



dr hab. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM
Samodzielna Pracownia Spektroskopii i Obrazowania Chemicznego
Wydział Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin 07.10.2025 r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anety Kowal zatytułowanej „**Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)**” wykonaną pod kierunkiem promotorów dr hab. n. med. Radosław Chaber, prof. UR oraz dr hab. n. fiz. Józef Cebulski, prof. UR w Instytucie Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego.

Temat podjęty przez doktorantkę wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu poszukiwania spektralnych *markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)*. Ostre białaczki stanowią około 28% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u dzieci, a najczęściej diagnozowane to ostra białaczka limfoblastyczna (ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL) i ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia, AML). Opracowanie metody diagnostycznej z zastosowaniem techniki spektroskopii ramanowskiej, spektroskopii w podczerwieni FT-IR oraz wielowymiarowych metod analizy danych (HCA hierarchiczna analiza Skupień, PCA Analiza głównych składowych) jako narzędzia alternatywnego lub uzupełniającego w diagnozowanie pacjentów jest potrzebne. Badania w recenzowanej dysertacji wykonano z wykorzystaniem surowicy krwi obwodowej i lizatu komórkowego szpiku kostnego w celu śledzenia zmian molekularnych w przebiegu białaczki ALL u dzieci. Nowoczesne metody szybkiej analizy komórek białaczkowych w dalszym ciągu stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny spersonalizowanej. Uważam, że wybór tematyki badawczej jest bardzo istotny z naukowego, i poznawczego a przede wszystkim

medycznego punktu widzenia. Uzyskane wyniki badań mogą zaowocować w dalszej perspektywie szybszą i lepszą diagnostyką ostrych białaczek u pacjentów pediatrycznych.

Formalna ocena pracy

Recenzowana dysertacja Doktorantki została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych, łącznie zawiera 199 stron. Napisana jest w języku polskim i jest bardzo przejrzysto opracowana graficznie. Praca zawiera Wykaz skrótów, których Autor prezentuje na 3 stronach maszynopisu. Odpowiednio dobrane piśmiennictwo, liczące 172 pozycje, w przeważającej części pochodzi z ostatnich lat jest wykorzystane i zacytowane właściwie. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w dyskusji, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu. Dysertacja jest podzielona na wstęp tzw. część teoretyczną dosyć zwięźle zaprezentowaną na 14 stronach oraz część eksperymentalną zawartą na 102 stronach. W końcowej części znajdują się dyskusja wyników opisana na 24 stronach oraz część dotycząca uzyskanych wniosków czyli podsumowanie. W dysertacji jest 92 bardzo dobrze opracowanych pod kątem graficznym rycin oraz 23 tabele.

Wstęp czyli część teoretyczna ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczy aspektów naukowych takich jak diagnostyka ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci, wprowadzenia do spektroskopii ramanowskiej oraz podczerwieni. Ta część stanowi bardzo dobre wprowadzenie do części wyników eksperymentalnych.

Głównym celem badań doktorantki było:

1. Zbadanie różnic molekularnych dla widm FT-IR i widm ramanowskich z próbek surowicy od dzieci z ALL oraz grupy pacjentów zdrowych i z nienowotworowymi schorzeniami hematologicznymi.
2. Analiza zmian w widmach FT-IR i widmach ramanowskich lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL i pacjentów z nienowotworowymi zaburzeniami hematologicznymi.
3. Ocena wykorzystania otrzymanych widm FT-IR oraz ramanowskich surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego dzieci z ALL jako potencjalnego markera diagnostycznego.

Ocena merytoryczna

Dysertacja dotyczy zbadania różnic w widmach FT-IR i widmach Ramana surowicy i lizatu komórkowego szpiku kostnego pomiędzy pacjentami pediatrycznymi z ALL, pacjentami zdrowymi bądź z zaburzeniami hematologicznymi innymi niż choroba nowotworowa. Uzyskane dane spektralne zestawiono z danymi klinicznymi, którymi dysponowano dla pacjentów z ALL powiązanych z przynależnością do danej grupy ryzyka. Porównano z profilem molekularnym i wynikiem minimalnej choroby resztkowej, a także wystąpieniem wznowy bądź zgonu pacjenta. Spektroskopia FTIR i Ramana wykazały ograniczoną przydatność w identyfikacji specyficznych zmian molekularnych w przebiegu ALL u dzieci, jednak ujawniły istotne różnice między grupą kontrolną a pacjentami z ALL z zaburzeniami hematologicznymi. Zbadano różnice w udziale struktur α -helisy i beta-kartki białek, które mogą posłużyć jako potencjalne markery diagnostyczne, zwłaszcza w różnicowaniu ALL jako przyczyny anemii i pancytopenii krwi obwodowej u dzieci oraz do wstępnej stratyfikacji do grupy ryzyka. Spektroskopia Ramana umożliwiła także odróżnienie pancytopenii w przebiegu ALL od innych przyczyn na podstawie badania surowicy krwi, co sugeruje potencjalną możliwość opracowania nieinwazyjnych testów przesiewowych. Wyniki wymagają walidacji na większych grupach pacjentów z uwagi na ograniczoną liczebność próby. Wszystkie opisane powyżej badania dotyczą zastosowania metod chemometrycznych w analizie danych spektralnych z wykorzystaniem PCA, HCA. Doktorantka podkreśla, że kluczowe znaczenie w uzyskaniu wydajnych analiz ilościowych ma zastosowanie odpowiednich narzędzi chemometrycznych oraz odpowiednia ilość badanych próbek, zarówno na etapie wstępnego opracowania danych, jak i selekcji zmiennych spektroskopowych (lipidy i białka).

