

Imię i nazwisko recenzenta:

Prof. dr hab. n. farm. Włodzimierz Opoka

07.01.2026 r. Kraków

(data i miejsce)

Dane adresowe:

Katedra Chemii Nieorganicznej i Analityki Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny UJ CM

ul. Medyczna 9

30-688 Kraków

Recenzja pracy doktorskiej

Patrycji Śliż-Szpytmy

(imię i nazwisko doktoranta / doktorantki)

pod tytułem:

„Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych”

przygotowanej pod kierunkiem:

prof. dr hab. inż. Marka Lankosza

(imię i nazwisko promotora)

prof. dr hab. Dariusza Adamka

(imię i nazwisko promotora)

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

W ostatnich latach coraz większe znaczenie przypisuje się badaniom łączącymi informacje o składzie pierwiastkowym z analizą molekuł biologicznych w kontekście strukturalnym i przestrzennym tkanek pochodzenia ludzkiego. Takie podejście umożliwia lepsze zrozumienie złożonych zmian zachodzących w chorobach tkanek, zwłaszcza tam, gdzie liczy się nie tylko obecność określonej cząsteczki, ale również jej rozmieszczenie w mikroskali. W tym kontekście zastosowanie nowoczesnych technik spektrometrycznych, może pozwolić również na uzyskanie komplementarnego obrazu zmian zachodzących w ludzkiej tkance mięśniowej.

Mięśnie szkieletowe stanowią jedną z największych pod względem masy tkanek organizmu człowieka i odgrywają nie tylko zasadniczą rolę w ruchu i utrzymaniu postawy, ale także w regulacji gospodarki energetycznej, metabolizmu glukozy oraz homeostazy jonowej. Ich prawidłowe funkcjonowanie zależy od precyzyjnej regulacji procesów biochemicznych i strukturalnych, zachodzących zarówno na poziomie komórkowym, jak i subkomórkowym. W stanach patologicznych, takich jak dystrofie mięśniowe czy miopatie, dochodzi do zakłóceń w tych procesach, czego skutkiem mogą być zaburzenia w strukturze i funkcji mięśni. Wciąż jednak brakuje pełnego zrozumienia molekularnych i pierwiastkowych mechanizmów leżących u podstaw tych schorzeń, zwłaszcza u ludzi. W praktyce klinicznej metodą rozpoznawania tych schorzeń jest biopsja mięśni z oceną histopatologiczną. Nie zawsze jednak umożliwia to postawienie jednoznacznego rozpoznania. Pomocne mogą być wtedy zaawansowane metody współczesnej fizyki pozwalające na ocenę subtelnych zmian pierwiastkowych i biomolekularnych w tkance mięśniowej. Do takich metod zaliczane są: emisja promieniowania rentgenowskiego wywołana cząstkami naładowanymi (ang. Particle Induced X-ray Emission-PIXE) wspomagana przy użyciu skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej (ang. Scanning Transmission Ion Microscopy-STIM), która jest rodzajem jakościowej i ilościowej metody obrazowania rozkładów przestrzennych pierwiastków w próbkach biologicznych oraz spektrometria masowa jonów wtórnych (ang. Secondary Ion Mass Spectrometry-MeV SIMS), a także metoda spektrometrii masowej z desorpcją/ionizacją laserową wspomagana matrycą i analizą czasu przelotu jonów (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry-MALDI-TOF).

Techniki te pozwalają w badanych próbkach zobrazować różnice wynikające ze składu pierwiastkowego i biomolekularnego badanych tkanek człowieka. Ponadto, ze względu na zmiany pierwiastkowe jak i biomolekularne mogą odzwierciedlać procesy biochemiczne zachodzące we włóknach mięśniowych, a badanie tkanek mięśni na różnych etapach rozwoju choroby może prowadzić do lepszego poznania patofizjologii tych zaburzeń. Na uwagę zasługuje fakt, że analiza różnic obserwowanych w prawidłowych lub uszkodzonych tkankach może wspomóc i uzupełnić diagnostykę tych zaburzeń. Tym cenniejsze są zatem badania ukierunkowane na poszukiwanie takich metod mogących wesprzeć lub uzupełnić stosowane w praktyce klinicznej metody diagnostyczne.

