

prof. dr hab. Marek Pajek
Instytut Fizyki
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach

Kielce, 20 października 2023 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Kai Piany pt. „Diagnostyka pierwiastkowych i molekularnych zmian narządowych u otyłych szczurów, poddanych przezczaszkowej elektrostymulacji prądem stałym (tDCS), z wykorzystaniem technik spektroskopowych opartych na promieniowaniu X i podczerwieni”

Pani mgr inż. Kaja Piana, doktorantka na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie, przygotowała rozprawę doktorską zatytułowaną „Diagnostyka pierwiastkowych i molekularnych zmian narządowych u otyłych szczurów, poddanych przezczaszkowej elektrostymulacji prądem stałym (tDCS), z wykorzystaniem technik spektroskopowych opartych na promieniowaniu X i podczerwieni” pod opieką naukową dr hab. inż. Magdaleny Szczerbowskiej-Boruchowskiej, prof. AGH.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa ma charakter interdyscyplinarny i dotyczy wykorzystania technik spektroskopowych z zakresu promieniowania X i podczerwieni do badania narządowych zmian pierwiastkowych i molekularnych u otyłych szczurów poddanych elektrostymulacji. Jest to ważna tematyka badawcza umożliwiającą wyjaśnienie procesów fizjologicznych związanych z otyłością na poziomie biochemicznym umożliwiając zarówno diagnostyką takich zmian, jak i w dalszej perspektywie, terapię takiego schorzenia, na przykład, stosując elektrostymulację. Interdyscyplinarna natura rozprawy implikuje jej dwoisty charakter dotyczący z jednej strony aspektów fizycznych wykorzystania metod spektroskopowych z zakresu promieniowania rentgenowskiego i podczerwieni do badania, odpowiednio, składu pierwiastkowego i molekularnego badanych narządów. Z drugiej strony istotną częścią rozprawy są aspekty biologiczne (motywacja badań, dobór i preparatyka próbek, interpretacja i znaczenie osiągniętych wyników). Należy podkreślić, że znaczną rolę w opisanych w rozprawie badaniach odgrywają zaawansowane metody statystyczne analizy wyników pomiarów, których wykorzystanie umożliwi ostateczną interpretację wyników przeprowadzonych badań w kontekście biologicznym. Interdyscyplinarny charakter recenzowanej rozprawy powoduje, że w przygotowanej recenzji koncentruję się głównie na aspektach fizycznych wykorzystywanych metod spektroskopowych badania składu pierwiastkowego i stanu molekularnego badanych próbek, z uwzględnieniem stosowanych metod statystycznych analizy wyników pomiarów. Spodziewam się natomiast, że aspekty biologiczne opisanych w rozprawie badań będą dokładniej analizowane przez innych specjalistów powołanych do oceny niniejszej rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr inż. Kai Piany została przygotowana została w sposób odzwierciedlający wszystkie istotne etapy prowadzonych badań (cel i specyfika badań, aparatura i metodyka, analiza statystyczna wyników pomiarów, interpretacja i znaczenie wyników). Rozprawa jest bardzo obszerna, liczy 219 stron obejmujących 5 rozdziałów, spisy rysunków i tabel oraz bibliografię obejmującą 225 pozycji literaturowych dobrze opisujących aktualny stan wiedzy, zarówno w aspekcie fizycznym jak i biologicznym prowadzonych badań. Materiał graficzny zawarty w rozprawie dobrze ilustruje omawiane zagadnienia i osiągnięte wyniki. Układ rozprawy jest przejrzysty, prezentowane zagadnienia są szczegółowo i jasno omawiane, poza drobnymi nieścisłościami omawianymi w dalszej części recenzji. Znaczną część rozprawy (ok. 90 stron) stanowi szczegółowe omawianie wyników i ich znaczenia w kontekście biologicznym, co znacznie przewyższa, raczej skrótową dyskusję stosownych fizycznych metod spektroskopowych (ok. 20 stron). Jest to z jednej strony związane z interdyscyplinarnym charakterem rozprawy, jak i z bardzo szerokim zakresem podjętych badań (ilość

narządów, metod, pierwiastków, molekuł), co z drugiej strony, nie powinno, w mojej opinii, uszczuplać opisu podstaw fizycznych stosowanych metod spektroskopowych. Na przykład, brakuje mi w rozprawie dokładniejszego opisu zjawiska całkowitego odbicia zewnętrznego promieniowania rentgenowskiego na granicy dwóch ośrodków, będącego podstawą metody TXRF.

