



Kraków 03.05.2023

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

prof. dr hab. Paweł Korecki
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński
Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków
Tel: +48 12 664 4627
e-mail: pawel.korecki@uj.edu.pl

Wydział
Fizyki
Astronomii
i Informatyki
Stosowanej

**Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Pauli Kasprzyk
pt. „Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the
quest of new tissue markers of neuromuscular diseases”**

Praca doktorska pani mgr Pauli Kasprzyk pt. „Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the quest of new tissue markers of neuromuscular diseases” została przygotowana na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH. Promotorami pracy są prof. dr hab. inż. Marek Lankosz z Katedry Fizyki Medycznej i Biofizyki ww. wydziału oraz prof. dr hab. Dariusz Adamek z Katedry Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Recenzowana praca jest złożona w formie rozprawy i dyskutuje zmiany w składzie pierwiastkowym i zmiany biomolekularne w dysfunkcyjnej tkance mięśniowej i poszukuje nowych markerów chorób mięśni. Próbki tkanki mięśniowej uzyskano z użyciem biopsji od 24 pacjentów. Analiza histopatologiczna została wykonana w Zakładzie Neuropatologii CM UJ i pozwoliła na wstępną klasyfikację badanych próbek do grupy referencyjnej oraz do grup miopatii i dystrofii. Przeprowadzone badania zostały zatwierdzone przez Komisję Etyczną CM UJ.

Podstawowymi metodami badawczymi użytymi w pracy są rentgenowska spektromikroskopia fluorescencyjna i spektromikroskopia w podczerwieni. Spektroskopowe pomiary rentgenowskie wykonywane były z użyciem promieniowania synchrotronowego w ośrodkach Diamond i DESY. Spektroskopowe pomiary podczerwone wykonywane były zarówno na synchrotronie Diamond, jak i z użyciem spektrometrów laboratoryjnych.

Tematyka pracy jest interesująca. W szczególności, może o tym świadczyć przyznanie czasu pomiarowego na synchrotronowych liniach badawczych. Procedura przyznawania czasu badawczego na synchrotronach jest wysoko selektywna, a w

ul. prof. Stanisława
Łojasiewicza 11
PL 30-348 Kraków
tel. +48(12) 664-48-90
fax +48(12) 664-49-05
e-mail:
wydzial.fais@uj.edu.pl

skład zespołów oceniających wchodził uznani eksperci, którzy najwyraźniej wysoko ocenili wnioski związane z doktoratem pani mgr Pauli Kasprzyk.

Część pracy dotycząca badań synchrotronowych z użyciem rentgenowskiej spektroskopii fluorescencyjnej została opublikowana w artykule naukowym [P. Kasprzyk, P.M. Wróbel, J. Dudała, K. Geraki, M. Szczerbowska-Boruchowska, E. Radwańska E., Krzyżewski R.M., D. Adamek, M. Lankosz, *Elemental Composition of Skeletal Muscle Fibres Studied with Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence (SR-XRF)*, International Journal of Molecular Sciences, 23 (2022), 7931] wydawnictwa MDPI, w którym doktorantka jest pierwszym autorem. Artykuł ten nie jest cytowany w rozprawie. Brak cytowania artykułu jest zaskakujący, ale kwalifikuję go jako zwykłe przeoczenie. Część badań dotyczących spektroskopii FTIR nie została do tej pory opublikowana.

Rozprawa liczy 116 stron i składa się z dziesięciu rozdziałów (dwa ostatnie to spis literatury liczący 61 pozycji oraz spis rysunków oraz tabel). Językiem pracy jest angielski. Tekst jest zrozumiały i w większości dobrze napisany i jedynie w niektórych częściach pracy występują błędy językowe. Ogólny układ pracy jest logiczny i zgodny z zasadami przyjętymi podczas pisania tez naukowych. Dwa pierwsze rozdziały zawierają wstęp oraz klarownie prezentują motywację pracy. Kolejne dwa rozdziały to krótkie omówienie aspektów biologicznych i zasady metod fizycznych użytych w pracy. Rozdział 5 omawia szczegóły eksperymentalne oraz metody analizy statystycznej użytej do opracowania danych. Wyniki uzyskane przez doktorantkę zaprezentowane są w Rozdziale 6, z podziałem na wyniki uzyskane przy użyciu promieniowania rentgenowskiego i podczerwonego. Dyskusja wyników zawarta jest w pięciostronicowym Rozdziale 7, a Podsumowanie w Rozdziale 8.

