

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Kamila Kawonia zatytułowanej „Spektroskopia molekularna i atomowa w badaniach wpływu diety ketogenicznej na rozwój blizny glejowej w modelu in vivo uszkodzenia mózgu”.

Niniejszą recenzję sporządziłem w związku z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki fizyczne nr 4/02/RD/2026 z dnia 19.02.2026 wyznaczającą mnie na recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora Panu Kamilowi Kawoniowi w rozprawie doktorskiej na temat: „Spektroskopia molekularna i atomowa w badaniach wpływu diety ketogenicznej na rozwój blizny glejowej w modelu in vivo uszkodzenia mózgu”, w dziedzinie nauki: Nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie: Nauki fizyczne. Przekazana mi do recenzji praca została wykonana na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo – Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Doktorant wykonał ją pod opieką promotora – Pani prof. AGH dr hab. inż. Joanny Chwiej.

Rozprawę doktorską Pana mgr Kamila Kawonia stanowi cykl czterech publikacji opublikowanych w czasopismach posiadających Impact Factor i znajdujących się w wykazie czasopism Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, co oznacza, że przeszły rygorystyczny proces recenzji eksperckiej. Co prawda doktorant informuje, że jedna z czterech publikacji oznaczona jako S1 znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Jednak w chwili pisania recenzji ww. praca została opublikowana i można ją znaleźć na stronie czasopisma: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2026.127816>. Udział doktoranta w każdej z tych prac został ściśle określony w oświadczeniach współautorów. Doktorant jest pierwszym autorem każdej z czterech publikacji.

U podstaw badań objętych rozprawą doktorską leżą poszukiwania terapii urazowego uszkodzenia mózgu (ang. traumatic brain injury, TBI), która mogłaby minimalizować długofalowe następstwa. Jedną z proponowanych terapii jest wykorzystanie diety ketogenicznej (ang. ketogenic diet, KD), która stosowana jest w leczeniu padaczki lekoopornej. Jednak skuteczność leczenia w urazowym uszkodzeniu mózgu okazuje się zależeć od płci oraz momentu wdrożenia terapii. Ta sytuacja stała się motywacją do podjęcia badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej, których nadrzędnym celem było określenie wpływu diety ketogenicznej na proces formowania się blizny glejowej w mózgu poprzez analizę zmian w składzie molekularnym tkanki i w zawartości biologicznie istotnych pierwiastków. W badaniach wykorzystano mikrospektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared microspectroscopy, FTIRM) i spektroskopię Ramana (ang. Raman spectroscopy, RS) do charakterystyki zmian molekularnych oraz fluorescencję rentgenowską ze wzbudzeniem synchrotronowym (ang. synchrotron X-ray fluorescence, SR-XRF) i fluorescencję rentgenowską całkowitego odbicia (ang. total reflection X-ray fluorescence, TXRF) do jakościowej, ilościowej, topograficznej i globalnej analizy składu pierwiastkowego. W ramach ww. głównego celu doktorant wyróżnił pięć celów szczegółowych. Pierwszy z nich dotyczył oceny przydatności i zakresu stosowalności ww. metod w analizie próbek biologicznych z modeli doświadczalnych uszkodzenia mózgu. Drugi polegał na określeniu zmian w dystrybucji biomolekuł w tkance mózgowej szczurów zachodzących w odpowiedzi na uraz i dietę ketogeniczną. Trzecim celem szczegółowym była analiza zmian w dystrybucji pierwiastków istotnych biologicznie w tkance mózgowej szczurów po urazie w warunkach diety ketogenicznej, z uwzględnieniem płci zwierząt stosując fluorescencję rentgenowską ze wzbudzeniem synchrotronowym. Czwarty cel szczegółowy polegał na ocenie zmian w akumulacji pierwiastków istotnych biologicznie w wątrobie, nerkach i śledzionie, zachodzących na skutek diety ketogenicznej, uwzględniając płć zwierząt, przy zastosowaniu fluorescencji rentgenowskiej

całkowitego odbicia. Ostatnim piątym celem szczegółowym była identyfikacja modyfikacji molekularnych i pierwiastkowych będących efektem diety ketogenicznej w procesie formowania blizny glejowej.