Zrozumienie roli biopierwiastków oraz molekularnego składu tkanek w procesach patologicznych stanowi obecnie jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny, szczególnie w obszarze chorób mięśni. Badanie ich rozlokowania, określanie stężenia oraz wzajemnych interakcji w obrębie zmienionych chorobowo struktur nie tylko pogłębia wiedzę o biochemicznych mechanizmach leżących u podstaw tych schorzeń, lecz także otwiera drzwi do opracowywania nowatorskich strategii diagnostycznych i terapeutycznych. Z dotychczasowych prac badawczych jednoznacznie wynika, że zarówno niedobory, jak i nadmiary konkretnych biopierwiastków, a także istotne zmiany w składzie molekularnym odzwierciedlają, a co ważniejsze, mają bezpośredni wpływ na zaburzenia metaboliczne, które znacząco determinują przebieg choroby i stan zdrowia pacjentów. Aktualny stan wiedzy na temat tych procesów jest ciągle niekompletny i wymaga dalszych badań. Praca doktorska mgr Patrycji Śliż-Szpytmy pt.: „Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych” wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom. Należy podkreślić, że praca ma charakter interdyscyplinarny i została zrealizowana w Katedrze Fizyki

Medycnej i Biofizyki na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie oraz Zakładzie Neuropatologii Collegium Medicum UJ w Krakowie.

Przedstawiona do recenzji praca stanowi przykład klasycznej dysertacji doktorskiej w formie monografii o układzie przyjętym powszechnie dla prac doktorskich. Pracę ujętą na 134. stronach otwierają streszczenia w języku polskim oraz w języku angielskim. Kolejne części rozprawy stanowią: wstęp, opis budowy i klasyfikacja mięśni szkieletowych, opis chorób mięśni szkieletowych i ich klasyfikacja, zarys roli lipidów i biopierwiastków w chorobach mięśni, opis przeprowadzonych eksperymentów zawierający przedstawienie podstaw fizycznych metod i materiału badawczego oraz narzędzi analizy statystycznej, opis oprogramowania i przetwarzania danych, wyniki pomiarów oraz ich dyskusja, wnioski i piśmiennictwo. Brak w spisie treści elementu: „Celu pracy” jest pewnym niedopatrzeniem ze strony mgr Patrycji Śliż-Szpytmy, ale ten brak został w pełni zrekompensowany przez określenie tego celu w różnych częściach tej rozprawy doktorskiej, m.in. w „Streszczeniu” na stronie 9; we „Wstępie” na stronie 15; „Uwagach metodologicznych” na stronie 23; w podrozdziale 3.1. na stronie 25; w „Metodologii pomiarowej” na stronie 57; w „Wynikach i dyskusji” na stronie 83; w podrozdziale 6.1.3. na stronie 86; w podrozdziale 6.1.6. na stronie 95; w podrozdziale 6.2.2. na stronie 97; w podrozdziale 6.2.3. na stronie 99; w podrozdziale 6.3.1. na stronie 111. Po dokładnym przeczytaniu rozprawy doktorskiej można zgodzić się z informacją podaną we „Wnioskach” na stronie 125 o zrealizowaniu celów badawczych określonych przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę w różnych częściach swojej rozprawy, chociaż byłoby wygodnie dla recenzenta, gdyby „Cel pracy” był wyczerpująco opisany w osobnym rozdziale. Należy też podkreślić, że cel pracy określony w tytule rozprawy doktorskiej, tj. „Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych” został zrealizowany.

Rozpoczynające rozprawę dokorską streszczenie w języku polskim i angielskim przedstawiają zwięźle i rzeczowo treści zawarte w rozprawie doktorskiej.

