

Katowice, 5.05.2023

Prof. dr hab. Beata Zawisza
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Instytut Chemii
Szkołna 9, 40-006 Katowice

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Pauli Kasprzyk** pt.

**Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the quest of
new tissue markers of neuromuscular diseases**

zrealizowanej w obszarze nauk ścisłych, dyscyplinie nauk fizycznych na Akademii
Górniczo-Hutniczej w Krakowie
pod kierunkiem promotora **prof. dr hab. inż. Marka Lankosza**
oraz promotora **prof. dr med. Dariusza Adamka**

Badania nad składem pierwiastkowym i molekularnym tkanki mięśniowej traktowanym jako wskaźnik stanu zdrowia należą do interesujących. Powiązanie dysfunkcji tkanki mięśniowej z jej składem chemicznym, a także najdrobniejszymi zmianami pierwiastkowymi i biomolekularnymi mogącymi odzwierciedlać procesy biochemiczne zachodzące we włóknach mięśniowych poszerzają możliwości diagnostyczne oraz możliwości zrozumienie rozwoju choroby na jej wczesnym etapie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została zrealizowana w ramach programu POWER, projekt nr POWR.03.02.00-00-I004/16, współfinansowanego przez Unię Europejską, w zespole uznanych badaczy o dużym doświadczeniu i rozpoznawalności naukowej. Rozprawa doktorska zawiera streszczenie, wprowadzenie, motywację i cel badań badań. Doktorantka w pracy przedstawiła kontekst biologiczny – strukturę mięśnia szkieletowego i choroby mięśni szkieletowych. Oprócz opisu w pracy znalazły się również liczne fotografie mikroskopowych obrazów wybranych tkanek mięśniowych. W pracy Doktorantka przedstawia fizyczne podstawy techniki rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej (XRF), a także spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) w zakresie wymaganym dla realizacji zaplanowanych w pracy badań.



W pracy znalazły się także rozdziały, które Doktorantka poświęciła metodologii badań, przygotowaniu próbek, przetwarzaniu danych i analizie statystycznej. Celem analiz statystycznych było określenie obserwowalnych różnic (zmian) w składzie pierwiastkowym i biomolekularnym próbek mięśni ludzkich dotkniętych zmianami patologicznymi w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych w porównaniu z tkankami referencyjnymi.

W pracy Doktorantka przyjęła sposób klasyfikacji próbek na podstawie wcześniejszej diagnozy patomorfologicznej. Próbki wykazujące oznaki wrodzonej patologii mięśni zostały przypisane do grupy dystrofii (D); wszystkie inne próbki, w których wystąpiły zmiany mięśniowe, zostały przypisane do grupy miopatii (M); natomiast próbki, w których w badaniu histopatologicznym nie stwierdzono zmian mięśniowych stanowiły grupę referencyjną (R). Na potrzeby badań spektroskopowych zamrożone tkanki pocięto w płaszczyźnie prostopadłej i równoległej do osi włókien mięśniowych na skrawki o grubości 8 μm za pomocą kriomikrotomu. Próbki pobrano od pacjentów obojga płci. Średni wiek pacjentów wynosił 44 lata (22 lata - 75 lat). Wszystkie próbki zostały zdiagnozowane w Zakładzie Neuropatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (numer zgody: 1072.6120.249.2020).

Doktorantka za pomocą rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej ze wzbudzeniem synchrotronowym (SR-XRF) wyznaczyła jakościowy i ilościowy skład pierwiastkowy tkanek mięśniowych. Technika ta pozwoliła na obrazowanie rozkładów przestrzennych pierwiastków w badanych próbkach biologicznych. Do wyznaczenia zaś składu biomolekularnego włókien mięśniowych i zobrazowania rozkładu biomolekuł w tkankach mięśniowych wykorzystwała spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Wykorzystując obie wspomniane techniki Doktorantka zbadała zmiany rozmieszczenia pierwiastków i cząsteczek we włóknach mięśniowych zarówno w tkankach dotkniętych chorobą, jak i w tkankach referencyjnych. Doktorantka zbadała również różnicę w składzie chemicznym tkanki łącznej otaczającej włókna, formalnie określanej jako endomysium. Pomiary za pomocą rentgenowskiej spektrometrii fluorescencyjnej ze wzbudzeniem synchrotronowym (SR-XRF) prowadzone były na linii badawczej P06 na obiekcie PETRA III w DESY (skrót Niemiecki Synchrotron Elektronowy) w Hamburgu w Niemczech oraz na linii I18 w ośrodku DIAMOND Light Source w Didcot w Wielkiej Brytanii. Badania za pomocą mikrospektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera prowadzone były przy użyciu komercyjnych spektrometrów z wysokoenergetycznym wzbudzeniem ceramicznym oraz ze wzbudzeniem promieniowaniem synchrotronowym. Pomiary z wykorzystaniem źródła synchrotronowego (SR-FTIR) wykonano na linii B22 w DIAMOND Light Source w Didcot w Wielkiej Brytanii. Pomiary laboratoryjne Doktorantka realizowała na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie przy użyciu spektrometru Thermo Scientific Nicolet iN10 (eksperyment Nicolet iN10), oraz spektrometru Thermo Scientific Nicolet 8700 (eksperyment Nicolet 8700).

