

Imię i nazwisko recenzenta:

Dr hab. ALDONA KUBALA-KUKUŚ, prof. UJK

Dane adresowe:

Zakład Fizyki Atomowej i Nanofizyki

Instytut Fizyki

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Ul. Uniwersytecka 7, 25-406 Kielce

Kielce, 11.01.2026

(data i miejsce)

Recenzja pracy doktorskiej

Patrycja Śliż-Szpytma

(imię i nazwisko doktoranta / doktorantki)

pod tytułem *Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych*

przygotowanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. inż. Marek Lankosz

(imię i nazwisko promotora)

prof. dr hab. Dariusz Adamek

(imię i nazwisko promotora / promotora pomocniczego)

1. Podstawa opracowania

Recenzja została wykonana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki fizyczne Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Podstawa prawna art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (z późn. zm.)

Opinia dotycząca przedmiotowej rozprawy doktorskiej zawiera trzy elementy:

- 1) Ocenę wraz z uzasadnieniem czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie nauki fizyczne;
- 2) Ocenę wraz z uzasadnieniem czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktoranta ubiegającego się o nadanie stopnia doktora;
- 3) Ocenę wraz z uzasadnieniem czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

2. Charakterystyka i opis rozprawy

Przystawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Śliż-Szpytmej dotyczy zastosowania wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych. Praca została zrealizowana w ramach projektu CRP, G42008, finansowanego

przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej (IAEA, nr 23563), projektu CERIC (nr 20197010) oraz projektu RADIATE (nr 21002445). W pracy podjęto próbę opisu zmian jakie zachodzą w tkankach mięśni w różnych ich schorzeniach, takich jak dystrofie czy miopatie, na materiale ludzkim - chorych badanych w ramach diagnostyki schorzeń nerwowomięśniowych. Wykorzystano do tego celu materiał pobrany drogą biopsji chirurgicznej, który pierwotnie służył diagnostyce neuropatologicznej, a który wtórnie wykorzystano do badań za pomocą kilku uzupełniających się metod eksperymentalnych. W badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych wykorzystano technikę emisji promieniowania rentgenowskiego wywołaną cząstkami naładowanymi μ PIXE (ang. Micro Particle Induced X-ray Emission) wspomaganą obrazowaniem za pomocą skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej STIM (ang. Scanning Transmission Ion Microscopy), spektrometrię masową jonów wtórnych MeV SIMS (ang. Secondary Ion Mass Spectrometry) oraz metodę spektrometrii masowej z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą i analizą czasu przelotu jonów MALDI-TOF (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Dodatkowo dla metody MALDI została wykonana analiza widm fragmentacyjnych uzyskanych za pomocą metody LIFT (ang. Laser-Induced Fragmentation Technology). Technika μ PIXE połączona z mikroskopią STIM umożliwiła ilościowe określenie rozkładu pierwiastków, natomiast technika MeV SIMS dostarczyła informacji o składzie molekularnym, szczególnie w zakresie lipidów, drobnomolekularnych metabolitów oraz jonów. Dodatkowa analiza z użyciem MALDI-TOF umożliwiła identyfikację we włóknach mięśniowych cząsteczek lipidowych, głównie z grupy fosfatydylocholin (ang. Phosphatidylcholines, PC). Część eksperymentalna badań została wykonana we współpracy z Ruđer Bošković Institute RBI (Zagrzeb, Chorwacja) oraz z Zespołem Biochemii i Neurobiologii Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Praca obejmuje zarówno szczegółowe analizy eksperymentalne, jak i wkład metodyczny w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych z wykorzystaniem metod spektroskopowych. Wyniki zaprezentowane w rozprawie mają znaczenie dla lepszego zrozumienia skomplikowanych patomechanizmów stanów chorobowych, jakimi są choroby nerwowomięśniowe.

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Śliż-Szpytmej jest napisana w języku polskim. Rozprawa składa się z siedmiu rozdziałów oraz bibliografii. Pracę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wstęp, w którym Autorka przedstawia cel rozprawy. Praca liczy łącznie 136 stron, z czego część czysto opisowa stanowi 126 stron. W poniższej części recenzji przedstawiam charakterystykę zawartości pracy, eksponując miejsca, w których Autorce udało się uzyskać nowe wyniki naukowe oraz dokonując oceny jakości i oryginalności otrzymanych wyników.