We wstępie mgr Patrycja Śliż-Szpytma wprowadza czytelnika w przystępny sposób w zagadnienia zmian biomolekularnych i pierwiastkowych w mięśniach szkieletowych objętych procesem chorobowym przybliżając nowatorskie metody fizyki wykorzystane do badania tych zmian. Następnie Doktorantka przedstawia założenia i cele badawcze swojej rozprawy doktorskiej polegające na zamiarze określenia zmian pierwiastkowych i biomolekularnych zachodzących w badanej tkance mięśniowej człowieka zmienionej patologicznie – dotyczyło to miopatii i dystrofii. Zmiany te zostały porównane z referencyjną tkanką mięśniową, w której w badaniach histopatologicznych nie wykazano cech patologicznych.

W rozdziale pierwszym recenzowanej rozprawy można zapoznać się z budową strukturalną mięśni szkieletowych, podziałem włókien mięśniowych na typy w oparciu o kryteria funkcjonalne, histochemiczne i biochemiczne.

W następnym rozdziale zatytułowanym: „Klasyfikacja miopatii i dystrofii mięśniowych: ujęcie patofizjologiczne i morfologiczne” można zapoznać się najczęstszymi chorobami i zaburzeniami w funkcjonowaniu mięśni w ujęciu patofizjologicznym i morfologicznym. W dalszej części tego rozdziału przedstawiono uzasadnienia wyboru tkanek mięśni do badań. Obszernie zaprezentowano sposób kwalifikacji materiału badawczego.

Diagnostyka neuropatologiczna miopatii obejmuje szereg specjalistycznych badań, które pozwalają na identyfikację, klasyfikację oraz ocenę zaawansowania chorób mięśniowych. Do kluczowych metod należą: badania histopatologiczne (barwienia hematoksyliną i eozyną), badania histochemiczne dotyczące aktywności enzymatycznej oraz barwienia immunohistochemiczne. W chwili obecnej coraz większego znaczenia nabiera analiza genetyczna, która umożliwi identyfikację mutacji w genach odpowiedzialnych za dziedziczne postacie miopatii. Materiał biopsyjny pod względem neuropatologicznym można zakwalifikować do następujących kategorii: dystrofie mięśniowe, miopatie oraz biopsje negatywne, w których nie stwierdzono uchwytanych zmian morfologicznych w próbce, co jednak nie wyklucza obecności choroby. Z tego powodu i w takich przypadkach, istnieje potrzeba znalezienia niestandardowych metod, które mogłyby ujawnić niedostrzegalne w klasycznej metodologii zmiany patologiczne. Zgodnie z powyższym, na potrzeby niniejszej rozprawy starano się zakwalifikować materiał z biopsji mięśniowych do jednej z trzech głównych kategorii: dystrofii, miopatii oraz próbek, w których nie wykazano zmian patologicznych. Ocena neuropatologiczna opierała się na badaniu mikroskopowym z wykorzystaniem standardowych metod histologicznych, histochemicznych oraz immunohistochemicznych. Podziału analizowanych próbek dokonano na podstawie diagnoz neuropatologicznych, przygotowanych na podstawie zanonimizowanych raportów patomorfologicznych.

W kolejnym rozdziale mgr Patrycja Śliż-Szpytma omówiła rolę lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni. Szczególną uwagę zwróciła na związek między składem molekularnym tkanek mięśniowych i miopatią oraz dystrofią mięśniową. Wskazała, że badania składu molekularnego tkanek mięśniowych w kontekście miopatii i dystrofii pozwalają lepiej zrozumieć, w jaki sposób zmiany w zawartości lipidów oraz określonych biopierwiastków wpływają na integralność strukturalną i funkcjonalną mięśni. Mgr Patrycja Śliż-Szpytma zwróciła również uwagę na fakt, że analiza składu lipidów i biopierwiastków w tkankach mięśniowych może dostarczyć cennych informacji na temat molekularnych podstaw zmian patologicznych. Szczególnie ważne jest poddanie analizie zmian w profilach lipidowych i pierwiastkowych, ponieważ mogą one także ujawniać mechanizmy, które mogłyby stać się potencjalnym celem terapii. Zrozumienie roli lipidów i biopierwiastków oraz ich interakcji z białkami strukturalnymi otwiera nowe perspektywy w leczeniu tych niejednokrotnie nieuleczalnych schorzeń. Związek między składem molekularnym i biopierwiastkowym w tkankach mięśniowych i miopatią oraz dystrofią mięśniową potwierdza słuszność i celowość tematyki badań, której realizowania podjęła się mgr Patrycja Śliż-Szpytma.