Doktorantka zaplanowała również badania w schemacie: pomiary FTIR, pomiary SR-XRF, a następnie ponowne pomiary FTIR. Wymieniona kolejność badań umożliwiła pomiary w tych samych obszarach próbek i analizę wpływu ewentualnych uszkodzeń radiacyjnych na wyniki. Badania uszkodzeń radiacyjnych w próbkach wykonano używając spektrometru FTIR sprzężonego z mikroskopem podczerwieni.

Do określenia zawartości oraz rozkładu składu pierwiastkowego włókien mięśniowych człowieka oraz endomysium, jak już wspominałam wykorzystano technikę SR-XRF. Ze względu na ograniczenia czasowe dla wysokorozdzielczej analizy dużych obszarów próbek oraz ograniczony dostęp do urządzeń synchrotronowych Doktorantka przeprowadziła dwa różne eksperymenty z różną rozdzielczością przestrzenną. Niższa rozdzielczość – 5 μm w Synchrotronie DIAMOND została wykorzystana do zobrazowania dużych obszarów próbek takich jak całe włókna mięśniowe, natomiast wyższa, submikronowa rozdzielczość – 300 nm w Synchrotronie DESY, została wykorzystana do szczegółowego obrazowania obszarów granicznych pomiędzy włóknami mięśniowymi a endomysium. Technika XRF pozwoliła Doktorantce na oznaczenie pierwiastków charakterystycznych dla próbek biologicznych, takich jak Cl, P, K, S, Ca oraz śladowych ilości Fe, Zn, Mn, Cu, Cr i Br. Z punktu widzenia prowadzonego pomiaru XRF, istotna jest grubość próbki, a co za tym idzie efekty matrycowe wpływające na wyniki analiz. Biorąc pod uwagę fakt, że próbki biologiczne składają się głównie z H, C, N i O należy rozważyć ich wpływ (głównie absorpcję pierwotnego i wtórnego promieniowania rentgenowskiego), na natężenie promieniowania charakterystycznego analitów. Zgodnie z wynikami uzyskanymi dla wszystkich oznaczanych pierwiastków w eksperymencie przeprowadzonym na synchrotronie DIAMOND próbki można było uznać za cienkie, podczas gdy w eksperymencie przeprowadzonym na synchrotronie DESY próbki są cienkie tylko dla pierwiastków o liczbie atomowej większej lub równej 26. W analizie cienkich wycinków tkanek za pomocą spektrometrii XRF pozostaje jednak problem ich jednorodności. Niejednorodność mas powierzchniowych, związana chociażby ze strukturą badanych tkanek (różne lokalne gęstości) mogą wpływać na wynik końcowy i możliwość rozróżniania tkanek zdrowych od patologicznych. Kwestię tę pozostawiam do dyskusji.

W celu sprawdzenia, czy występują zmiany w składzie biomolekularnym pomiędzy próbkami zakwalifikowanymi do różnych grup, Doktorantka wykonała pomiary za pomocą spektrometru z wysokoenergetycznym wzbudzeniem ceramicznym (Thermo Scientific Nicolet iN10) obejmujące całą powierzchnię próbki. Natomiast, aby sprawdzić, czy istnieje różnica między składem biomolekularnym w endomysium badanych próbek, wykonano pomiary techniką ze wzbudzeniem synchrotronowym. Wykorzystanie podczerwieni generowanej przez synchrotron pozwoliło na uzyskanie wysokiej rozdzielczości przestrzennej i wysokiego stosunku sygnału do szumu, dzięki czemu możliwe było badanie mikrometrowych obszarów próbek i wizualizacja obszarów tkanki łącznej między włóknami mięśniowymi.