Charakterystyka badań

Pierwsza publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej (oznaczona symbolem A1), zatytułowana „The methods of vibrational microspectroscopy reveals long-term biochemical anomalies within the region of mechanical injury within the rat brain”, ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. W pracy tej zidentyfikowano anomalie w składzie i strukturze molekularnej tkanki mózgowej, powstające w wyniku lokalnego urazu kory i charakterystyczne dla w pełni uformowanej blizny glejowej. Badania te oparto na mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera i spektroskopii Ramana. Zaobserwowano spadek zawartości grup fosforanowych związanych z fosfolipidami i kwasami nukleinowymi, zmniejszenie udziału łańcuchów alifatycznych pochodzących od lipidów oraz obniżenie zawartości cholesterolu i jego estrów, przy jednoczesnym wzroście całkowitej zawartości białek w obszarze blizny glejowej w porównaniu z nieuszkodzoną korą. Natomiast zmiany strukturalne dotyczyły zwiększenia udziału struktur β w drugorzędowej strukturze białek i zmniejszenie stopnia rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych lipidów. Podsumowując, warto podkreślić, że praca A1 pokazała, że zastosowane spektroskopie stanowią skuteczne narzędzia do wykrywania zmian biochemicznych zachodzących w mózgu po urazie. Poza tym badania dostarczyły informacji na temat molekularnych mechanizmów towarzyszących procesowi bliznowacenia glejowego i wskazały grupy biomolekuł najbardziej podatne na zmiany po urazie mózgu.

Druga publikacja (oznaczona symbolem A2), zatytułowana „Ketogenic diet influence on the elemental homeostasis of internal organs is gender dependent”, ukazała się w czasopiśmie *Scientific Reports* w 2023 roku. W pracy tej przeanalizowano wpływ długotrwałego stosowania diety ketogenicznej na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych oraz oceniono, czy efekty te zależą od płci zwierząt. Badania przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar, które przez 33 dni były poddane diecie ketogenicznej, natomiast grupa kontrolna była karmiona standardową paszą laboratoryjną. W zasadniczych badaniach określono stężenia pierwiastków takich jak P, S, K, Ca, Fe, Cu, Zn i Se w narządach zwierząt, przy użyciu fluorescencji rentgenowskiej całkowitego odbicia, stosując jako standard wewnętrzny gal, pierwiastek naturalnie nieobecny w organizmach żywych. Wykazano, że w wątrobie samców dieta spowodowała obniżenie stężeń niemal wszystkich analizowanych pierwiastków z wyjątkiem Fe, natomiast u samic zmiany podlegały głównie pierwiastki o wyższych liczbach atomowych, takie jak Cu, Zn i Se. W nerkach samców dieta spowodowała wzrost stężeń Fe, Zn i Ca, podczas gdy u samic zaobserwowano podwyższone poziomy P i Ca. Najmniejsze zmiany występowały w śledzionie – u obu płci dieta wiązała się ze zwiększeniem zawartości Fe i S. Końcowym ważnym wnioskiem wypływającym z badań było, że długotrwałe stosowanie diety ketogenicznej znacząco wpływa na homeostazę pierwiastkową narządów wewnętrznych, a reakcja organizmu jest zależna od płci. Zatem nie wszystkie zaobserwowane zmiany da się wyjaśnić wyłącznie różnicami w składzie pokarmu, co sugeruje istotną rolę procesów metabolicznych i regulacji hormonalnej w kształtowaniu zmian pierwiastkowych.