W rozdziale 4. przedstawiono podstawy teoretyczne metod: emisji promieniowania rentgenowskiego wywołanej cząstkami naładowanymi PIXE wspomaganą przy zastosowaniu skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej STIM, spektrometrii masowej jonów wtórnych MeV SIMS oraz spektrometrii masowej z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą i analizą czasu przelotu jonów MALDI-TOF. Rozdział ten podzielony jest na podrozdziały. W każdym z podrozdziałów omówiono zastosowane techniki pomiarowe. Z opisu metod badawczych wynika rzetelna znajomość tematyki badawczej i spójna droga naukowa mgr Patrycji Śliż-Szpytmy połączona z systematycznym podejściem do rozwiązywania problemów badawczych, a z której wynikają dalej opisane badania stanowiące potwierdzenie opanowania warsztatu naukowego.

W kolejnym rozdziale doktorantka przedstawiła metodologię pomiarów. Na początku tego rozdziału omówiła obszernie sposób gromadzenia i kwalifikacji próbek mięśni. Na potrzeby analiz badawczych próbki tkanek mięśniowych zostały sklasyfikowane w trzech podstawowych grupach: grupa kontrolna, grupa miopatyczna i grupa dystroficzna. W zależności od rodzaju i specyfiki zastosowanej metody pomiarowej, dokonano również rozszerzeń i ponownego grupowania materiału, co zostało szczegółowo opisane w odpowiednich sekcjach analitycznych. Próbkę tkanek, które wykorzystano w przedstawionych w pracy doktorskiej eksperymentach, zostały pobrane od pacjentów z podejrzeniem choroby mięśniowej podczas biopsji chirurgicznej. Przed kwalifikacją poszczególnych próbek do dalszych etapów badań, każdorazowo przeprowadzano szczegółową ocenę diagnostyczną z zastosowaniem standardowych procedur wykorzystywanych we współczesnej miopatologii. Przeprowadzanie analiz polegało na barwieniu histologicznym m. in. z wykorzystaniem hematoksyliny i eozyny oraz badaniu histochemicznym stosowanym w szczególności w identyfikacji poszczególnych typów włókien mięśniowych. Proces ten został zrealizowany w Zakładzie Neuropatologii Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. W celu zachowania integralności strukturalnej materiału biologicznego każda z badanych próbek mięśniowych została poddana, niezwłocznie po wykonanej biopsji, konserwacji w niskich temperaturach metodą szokowego zamrożenia w izopentanie schłodzonym w ciekłym azocie. Takie podejście pozwala na minimalizację artefaktów mrożeniowych i maksymalną wierność odwzorowania mikrostruktury komórkowej i tkankowej. Z tak przygotowanych bloków tkankowych za pomocą kriomikrotomu wykonywano dwa sąsiadujące skrawki. Jeden z nich przeznaczano do klasycznej analizy histologicznej i osadzono na standardowym szkiełku mikroskopowym, natomiast drugi zamocowywano na okienku dostosowanym do użytej techniki pomiarowej. Skrawki do pomiarów miały grubość od 5 mikrometrów do 12 mikrometrów wynikającą z wymagań danej techniki pomiarowej. Umożliwiło to jednoczesną analizę dwuparametryczną i porównawczą w ramach zaplanowanych procedur badawczych na skrawkach bezpośrednio odwzorowujących strukturę zmian diagnozowanych neuropatologicznie. W celu zminimalizowania wpływu obecności wody na wyniki spektroskopowe, analizowane próbki poddawano procesowi kriodehydratyzacji (bez dalszej obróbki chemicznej). Niestety informacja o liczbie i dostępności badanych próbek pojawiła się dopiero w dalszych etapach pracy. Z przedstawionej informacji wynika, że liczba badanych próbek była różna dla stosowanych technik pomiarowych. W przypadku metody PIXE dwie próbki pochodziły z grupy kontrolnej C, natomiast po jednej z grupy miopatii M i dystrofii D. Do analiz wykonanych techniką SIMS wykorzystano cztery skrawki tkanek mięśniowych, pochodzące od mężczyzny w wieku 37-56 lat. Materiał badawczy stanowiła próbka o potwierdzonym charakterze dystroficznym (D), próbka kontrolna (C), próbka reprezentująca miopatię (M) oraz próbka o niejednoznacznym profilu histopatologicznym. W metodzie MALDI wykorzystano dwie próbki kontrolne (C), dwie próbki z grupy dystrofii i pięć próbek z grupy miopatii.