Wstępnie przetworzone wyniki, uzyskane w eksperymentach SR-XRF i FTIR zostały poddane analizie statystycznej. Na podstawie testu Shapiro-Wilka stwierdzono, że w większości przypadków dane nie wykazują rozkładu normalnego. Dalszą analizę statystyczną oparto więc na testach nieparametrycznych. Testy nieparametryczne wykorzystane zostały również do analizy małych ilości danych i przy braku możliwości sprawdzenia ich rozkładu. Współczynnik korelacji Spearmana wykorzystano do zbadania możliwych korelacji między poszczególnymi pierwiastkami lub biomolekułami oznaczonymi w próbkach. Natomiast do weryfikacji istotności statystycznej różnic w zawartości pierwiastków i biocząsteczek Doktorantka wykorzystowała test Kruskala-Wallisa. W celu sprawdzenia, który konkretny czynnik ma największy wpływ na zmienność w próbkach przeprowadzono wielowymiarową analizę dyskryminacyjną.

Reasumując, przeprowadzone analizy SR-XRF i FTIR wykazały odpowiednio różnice w stężeniach wybranych pierwiastków (Ca, K, Cr i P w przypadku włókien mięśni oraz Fe, Cu, Zn, Br i Rb w przypadku endomysium) oraz w składzie biomolekularnym (zawartość białka we włóknach mięśni oraz kwasów nukleinowych i tłuszczowych w endomysium) między tkankami objętymi zmianami patologicznymi a próbkami sklasyfikowanymi na podstawie diagnozy medycznej jako grupa referencyjna. Pragnę podkreślić, że badania przeprowadzone w toku pracy są dobrze udokumentowane (fotografie, widma, wykresy i diagramy). Przychylam się zatem, do wniosku, że uzyskane wyniki przemawiają za wykorzystaniem przedstawionych w pracy doktorskiej technik spektroskopowych do rozróżniania składu chemicznego i biomolekularnego analizowanych tkanek.

Niemniej jednak, chciałabym w dyskusji poruszyć parę kwestii:

1. Biorąc pod uwagę ograniczoną dostępność synchrotronowych źródeł promieniowania rentgenowskiego czy istnieje możliwość wykorzystania „laboratoryjnych” spektrometrów XRF w badaniach tkanek (wyznaczenie składu pierwiastkowego, oznaczania pierwiastków śladowych)? Czy wykorzystanie syntrochronu to jedyne rozwiązaniem dla tego typu analiz?
2. Czy istnieją wytyczne (medyczne) dotyczące stężenia pierwiastków w różnych tkankach ludzkich (mięśniach)? I jak te stężenia mają się do granic wykrywalności techniki XRF?
3. Jakie są granice wykrywalności analitów w mierzonych tkankach, przy zastosowanych warunkach pomiarowych w technice SR-XRF?
4. Interesuje mnie również kwestia powtarzalności. Nie znalazłam w pracy informacji, czy np. z tkanki pochodzącej od jednego pacjenta przygotowano więcej niż jedną próbkę i dokonano ich pomiarów. Jak wyglądały widma? Czy różnica pomiędzy uzyskanymi wynikami była statystycznie istotna? Czy ewentualna zmienność pierwiastkowa w obrębie kilku próbek dla tego samego pacjenta wpływa na wynik analizy dyskryminacyjnej pozwalającej przypisać danego pacjenta do grupy ludzi zdrowych lub „chorych”?



2'

Drobne, wybrane zastrzeżenia i uwagi:

Mam zastrzeżenia do cytowania rysunków w tekście, zdarza się, że numeracja w tekście nie pokrywa się z faktycznym numerem rysunku (np. na str. 82 lub brak numeru rysunku w tekście na str. 86).

Uchybienia te i niewymienione tutaj szczególnie drobne błędy językowe lub edytorskie nie mają żadnego wpływu na moją pozytywną ocenę recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską Pani mgr Pauli Kasprzyk. **Uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim** określone w ustawie z dn. 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z 2003 r. z późniejszymi zmianami) i **wniosuję o dopuszczenie Pani mgr Pauli Kasprzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Beata Zawisza