Dysertacja jest spójna z założonym tytułem, a wyniki badań są przedstawione rzetelnie. Przedstawione wnioski są spójne i potwierdzają założone tezy badawcze. Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka komentarzy o których chciałabym porozmawiać podczas obrony:

- 1) Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka popełniła kilka błędów edytorskich, np. str. 20 jest wyrażenie „W trybie transfektancji” czy nie powinno być „W trybie transfleksji”. Termin "transfleksji" w kontekście spektroskopii nie jest powszechnie używany; prawdopodobnie chodziło o transmisyjno-refleksyjną spektroskopię, która mierzy jednocześnie światło przechodzące przez próbkę (transmisję) i odbijające się od niej (refleksję).

- 2) W sekcji materiały i metody strona 27 – w opisie przygotowania próbki nanoszono aż 20 uL surowicy na szkiełko z CaF_2 , a czas przygotowania próbki do analizy wynosił aż 3 godziny. Czy wykonywano optymalizację sposobu przygotowania surowicy do badań ATR FTIR? Czy próbka analizowana pod kątem zawartości białek po 3h mogła ulec zmianie?
- 3) Opracowując i poszukując markerów spektroskopowych do analizy danych spektralnych doktorantka używa różnej ilości danych (próbek), co oczywiście wpływa na jakość uzyskanych wyników. Czy doktorantka byłaby w stanie określić minimalną ilość próbek potrzebnych do wykonania prawidłowo analizy PCA tak aby znalazło to odzwierciedlenie w badaniach klinicznych? I jakim błędem byłyby obarczone wyniki takiej analizy ?
- 4) Doktorantka posługuje się dwiema metodami analitycznymi; m.in. spektroskopią ramanowską oraz w podczerwieni. Gdyby miała możliwość wyboru tylko jednej metody w badaniu surowicy, którą by wybrała i dlaczego?

Bardzo doceniam umiejętność dyskusji wyników oraz rozważne podejście co do wyciąganych wniosków np. strona 146 – opis analizowanych rozbieżnych wyników FT-IR. Doktorantka przedstawiła również możliwe ograniczenia technik w projektowaniu badań na stronie 157. Taka umiejętność krytycznego spojrzenia na uzyskane wyniki świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki.

Na samym końcu dysertacji znajdują się wnioski końcowe, literatura oraz liczne osiągnięcia doktorantki. Lista publikacji –to sześć sztuk wszystkie z listy czasopism posiadających Impact Factor IF o sumarycznym wskaźniku około 30. Są to publikacje w renomowanych czasopismach typu Biosens. Bioelectron., Nanomedicine, Analytical Biochemistry. Następnie podane są, wystąpienia konferencyjne, oraz projekty naukowe. Doktorantka była wykonawcą w programie grantowym na prace B+R jednostek naukowych w ramach projektu pt. „Podkarpackie Centrum Innowacji” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Osi Priorytetowej nr I "Konkurencyjna i innowacyjna gospodarka" z Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2014-2020 Nabór III (numer grantu N3_134). Ponadto była głównym badaczem w uczelnianego grantu dla młodych naukowców Uniwersytetu

Rzeszowskiego (numer identyfikacyjny grantu NIG/36/2022). Obydwa projekty były związane z tematyką rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, stwierdzam, że treść recenzowanej pracy odpowiada tytułowi, a sposób jej zredagowania oceniam jako bardzo dobry. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę stanowią nowoczesny i oryginalny wkład w opracowanie metody z zastosowaniem potencjalnych markerów diagnostycznych w ostrej białaczce limfoblastycznej ALL. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem umiejętności do samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych i prawidłowego interpretowania wyników. W mojej opinii, przedstawioną pracę doktorską należy ocenić bardzo wysoko. Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Doktorantka może pochwalić się wystąpieniami na konferencjach oraz udziałem w dwóch projektach naukowych. Jest to bardzo imponujący dorobek.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anety Kowal zatytułowanej ***„Zastosowanie spektroskopii IR i spektroskopii Ramana w poszukiwaniu potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w surowicy i szpiku kostnym pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL)”*** spełnia wymogi stawiane **rozprawom doktorskim** zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), w związku z czym zwracam się do Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk medycznych w Uniwersytecie Rzeszowskiego z wnioskiem o nadanie Pani **mgr Anecie Kowal stopnia doktora w dyscyplinie nauk medycznych.**

dr hab. n farm. Anna Sroka-Bartnicka, prof. UM