Opisane w rozprawie badania dotyczą diagnostyki pierwiastkowej i molekularnej wielonarządowych zmian u otyłych szczurów poddanych elektrostymulacji przeczaszkowej (tDCS) metodami spektroskopii rentgenowskiej i podczerwieni. W szczególności do badania składu pierwiastkowego próbek wykorzystane były dwie techniki fluorescencji rentgenowskiej (XRF): 1) wzbudzając charakterystyczne promieniowanie X promieniowaniem synchrotronowym (metoda SRXRF) oraz 2) wykorzystując zjawisko całkowitego odbicia zewnętrznego wzbudzającego promieniowania rentgenowskiego na granicy dwóch ośrodków (metoda TXRF). Pomiary wykonane metodą SRXRF zostały przeprowadzone na synchrotronie ELETTRA we Włoszech, gdzie istotnym aspektem była dostępność mikrowiązki wzbudzającego promieniowania rentgenowskiego, co umożliwiło badanie wybranych małych obszarów próbek mózgu szczurów. Natomiast pomiary wykonane techniką TXRF, szczególnie nadające się do badania śladowych koncentracji pierwiastków w próbkach biologicznych, zostały przeprowadzone wykorzystując komercyjny spektrometr Nanohunter II firmy Rigaku. Pomiary przeprowadzone metodami SRXRF i TXRF umożliwiły badanie szeregu pierwiastków w narządach szczurów w zakresie od sodu (Na) do rubidu (Rb).

Badania zmian strukturalnych na poziomie molekularnym zostały przeprowadzone metodami absorpcji promieniowania podczerwonego (IR) umożliwiającymi określenie struktury molekuł poprzez pomiary częstości drgań charakterystycznych dla wiązań chemicznych występujących w danej molekule. Pomiary te wykonywane były techniką FTIR tzn. wykorzystując transformację Fouriera obrazu interferencyjnego mierzonego w szerokim zakresie wektora falowego promieniowania podczerwonego (4000-400 1/cm). W pomiarach tych wykorzystywany był tryb transfleksyjny (odbiciowy), umożliwiający osiągnięcie mikrometrowej zdolności rozdzielczej, oraz wieloodbiciowy tryb HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance), wykorzystujący wielokrotne odbicie wewnętrzne wzbudzającego promieniowania podczerwonego, co umożliwiło badanie struktury molekuł w większych obszarach próbek.

Istotnym elementem przeprowadzonych badań była skomplikowana preparatyka badanych narządów w celu otrzymania próbek w postaci optymalnej dla stosowania wybranych technik spektroskopowych. Ważnym aspektem opisanych w rozprawie badań Doktorantki jest analiza statystyczna wyników oraz ich eksploracja w celu wyodrębnienia dominujących czynników będących indykatorami badanej otyłości szczurów. W tym celu szeroko stosowane były różnorodne testy statystyczne, w szczególności nieparametryczne, oraz zaawansowane metody analizy danych takiej jak ART (Aligned Rank Transform), ANOVA (Analysis of Variance), PCA (Principal Component Analysis) oraz wykorzystująca metody uczenia maszynowego analiza krzywych ROC (Receiver Operating Characteristic). Podsumowując zakres i metody badań prowadzonych przez Doktorantkę należy podkreślić, że przedstawione w rozprawie badania o charakterze interdyscyplinarnym wymagały zapoznania się z wieloma technikami i metodami badawczymi z zakresu fizyki, statystyki i biologii, co jest ważnym i bardzo cennym aspektem ocenianej rozprawy doktorskiej.

W recenzowanej rozprawie znajdują pewne nieścisłości oraz kwestie wymagające omówienia lub skomentowania przez Doktorantkę w czasie obrony rozprawy. Wynika to, z jednej strony, z obowiązku recenzenta, jak również z chęci zwrócenia uwagi Doktorantki na pewne kwestie nie dyskutowane w rozprawie, które mogą być uwzględniane w przyszłych badaniach tego typu. Przytoczone poniżej uwagi dotyczą głównie aspektów fizycznych rozprawy.

Wyniki pomiarów spektroskopowych SRXRF/TXRF/FTIR poddawane były wstępnemu „czyszczeniu, odrzucając i usuwając wartości odstające” (str. 26) stosując testy statystyczne zakładające rozkład

normalny (Gaussa) wyników. W istocie wiadomo, że w próbkach biologicznych dominują rozkłady log-stabilne, dla których typowe jest pojawianie się wartości znacznie odbiegających od typowych (tzw. „ciężkie ogony”), co wynika z uogólnionego centralnego twierdzenia granicznego zastosowanego do losowych procesów multiplikatywnych dobrze modelujących procesy biologiczne. Jakże wpływ mogą mieć przytoczone argumenty na analizę statystyczną wyników przedstawioną w rozprawie? Dodatkowo, czy w dyskutowanych wynikach pojawiały się przypadki „cenzurowania” (tzn. brak wyniku pomiaru w przypadku wartości będącej poniżej granicy wykrywalności) wymagające uwzględnienia w analizie statystycznej?