W podrozdziałach szczegółowo opisano pomiary i parametry eksperymentu, selekcję obszarów pomiarowych oraz liczbę skanów. Do analizy danych pomiarowych zgromadzonych podczas eksperymentów wykorzystano zaawansowane oprogramowanie komputerowe. Opisano również, w sposób wyczerpujący, metody obrazowania wyników pomiarów tkanek. Wyniki pomiarów zostały przedstawione graficznie w postaci map. Do generowania map

rozkładu przestrzennego oznaczonych biopierwiastków i biomolekuł opracowano autorskie skrypty. Dane pomiarowe poddano analizie metodami zaawansowanej statystyki z wykorzystaniem powszechnie stosowanych w tym celu specjalistycznych programów komputerowych. Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem oprogramowania Statistica 13 (StatSoft) oraz własnych skryptów, co umożliwiło spójne przetwarzanie i interpretację danych ilościowych oraz obrazowych. Na szczególną uwagę i docenienie zasługują czytelne i dopracowane graficznie ilustracje przedstawione w tej rozprawie doktorskiej. Należy podkreślić, że analizowano ten sam materiał na różnych urządzeniach dobranych odpowiednio do zakładanych celów oznaczeń analitycznych. Taki sposób realizacji badań umożliwił kompleksową ocenę próbek mięśni, a tym samym umożliwił mgr Patrycji Śliż-Szpytynie uzyskanie interesujących wyników swych badań.

W kolejnym, piątym rozdziale rozprawy doktorskiej mgr Patrycja Śliż-Szpytma przedstawiła wyniki pomiarów oraz ich dyskusję. Część wynikowa i dyskusyjna jest bardzo obszerna, bogato ilustrowana wykresami i tabelami. Na podstawie pomiarów składu biopierwiastków wykonanego metodą PIXE stwierdzono obecność następujących biopierwiastków: Na, Mg, P, S, Cl, K, Fe, Zn, Br. Na podstawie map przestrzennego rozkładu intensywności promieniowania charakterystycznego wykazano znaczące różnice w rozmieszczeniu biopierwiastków pomiędzy różnymi stanami strukturalnymi tkanki mięśniowej. W obrębie wszystkich badanych próbek stwierdzono obecność sodu, magnezu, fosforu, siarki, chloru oraz potasu. Dodatkowo, w wybranych obszarach badanych tkanek zaobserwowano punktowe akumulacje biopierwiastków śladowych, w tym żelaza oraz cynku. Rozmieszczenie tych biopierwiastków wykazywało charakter ogniskowy, co może wskazywać na ich specyficzne zaangażowanie w lokalne procesy metaboliczne, stres oksydacyjny lub zmiany patologiczne zachodzące w tkance mięśniowej. Taka heterogeniczność przestrzenna składu biopierwiastków może stanowić cenny wskaźnik diagnostyczny, pozwalający na lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych towarzyszących różnym stanom chorobowym mięśni.