Mam jedynie drobne zastrzeżenia do układu pracy. Po pierwsze, mechanizm generowania promieniowania synchrotronowego pojawia się dopiero (nieco zaskakująco) w części poświęconej konstrukcji spektrometru FTIR (rozdział 4.2.3), a powinien być wspomniany już przy wprowadzaniu metod rentgenowskich. Co więcej, krótka wzmianka o urządzeniach wstawkowych (tj. wiggler i undulator) pojawia się właśnie w tym rozdziale, podczas gdy linie IR na synchrotronach używają zwykle magnesów zakrzywiających. Po drugie, ściśle związane ze sobą tematycznie podrozdziały 4.1.3 i 4.1.5 są niepotrzebnie „rozdzielone” rozdziałem 4.1.4 pobieżnie opisującym rentgenowskie elementy optyczne. Podczas gdy Rozdział 4.1.3 wprowadza analityczne wyrażenia na obliczanie intensywności fluorescencji rentgenowskiej, to podrozdział 4.1.5 rozważa przybliżenie cienkich próbek korzystające z wyników podrozdziału 4.1.3. Ten układ podrozdziałów zaburza nieco odbiór pracy i jasność przekazu. Podkreślę jednak, że całościowo praca jest przygotowana bardzo starannie.

Głównym rezultatem doświadczeń przeprowadzonych przez doktorantkę jest zaobserwowanie różnic w składzie pierwiastkowym i bimolekularnym pomiędzy grupą referencyjną a tkankami sklasyfikowanymi wcześniej jako próbki z miopatią i dystrofią. W szczególności, doktorantka zauważyła największe różnice w zawartości

pierwiastków takich jak fosfor, potas, wapń i chrom pomiędzy włóknami mięśniowym z tkanek zdrowych i z tkanek z widocznymi zmianami patologicznymi. Statystycznie istotne były też różnice pomiędzy włóknami pochodzącymi z próbek sklasyfikowanych jako miopatie i dystrofie, a próbki zakwalifikowane do grupy dystrofii wykazywały najmniejszy sygnał od badanych pierwiastków. Różnice w składzie pierwiastkowym zaobserwowano również podczas wysokorozdzielczego eksperymentu przeprowadzanego w DESY obrazującego i określającego skład pierwiastkowy tkanki łącznej. Warto równocześnie podkreślić, że w pracy wykonano jedynie badania porównawcze, bez określania ilościowej zawartości pierwiastków we włóknach mięśniowych.

Analiza tkanki mięśniowej z użyciem spektroskopii FTIR również pokazała statystycznie istotne różnice w składzie biomolekularnym badanych próbek dla wszystkich badanych grup. Jednocześnie Doktorantka zaobserwowała wyższą zawartość białka we włóknach hipertroficznym oraz zamianę tkanki mięśniowej w tkankę tłuszczową we włóknach atroficznych. Co więcej, spektroskopowe pomiary w podczerwieni zostały przeprowadzone przed i po pomiarach rentgenowskich. Pozwoliło to na zbadanie i wykluczenie powstawania istotnych zmian radiacyjnych w badanych próbkach.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona w sposób wzorcowy i niewątpliwie jest mocną stroną pracy. Autorka używa dobrze dobranych testów nieparametrycznych i w sposób bardzo umiejętny klasyfikuje dane z użyciem wielowymiarowej analizy dyskryminacyjnej. W końcowym kroku analizy Doktorantka przeprowadza zawsze tzw. klasyfikację wsteczną, porównując wyniki uzyskane metodami fizycznymi z klasyfikacją histopatologiczną.

Podczas czytania pracy nasunęły mi się wymienione poniżej pytania i uwagi. Chciałbym prosić doktorantkę o odpowiedzi i/lub ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

1. W pracy doktorskiej zauważyłem brak cytowań do innych prac badających skład pierwiastkowy tkanki mięśniowej. Zgodnie z dobrymi praktykami powinna być np. zacytowana stara praca: C. Maunder-Sewry, R. Gorodetsky, R. Yarom, V. Dubowitz, Element Analysis Of Skeletal Muscle In Duchenne Muscular Dystrophy Using X-Ray Fluorescence Spectrometry 3, Muscle & Nerve, (1980), 3502. Co więcej nie jest zacytowana praca, w której współautorami są promotorzy doktorantki, a dotycząca badania składu pierwiastkowego mięśni metodą PIXE, w której także rejestrowany jest sygnał fluorescencji rentgenowskiej : P. Śliż-Szpytma *et al.*, Sub-cellular elemental imaging of human muscle tissues affected by neuromuscular diseases, Nukleonika 66 (2021) 159. Czy istnieją jakieś inne prace o podobnej tematyce?
2. Równanie (16) i jego opis jest dla mnie niejasny. Doktorantka opisuje to równanie (prawdopodobnie błędnie) jako stosunek pomiędzy intensywnością promieniowania charakterystycznego a grubością próbki. Dodatkowo w

mianowniku wyrażenia (16) użyty jest symbol I_{thick} tj. intensywność liczona dla próbki „grubej”. W moim odczuciu, w równaniu (16), zapisany jest stosunek intensywności fluorescencji obliczanej bez przybliżeń i obliczanej z użyciem przybliżenia próbki „cienkiej” (I_{thin}), który następnie jest pokazany dla eksperymentów w Diamond i DESY na Rys. 4. Proszę o komentarz Doktorantki dot. tego zagadnienia i wyjaśnienie wzoru (16).