„Wprowadzenie teoretyczne” na str. 34 nie jest w istocie teoretyczne, będąc raczej omówieniem jakościowym stosowanych metod SRXRF/TXRF. Na przykład, pojawia się tutaj tajemnicza wartość kąta nachylenia próbki do kierunku wzbudzającego promieniowania X w metodzie TXRF wynosząca 0.06° , która w dalszej części rozprawy będzie wynosić 0.01° , a pojęcie kąta krytycznego nie jest wprowadzone. Ponadto, czy rzeczywiście w przypadku metody TXRF nie obserwuje się efektów matrycy?

W opisie „Oddziaływania promieniowania X z materią” (str. 34 i następne) znajdują kilka nieścisłości:

1) przytoczony przekrój czynny na absorpcję fotoelektryczną (równanie 5.2) ma charakter przybliżony i stosuje się jedynie do powłoki K (w ogólnym przypadku pojawia się zależność od orbitalnej liczby kwantowej l),

2) nie każdemu przeskokowi elektronu z poziomu wyższego na niższy „towarzyszy emisja promieniowania charakterystycznego, czyli fluorescencja” (str. 35), gdyż konkurencyjnym procesem jest emisja elektronu Augera omówiona na następnej stronie (nawiasem mówiąc w tym procesie elektron nie musi być emitowany „z tego samego wyższego poziomu” (str. 36),

3) stwierdzenie że linie „promieniowania charakterystycznego (serii) L, M i N bardzo często zachodzą na siebie” (str. 36) nie jest ogólnie prawdziwe, w szczególności, w pomiarach z wysoką zdolnością rozdzielczą (spektrometry dyfrakcyjne!).

W dalszej części rozprawy w opisie ważnego równania 5.6 niejasne jest użycie terminów „wewnętrzna wydajność/zdolność rozdzielcza” czy „kąt odbicia”, co wymaga wyjaśnienia. Na rys. 6.6 prezentującym w skali logarymicznej granice wykrywalności (\overline{LOD}) w zależności od liczby atomowej pierwiastka na osi (\overline{LOD}) zgubiona jest jedna dekada (!), co prowadzi do sprzeczności z wartościami zawartymi w Tabeli 6.1. Dodatkowo, stosowana w rozprawie metoda estymacji niepewności wyznaczonej wartości (\overline{LOD}), oznaczanej w rozprawie jako $u(\overline{LOD})$ (równia 6.6 i 7.5), wydaje się być nieuzasadniona, gdyż niepewności (\overline{LOD}) mają w istocie naturę systematyczną. Potwierdza to pośrednio Tabela 7.1 gdzie znajdujemy że wartości $u(\overline{LOD}) \ll \overline{LOD}$, co bynajmniej nie oznacza że (\overline{LOD}) są tak precyzyjnie wyznaczone.

Przedstawione powyżej uwagi, oraz sugestie wymagające wyjaśnienia, nie wpływają na ogólne znaczenie wyników przedstawionych w rozprawie, której głównym celem było zbadanie możliwości zastosowania metod spektroskopowych z zakresu promieniowania rentgenowskiego i podczerwonego do śledzenia badania zmian pierwiastkowych i molekularnych w wybranych narządach szczurów w kontekście diagnostyki stanu ich otyłości z uwzględnieniem procesu elektrostymulacji mózgowej. Badania Doktorantki pokazały że wykorzystywane w rozprawie techniki SRXRF, TXRF oraz FTIR dają możliwość wielonarządowego monitorowania otyłości szczurów na poziomie biochemicznym, co jest istotnym rezultatem badawczym. Przedstawiona mi do oceny rozprawa jest dobrym przykładem badań interdyscyplinarnych wykorzystujących zaawansowane techniki fizyczne do badania złożonych procesów fizjologicznych zwierząt, co w przyszłości może doprowadzić do lepszego poznania fizjologii człowieka.

Podsumowując, uważam że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kai Piany pt. „*Diagnostyka pierwiastkowych i molekularnych zmian narządowych u otyłych szczurów, poddanych przezczaszkowej elektrostymulacji prądem stałym (tDCS), z wykorzystaniem technik spektroskopowych opartych na promieniowaniu X i podczerwieni*” opisująca obszerne i wartościowe badania interdyscyplinarne spełnia wszelkie wymagania stawiane kandydatom do uzyskania stopnia naukowego doktora wymagane w „Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym”. Z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