W rozdziale pierwszym Autorka opisuje mięśnie szkieletowe, dedykując podrozdziały odpowiednio budowie oraz typom włókien tych mięśni. Rozdział drugi dedykowany jest klasyfikacji miopatii i dystrofii mięśniowych w ujęciu patofizjologicznym i morfologicznym. W kolejnych podrozdziałach Autorka definiuje miopatie pierwotne i wtórne, omawia problematykę klasyfikacji miopatii zapalnych oraz cechy morfologiczne uszkodzenia mięśnia w przebiegu miopatii. W uwagach metodologicznych przedstawiano została skrótowo

diagnostyka neuropatologiczna miopatii. W rozdziale trzecim Autorka rozprawy przedstawia znaczenie lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni. W szczególności podkreślony zostaje związek między składem molekularnym tkanek mięśniowych i miopatią oraz dystrofią mięśniową, omówiony lipidom mięśni szkieletowych w miopatiach i dystrofiach mięśniowych oraz przedstawiona rola pierwiastków w patogenezie. Autorka jeden z podrozdziałów dedykuje także przyszłości terapii dystrofii mięśniowych.

Rozdziały 1-3 stanowią syntetyczną charakterystykę próbek będących celem analizy dyskutowanej rozprawy doktorskiej. Przedstawione informacje i opisy są merytorycznie uzasadnione i stanowią wyjaśnienie celowości prowadzenia badań tych próbek z wykorzystaniem metod spektroskopowych.

Rozdział 4 jest opisem wykorzystanych metod badawczych: protonowej fluorescencji rentgenowskiej PIXE, skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej STIM, spektrometrii masowej jonów wtórnych SIMS oraz spektrometrii masowej z desorpcją i jonizacją laserową z wykorzystaniem matrycy. W opisie, dla każdej z metod, zastosowano podobny układ prezentacji informacji: od wprowadzenia, poprzez podstaw fizyczne i opis układu eksperymentalnego, do przykładowych wyników, zastosowania i znaczenia w badaniach biologicznych. W rozdziale tym cenny jest opis zjawisk fizycznych będących podstawą omawianych technik badawczych, opis układów eksperymentalnych z uwzględnieniem różnych rozwiązań technicznych oraz dyskusja zalet i ograniczeń stosowanych technik. W przypadku technik PIXIE oraz STIM dobrym uzupełnieniem opisów układów eksperymentalnych byłoby zamieszczenie ich rysunków/zdjęć. W podrozdziale dotyczącym techniki PIXIE, przy rysunku Rys. 4.2 wskazane byłoby podać opis osi widma rentgenowskiego oraz szczegółowy opis linii promieniowania fluorescencyjnego. Do tej części proszę także o informację uzupełniającą *jaka jest energetyczna zdolność rozdzielcza, przestrzenna zdolność rozdzielcza oraz granica wykrywalności techniki PIXIE. Proszę także o podanie szacowanej granicy wykrywalności techniki SIMS.*

Rozdział 5 opisuje metodologię pomiarową z podziałem na techniki badawcze. Opis poprzedza podrozdział dotyczący klasyfikacji próbek na grupę kontrolną, miopatyczną i dystroficzną. W metodologii szczegółowo przedstawiono preparatykę próbek, wstępne przygotowanie i selekcję obszarów pomiarowych, parametry eksperymentów, kalibrację aparatury pomiarowej (np. kalibrację przestrzenną w technice PIXIE), wyniki pomiarowe ze wstępną interpretacją (np. dla techniki PIXIE rozkłady zawartości pierwiastków), oprogramowanie i sposób przetwarzania danych, w tym ich normalizację, strategię doboru matryc do analizy lipidowej techniką MALDI oraz optymalizację procedury pomiarowej. Szczegółowe specyfikacje pomiarowe zostały zebrane w publikacji Doktorantki.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że do generowania map rozkładu przestrzennego pierwiastków Autorka rozprawy opracowała autorskie skrypty w języku Python umożliwiające wizualizację lokalnych różnic w składzie badanych próbek. Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem oprogramowania Statistica oraz autorskich skryptów Pythona opartych na tych samych bibliotekach, co umożliwiło spójne przetwarzanie i interpretację danych ilościowych oraz obrazowych.

Informacje podane w rozdziale 5 rozprawy doktorskiej wskazują na umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę eksperymentalnej pracy naukowej

z wykorzystaniem różnorodnych technik badawczych, co pozwoliło na komplementarną analizę próbek. Autorka wykazuje się znajomością pracy eksperymentalnej głównie z zakresu dyscypliny nauki fizyczne, ale także z dyscyplin takich jak nauki chemiczne, nauki biologiczne czy też nauki medyczne. Przyjęta strategia pomiarowa, uwzględniająca różnorodność rozmiarów i lokalizacji punktów analizy, oraz własności próbek mięśni szkieletowych pozwoliła na dokładne określenie zmienności między grupami próbek, jak i w obrębie ich struktury. Zebrane dane stanowią cenną podstawę do dalszych badań w tym zakresie.