Trzecia publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej (oznaczona symbolem A3) nosi tytuł: „Vibrational spectroscopy methods reveal biochemical changes associated with the glial scar formation after traumatic brain injury”. Artykuł ten został opublikowany w 2025 roku w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Praca A3 dotyczy monitorowania dynamiki zmian molekularnych w korze mózgowej szczurów po urazowym uszkodzeniu mózgu i oceny różnic, z którymi te procesy zachodzą u samców i samic. W badaniach wykorzystano

komplementarne techniki spektroskopii wibracyjnej - mikrospektroskopię w podczerwieni z transformatą Fouriera i spektroskopię Ramana. W obszarze uszkodzenia odnotowano obniżony poziom związków zawierających grupy fosforanowe oraz cholesterolu i jego estrów, co świadczy o naruszeniu integralności błon komórkowych. Potwierdzono również zmiany konformacyjne białek tj. wzrost względnej zawartości białek o strukturze drugorzędowej β , szczególnie na początku formowania się blizny, z tendencją do normalizacji po 30 dniach od urazu. Obniżona zawartość nienasyconych lipidów w bliznie była obserwowana głównie u samic, co świadczy o występowaniu różnic pomiędzy płciami w przebiegu procesów naprawczych. Poza tym potwierdzono większą wrażliwość samic na pojawienie się uszkodzenia, szczególnie w zakresie estryfikacji i stopnia nienasylenia lipidów.

Czwarta publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej (oznaczona symbolem S1) nosi tytuł: „Modulatory role of the ketogenic diet in glial scar formation after traumatic brain injury – FTIR, Raman and X-ray fluorescence microscopy study”. Artykuł ukazał się w 2026 roku w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Praca ta stanowi bezpośrednią kontynuację oraz rozwinięcie badań opisanych wcześniej w publikacji A3. W pracy S1 poddano analizie wpływ diety ketogenicznej oraz płci na dynamikę zmian molekularnych i pierwiastkowych zachodzących w obrębie blizny glejowej. Do badania zmian molekularnych wykorzystano ten sam model uszkodzenia mózgu, co w pracy A3 i techniki mikrospektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera i spektroskopii Ramana. Natomiast do oceny rozkładu pierwiastków w tkance mózgowej zastosowano fluorescencję rentgenowską ze wzbudzeniem synchrotronowym. Techniki spektroskopowe wykazały wpływ diety ketogenicznej na skład biomolekularny regionów kory sąsiadujących z miejscem urazu. Stwierdzono zmniejszoną akumulację cholesterolu i jego estrów i związków zawierających grupy fosforanowe w rejonie uszkodzenia mózgu u samic, które poddano diecie ketogenicznej. U samic dodatkowo zaobserwowano wpływ diety ketogenicznej na nienaruszoną korę mózgową objawiający się podwyższonym poziomem cytochromu C, estryfikacji lipidów i amidu III. Natomiast u zwierząt obojga płci stwierdzono podwyższenie poziomu stopnia nienasylenia lipidów. Zaobserwowane u samic zmiany wykazywały tendencję do normalizacji w okresie do 30-tego dnia po urazie. W trakcie formowania blizny glejowej, niezależnie od płci i diety, najbardziej wyraźne zmiany dotyczyły Ca, którego stężenie gwałtownie wzrastało już od drugiego dnia po urazie i malało pod koniec obserwacji. Stężenia Fe i Cu charakteryzowały się niskim poziomem we wczesnych etapach formowania blizny, ze wzrostem od ósmego dnia po urazie. Dane uzyskane w pracy S1 stanowią podstawę do badań nad mechanizmami regeneracji mózgu po urazach z uwzględnieniem wpływu diety ketogenicznej i czynników biologicznych.

Ocena merytoryczna

Doktorant wykazał się głęboką wiedzą na temat technik pomiarowych stosowanych w fizyce atomowej i medycznej, stosując komplementarne metody badawcze. Wykorzystanie spektroskopii wibracyjnej do identyfikacji zmian w strukturach molekularnych takich jak np. zmiany zawartości białek o strukturze drugorzędowej β i zmniejszenie stopienia rozgałęzienia łańcuchów alifatycznych wymaga zaawansowanej wiedzy z zakresu fizyki cząsteczkowej i umiejętności interpretacji widm. Zastosowanie wzbudzenia synchrotronowego oraz techniki całkowitego odbicia świadczy o umiejętności pracy doktoranta z promieniowaniem o wyższej energii niż jest to w spektroskopii wibracyjnej, zaś przeprowadzona analiza jakościowa i ilościowa pierwiastków dowodzi rozumieniu przez doktoranta fizyki atomowej. Chciałbym zauważyć, że prezentowane w ramach rozprawy doktorskiej badania są kompleksowe. Doktorant przeprowadził pełną ścieżkę badawczą. Takie podejście dowodzi dojrzałości naukowej doktoranta i umiejętności projektowania złożonych eksperymentów.