3. W pracy doktorskiej nie znalazłem informacji na temat intensywności wiązek fotonów w eksperymentach synchrotronowych. Jeśli liczba fotonów w wiązce wzbudzającej jest trudna do określenia, Doktorantka powinna przynajmniej podać całkowite liczby fotonów na sekundę rejestrowanych przez detektory.
4. Po pierwsze, w eksperymencie XRF przeprowadzonym w DESY użyto detekcji w geometrii typu „grazing”. Nie jest wyjaśniony powód wyboru tego typu geometrii. Po drugie, będę wdzięczny za odpowiedź na pytanie do czego służył drugi detektor pokazany na Rys. 9?
5. Widmo z Rys. 22 jest opisane jako widmo XRF z 4 sekundowym czasem akwizycji. Widmo jest praktycznie bezszumowe i prawdopodobnie jest widmem zsumowanym po wszystkich pikselach w obrębie jednego włókna. Proszę o podanie całkowitego czasu akwizycji tego widma.
6. Jedyne mapy rozkładu pierwiastków dla wielu włókien pokazane są na Rys. 21, który jest zmodyfikowaną wersją rysunku z artykułu Doktorantki z 2022 r. Pokazane są tylko dane dla grupy referencyjnej. Doktorat jest idealnym „miejszem” pozwalającym na prezentacje bardziej obszernego zbioru zebranych danych, który mógłby pokazać reprezentatywność analizowanych danych. Żałuję także, że nie pokazano przykładowych map dla tkanek dystroficznych i miopatycznych.
7. Rysunki 24 i 29 pokazują zależności pomiędzy sygnałami XRF z wielu pierwiastków otrzymane dla włókien mięśniowych i tkanki łącznej. Można na nim zaobserwować bardzo dużą korelację na wszystkich pokazanych wykresach. Jest to nieco zaskakujące. Czy taka korelacja nie może być skutkiem zmian w gęstości badanych próbek? Jednocześnie, Rys. 22 i Rys. 27 mogą wskazywać na to, że pik elastyczny / Comptona nie jest dobrze dopasowany. Czy może to wpływać na niedoskonałą normalizację sygnału i niepełne wyeliminowanie zależności sygnału od gęstości?
8. W tkance mięśniowej występują dwa typy włókien (wolno i szybko kurczące się). Włókna takie pokazano zresztą na Rys. 2 w pracy (po odpowiednim barwieniu). Czy podczas badań można było zaobserwować różnice w składzie pierwiastkowy i biomolekularnym między tego typu włóknami? Czy różnica w liczbie włókien poszczególnego typu w różnych próbkach może mieć wpływ na uzyskane wyniki?

Podczas lektury pracy zauważyłem też pewne drobne błędy, nieistotne dla oceny pracy, które z racji obowiązku recenzenta muszę przedstawić. W tytule pracy, na

stronie tytułowej pojawia się niepotrzebnie kropka. W polskim Streszczeniu niezrozumiałe jest niedokończone zdanie zaczynające się „Pierwiastkowy skład endomysium ...”. Na stronie 23 jest błędnie napisane, że atomowych czynnik struktury zmienia się jak Z^2 . Tymczasem, to przekrój czynny jest proporcjonalny do kwadratu liczby atomowej. Strona 25: powinno być „incident” zamiast „incidence”. Pierwsze zdanie na stronie 26 jest niegramatyczne. Strona 27: oprócz procesów załamania i odbicia powinna być wymieniona absorbcja. Na stronie 33 powinno być zapewne „mutually perpendicular” a nie „equally perpendicular” oraz „interfere” zamiast „interference”. Strona 35: „absorption” zamiast „abortion”. Strona 37: „studied” zamiast „studies”. Cytowania referencji 48, 50 i 53 są niekompletne.

Podsumowując, uważam że przedstawiona praca doktorska zawiera ciekawe i oryginalne wyniki i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Pauli Kasprzyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Mam też nadzieje, że podczas publicznej obrony Doktorantka przedstawi dodatkowe informacje, o które proszę w recenzji.

Podpisano przez/ Signed by:
PAWEŁ
KORECKI
Data/ Date: 04.05.2023 13:11
mSzafir

Paweł Korecki