W rozdziale 6 Autorka rozprawy przedstawia wyniki oraz ich dyskusję dzieląc rozdział na podrozdziały dedykowane odpowiednio technice PIXE, SIMS oraz MALDI. W podrozdziale dotyczącym techniki PIXE Autorka prezentuje rozkłady intensywności promieniowania charakterystycznego pierwiastków: Na, Mg, P, S, Cl, K, Fe, Zn oraz Br. *W tym miejscu prosba o komentarz czy w analizie PIXIE możliwe jest uzyskanie informacji o zawartości masowej pierwiastków?* W opracowaniu statystycznym Autorka wykazała, że rozkłady intensywności nie są opisane rozkładem normalnym, dlatego też w kolejnym kroku dla porównania rozkładów pierwiastków z badanych grupach próbek zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Ze względu na wykazane różnice w rozkładach pierwiastków przeprowadzono dalsze analizy post hoc (test U Manna-Whitney'a dla par grup) oraz zastosowanie metod eksploracyjnych takich jak analiza głównych składowych PCA oraz wielowymiarowa analiza dyskryminacyjna MDA, celem identyfikacji pierwiastków o najwyższej wartości dyskryminacyjnej i interpretacji zależności wielowymiarowych pomiędzy próbkami. W wyniku przeprowadzonej analizy wielowymiarowej dyskryminacyjnej MDA wyznaczono funkcje dyskryminacyjne, będące liniowymi kombinacjami intensywności promieniowania charakterystycznego poszczególnych pierwiastków, które najlepiej różnicują badane grupy tkanek mięśniowych. Uzyskane wyniki MDA podkreślają potencjał tej metody jako narzędzia wspomagającego diagnostykę. Przeprowadzona analiza PCA potwierdza, że zmienność danych w badanych próbkach jest przede wszystkim determinowana przez stężenia potasu, chloru, fosforu oraz siarki. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tych pierwiastków dla diagnostyki oraz różnicowania stanów chorobowych tkanek mięśniowych. Bardzo cennym aspektem tej części rozprawy jest podsumowanie wniosków uzyskanych z wykonanej metodą PIXIE analizy pierwiastkowej. *W tym miejscu pojawia się pytanie, które inne pierwiastki, nie analizowane w przedstawionych badaniach prawdopodobnie z powodu ograniczonej granicy wykrywalności techniki PIXIE, w ocenie Doktorantki mogłyby być istotnym markerem zmian w tkankach mięśni szkieletowych?*

W przypadku techniki SIMS, w celu wstępnej selekcji sygnałów zastosowano analizę wariancji ANOVA. Oceniono także założenia wielowymiarowej normalności dla zastosowania metody PCA oraz modelowania regresyjnego. Analiza ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami dla niemal wszystkich analizowanych pików molekularnych. W celu oceny współzależności pomiędzy sygnałami widmowymi przeprowadzono także analizę korelacji Pearsona dla 21 wybranych pików m/z. Celem tego etapu było zidentyfikowanie potencjalnych grup pików powiązanych ze sobą, mogących odzwierciedlać wspólne mechanizmy chemiczne lub biologiczne. Dla tej analizy można także podać, które współczynniki korelacji są statystycznie różne od zera. Wykonano również analizę PCA oraz LDA. Uzyskane wyniki są wnikliwie interpretowane przez Autorkę rozprawy.

W podrozdziale opisującym wyniki dla techniki MALDI Doktorantka opisuje analizę w trybie dodatnim i ujemnym oraz dokonuje zestawienia próbek wykorzystanych w analizie. W analizie zastosowano metody najmniejszych kwadratów cząstkowych (PLS) w celu wykrycia lipidów istotnie różnicujących grupy badawcze i mogących stanowić potencjalny biomarker.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wskazują na potencjał integracji technik spektroskopowych w identyfikacji pierwiastkowych i molekularnych markerów zmian patologicznych w mięśniach. Przedstawiona metodologia badań eksperymentalnych i analiz statystycznych może znaleźć zastosowanie w diagnostyce wczesnych etapów chorób nerwowo-mięśniowych oraz w monitorowaniu ich zaawansowania i odpowiedzi na leczenie.

3. Wniosek końcowy

Przedstawiona rozprawa doktorska prezentuje zarówno ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki fizyczne, jak i umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę pracy naukowej z wykorzystaniem właściwych narzędzi badawczych. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego koncentrującego się na badaniu próbek mięśni szkieletowych z wykorzystaniem wybranych metod spektroskopowych. Od przedstawienia problemu naukowego, przez umiejętne wprowadzenie w zagadnienia teoretyczne, zaplanowanie i wykonanie zaawansowanych eksperymentów fizycznych, po analizę, także statystyczną, wyników eksperymentalnych, z interpretacją otrzymanych rezultatów. Na podkreślenie zasługuje także dbałość Doktorantki o weryfikację założeń procedur statystycznych. W rozprawie Autorka potrafi także wskazać zarówno mocne strony, ograniczenia, jak i dalszy możliwy kierunek badań.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (z późn.zm.) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.


(podpis recenzenta)