Doktorant podjął istotny i aktualny problem medyczny – poszukiwanie terapii minimalizującej skutki urazowego uszkodzenia mózgu poprzez dietę ketogeniczną. Połączenie mikrospektroskopii w podczerwieni i spektroskopii Ramana z metodami rentgenowskimi pozwoliło na unikalną,

wielopoziomową analizę zmian molekularnych i pierwiastkowych w obszarze uszkodzonego urazowo obszaru mózgu szczura, której nie dałoby się uzyskać tradycyjnymi metodami biologicznymi jak immunohistochemia i barwienia histologiczne. Autor nie ograniczył się tylko do mózgu, ale zbadał również wpływ diety na homeostazę narządów wewnętrznych: wątroby, nerek i śledziony, co stanowi całościowe ujęcie wpływu terapii na organizm.

Kluczowym elementem świadczącym o oryginalności jest uwzględnienie pici jako determinantu skuteczności terapii i przebiegu procesów patologicznych. Badania wykazały, że reakcja na dietę ketogeniczną oraz dynamika formowania się blizny glejowej różnią się u samców i samic szczurów. Odkrycie większej wrażliwości samic na uszkodzenia objawiającej się zmniejszoną akumulacją cholesterolu i jego estrów i związków zawierających grupy fosforanowe w rejonie uszkodzenia mózgu oraz specyficznością odpowiedzi metabolicznych na dietę ketogeniczną stanowi istotny wkład w rozwój medycyny personalizowanej.

Uwagi

W każdej z czterech publikacji wykorzystano akronim TBI (ang. traumatic brain injury), oznaczający urazowe uszkodzenie mózgu. Warto jednak zauważyć, że ten sam skrót jest powszechnie stosowany w medycynie na określenie techniki napromieniania całego ciała (TBI, ang. total body irradiation), wykorzystywanej w radioterapii przed przeszczepieniem szpiku kostnego. Współistnienie obu tych znaczeń w literaturze naukowej od lat generuje błędy i nieporozumienia, co jest szczególnie widoczne podczas przeszukiwania bibliograficznych baz danych, takich jak Web of Science. Szkoda, że autor rozprawy doktorskiej nie podjął próby doprecyzowania stosowanej nomenklatury. W celu uniknięcia kolizji terminologicznej zasadne byłoby wprowadzenie unikalnego oznaczenia dla urazów mózgu, na przykład w formie skrótu TBrI.

Wszystkie eksperymenty opisane w rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Niestety, w żadnym z czterech dołączonych artykułów nie zamieszczono wyczerpującej dyskusji dotyczącej ekstrapolacji uzyskanych wyników na organizm człowieka. Moje zastrzeżenie nie odnosi się do samej metodologii wywoływania uszkodzeń, lecz do specyfiki procesów biochemicznych zachodzących w mózgu. Należy podkreślić, że mózg szczura wykazuje istotne różnice względem ludzkiego — nie tylko w aspekcie makroskopowym (rozmiar i neuroanatomia), ale przede wszystkim w zakresie neurochemii oraz dynamiki zachodzących reakcji metabolicznych.

Wnioski końcowe i rekomendacja

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójne i wartościowe studium badawcze o dużym znaczeniu praktycznym, wpisujące się w nurt nowoczesnej fizyki medycznej. Wybór formy rozprawy w postaci cyklu publikacji w renomowanych czasopismach posiadających Impact Factor świadczy o wysokiej jakości uzyskanych wyników oraz ich uznaniu przez międzynarodowe środowisko naukowe.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z późniejszymi zmianami. **Wnioskuje o dopuszczenie rozprawy doktorskiej Pana mgr Kamila Kawonia do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.**

Adam Kowefut