czy cukrzycy typu 2, ale także właśnie w celu eliminacji nadmiarowych kilogramów.

Biorąc powyższe pod uwagę wskazane byłoby porównanie diety wysokotłuszczowej stosowanej w badanym modelu otyłości z dietą standardową pod kątem zawartości makro- i mikroskładników, kaloryczności czy, jeśli weryfikowano, średniego dziennego spożycia.

*Uwaga 2:*

Rozdział 1.3.1. pt. Spektroskopia Ramana, który powinien zawierać podstawy fizyczne głównej metody eksperymentalnej wykorzystywanej na potrzeby realizacji celów pracy, został przygotowany bardzo niedokładnie. Już sam pierwszy akapit zawiera tyle skrótów myślowych, iż momentami ma się wrażenie, że dotyczy on raczej spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podczerwieni niż spektroskopii Ramana. Myślę, że dobrze by było pokazać tutaj, jak wychodząc z teorii polaryzowalności liniowej Placzka możemy wyjaśnić powstawanie widm ramanowskich.

*Uwaga 3:*

Nie do końca mogę się zgodzić z informacją zwartą na str. 30, że mikrospektroskopia Ramana jest nieniszczącą metodą pomiarową.

*Uwaga 4:*

Doktorantka kilkakrotnie w pracy określa poziom nienasylenia lipidów jako uniwersalny marker zmian patologicznych zachodzących w tkance tłuszczowej. Zgadzam się z tym sformułowaniem, ale od razu nasuwa mi się pytanie, czy ta uniwersalność nie przekłada się na brak specyficzności tego markera?

*Uwaga 5:*

Uzyskane w pracy wyniki pokazały, że okołonaczyniowa tkanka tłuszczowa pobrana od ludzi może różnić się od tej uzyskanej od myszy eksperymentalnych. Czy doktorantka zastanawiała się, z czego może wynikać obecność karotenoidów w ludzkich adipocytach?

*Uwaga 6:*

Nie mogę się zgodzić z zamieszczonym na str. 63 autoreferatu stwierdzeniem, że nie jest możliwe przygotowanie wystandaryzowanych pod względem grubości skrawków mikrotomowych czy kriomikrotomowych tkanki tłuszczowej. W literaturze znaleźć można wiele prac, w których takie metody preparatyki były stosowane.

*Uwaga 7:*

W badaniach dot. wpływu suplementacji krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi na tkankę tłuszczową w mysim modelu otyłości, masa zwierząt jest normalizowana do średniej początkowej wagi gryzoni w populacji. Taki zabieg, powoduje, że wnioski płynące z porównań nie są precyzyjne. I tak na przykład (str. 60), Doktorantka pisze, że po czterech tygodniach diety suplementowanej i normalnej masa ciała zwierząt się wyrównała, mając raczej na myśli jednakowe przyrosty masy w tym okresie. Czy nie lepiej byłoby, po prostu, poddać analizie nie masy znormalizowane, ale przyrosty masy ciała zwierząt w poszczególnych okresach?

*Uwaga 8:*

Zawarte w rozdziale Wnioski podsumowanie wyników stanowi, w dużej mierze, powtórzenie informacji zawartych we wcześniejszych częściach autoreferatu. Czy nie lepiej byłoby syntetycznie, w kilku punktach, przedstawić w nim główne tezy płynące z przeprowadzonych badań?

*Podsumowanie:*

Niezależnie od przedstawionych powyżej refleksji i uwag, uzyskane przez Panią Zuzannę Majkę w ramach jej pracy doktorskiej rezultaty uważam za ogromnie wartościowe. Wskazują one na bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i praktyczne Doktorantki, a także predyspozycje do pracy w interdyscyplinarnym zespole składającym się z wysokiej klasy specjalistów reprezentujących nie tylko różne dyscypliny, ale i dziedziny nauki. Należy zaznaczyć, że poza publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorantka jest współautorką jeszcze 6 innych artykułów opublikowanych w cenionych czasopismach z listy JCR o bardzo wysokim współczynniku przebiccia. Jest lub była kierownikiem projektu Preludium oraz wykonawcą w 3 projektach OPUS finansowanych przez NCN. Praca doktorska Pani mgr Zuzanny Majki stanowi

oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne. Dlatego też, stwierdzam, że spełnia ona wszystkie zwyczajowe i formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych na Uniwersytecie Jagiellońskim o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoki poziom rozprawy, cenne wyniki, które przyczyniają się istotnie do lepszego zrozumienia zmian w tkance tłuszczowej zachodzących na skutek różnych fizjo- i patologicznych procesów, a także wysoki poziom osiągnięć będących podstawą doktoratu, wnioskuję także o wyróżnienia dysertacji.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jacek Chmiej', is located in the lower right quadrant of the page.