Dyskusję wyników analiz biopierwiastków podsumowano formułując następujące wnioski:

- na podstawie wyników oznaczenia biopierwiastków: Na, Mg, P i S potwierdzono istotne statystycznie różnice między badanymi grupami
- stosując wielowymiarową analizę dyskryminacyjną wykazano kluczową rolę biopierwiastków: K, Cl, P oraz S w klasyfikacji próbek. Wyznaczone funkcje dyskryminacyjne, będące liniowymi kombinacjami intensywności charakterystycznych linii biopierwiastków, co pozwoliło na skuteczne rozdzielenie grup.
- na podstawie analizy głównych składowych wykazano, że dwie pierwsze składowe wyjaśniają łącznie ponad 91% wariancji danych, co świadczy o wysokiej reprezentatywności tych wymiarów. Składowa PC1 była silnie powiązana z potasem, chlorem, fosforem i siarką, natomiast PC2 ukazała bardziej złożone wzorce, z odmiennymi znakami współczynników, co sugeruje wielowymiarowy charakter różnic między grupami.
- graficzne rozmieszczenie próbek na wykresach PCA i MDA ukazuje częściowe rozdzielenie grup C, D i M. W analizie MDA wyraźniej zarysowały się skupiska odpowiadające poszczególnym grupom, co potwierdza wysoką skuteczność klasyfikacji. Jednocześnie częściowe nakładanie się punktów, zwłaszcza między grupą kontrolną i badanymi zmienionymi patologicznie tkankami (M), co wskazuje na złożoność problemu oraz podobieństwo niektórych profili biopierwiastkowych.

W przypadku potrzeby precyzyjnej identyfikacji i ilościowej analizy wybranych związków biomolekularnych wskazane jest wykorzystanie bardziej specyficznych metod spektrometrii mas, takich jak MALDI. Niemniej jednak, wyniki uzyskane metodą MeV SIMS mogą pełnić rolę wstępnego narzędzia do identyfikacji związków o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym – w takim charakterze zostały wykorzystane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Z uwagi na fakt, że detekcja jonów w metodzie SIMS ma charakter statystyczny, zmierzone liczby zliczeń charakteryzują się fluktuacjami statystycznymi. Materiał do badań analitycznych stanowiło 36 widm pochodzących z czterech skrawków tkanek mięśniowych. Analiza przeprowadzona została na podstawie intensywności 21 wybranych pików mas jonów, reprezentujących najbardziej wyraźne sygnały w widmach, co zapewniało odpowiednią reprezentatywność badanego zbioru danych. Stosując analizę ANOVA wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami dla niemal wszystkich analizowanych pików molekularnych. Największe różnice odnotowano dla sygnałów o m/z 23,00, 124,96, 165,93 oraz 246,56, co wskazuje na bardzo silny wpływ czynnika grupującego na zmienność tych sygnałów. W celu oceny współzależności pomiędzy sygnałami widmowymi przeprowadzono 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. Zaobserwowane zależności korelacyjne wskazują na istnienie spójnych grup sygnałów potencjalnie powiązanych ze sobą chemicznie lub funkcjonalnie, co może odzwierciedlać współwystępowanie określonych związków lub wspólne szlaki metaboliczne. Stanowi to istotną przesłankę do pogłębionych badań nad charakterystyką tych pików oraz ich potencjalną rolą biologiczną w kontekście różnic obserwowanych w badanych tkankach mięśniowych. Jak już to zostało przedstawione we wcześniejszych rozdziałach rozprawy doktorskiej, stosując spektrometrię mas SIMS przeprowadzono badania na czterech kategoriach tkanek mięśni szkieletowych, obejmujących: próbkę z potwierdzoną dystrofią mięśniową (D), próbkę tkanek o charakterze miopatii (M), próbkę charakteryzującą się cechami zaniku mięśniowego o prawdopodobnym podłożu neurogennym (NM) oraz próbkę z grupy kontrolnej (C). Do klasyfikacji danych zastosowano liniową analizę dyskryminacyjną LDA oraz uzupełniającą analizę głównych składowych PCA, co pozwoliło na rozróżnienie poszczególnych typów tkanek na podstawie widm jonów wtórnych.

Ostatnia część tego rozdziału została poświęcona pomiarom metodą MALDI. Mgr Patrycja Śliż-Szpytma kompetentnie przedstawiła procedury chemiczne niezbędne na potrzeby techniki MALDI oraz opisała sposób nanoszenia matryc na badane próbki. Zgodnie z protokołem pomiary przeprowadzono dla każdego skrawka z użyciem rastra o wymiarach 50×50 punktów. W celu porównania widm dla każdej próbki zastosowano po 302 strzały lasera, co odpowiadało liczbie impulsów niezbędnych do pełnego pokrycia obszaru skrawka tkanki. Taki dobór parametrów zapewnił spójność i powtarzalność w akumulacji widm masowych. Zastosowanie analizy najmniejszych kwadratów cząstkowych PLS (ang. Partial Least Squares) umożliwiło wskazanie charakterystycznych pików masowych, które najpełniej odzwierciedlały różnice w profilu lipidowym próbek. Warto podkreślić, że do tego etapu identyfikacja związków chemicznych opierała się wyłącznie na wartościach m/z , co pozwalało jedynie na wskazanie potencjalnych próbek do dalszej analizy. Wykonanie analizy PLS miało na celu wskazanie sygnałów o największym znaczeniu w kontekście rozróżnienia badanych grup biologicznych.

Zastosowanie metody PLS umożliwiło wykrycia lipidów istotnie różnicujących grupy badanych włókien mięśni. Do najbardziej istotnych pików należały sygnały o wartościach m/z: 798,54; 799,54; 782,50; 780,60; 824,70; 796,20; 758,80; 808,60 oraz 825,60, przy czym pik o wartości m/z 798,6 wykazał najwyższą istotność. Oznacza to, że jest to najważniejszy sygnał różnicujący grupy badanych próbek i może stanowić potencjalny biomarker. Wskazane wartości wykorzystano do przeprowadzenia fragmentacji tandemowej (MS/MS), mającej na celu potwierdzenie struktury molekularnej wytypowanych związków oraz ich znaczenia w różnicowaniu analizowanych próbek. Na potrzeby lepszego poznania składu biomolekularnego włókien mięśni w omawianym podrozdziale zamieszczono zestawienie sygnałów wraz z listą możliwych związków lipidowych z przypisaną formułą chemiczną oraz powiązaniem jonem. Do wykorzystania tego zestawienia posłużono się bazą danych LIPID MAPS®(LMSD). Jest to baza danych zawierająca struktury i adnotacje biologicznie istotnych lipidów. Mgr Patrycja Śliż-Szpytma podkreśliła, że proces dwustopniowej analizy, łączący podejście statystyczne z dokładną identyfikacją molekularną, jest niezbędny do zapewnienia wysokiej jakości i wiarygodności interpretacji danych dotyczących badanych lipidów. Tego rodzaju kompleksowe podejście pozwala na wiarygodną identyfikację biomarkerów różnicujących analizowane grupy, a także na lepsze zrozumienie zmian metabolicznych i molekularnych towarzyszących badanym stanom chorobowym. W efekcie, połączenie selekcji sygnałów na podstawie ich znaczenia statystycznego z weryfikacją ich struktury za pomocą MS/MS stanowi fundament dalszych badań i interpretacji w zakresie lipidomiki oraz biologii molekularnej.

W każdym z podrozdziałów tej części rozprawy, mgr Patrycja Śliż-Szpytma w oparciu o dane z piśmiennictwa poddała analizie uzyskane wyniki własne i porównała z badaniami innych autorów.

Recenzowaną rozprawę doktorską wieńczą wnioski, które wynikają z założonych celów pracy i są kompetentnie uzasadnione przedstawionymi przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę wynikami badań. Doktorantka podkreśliła, że przeprowadzone badania, wykorzystujące zaawansowane techniki analityczne (PIXE, SIMS oraz MALDI-TOF MS), pozwoliły na zrealizowanie celów badawczych przyjętych w rozprawie. Dzięki przeprowadzonym eksperymentom uzyskano dane, które umożliwiły identyfikację potencjalnych markerów chorób mięśni. Zidentyfikowane czynniki różnicujące miały charakter zarówno w zakresie oznaczonych biopierwiastków (w tym K, Cl, P, S, Fe, Zn), jak i molekularny (w szczególności oznaczonych lipidów – zwłaszcza fosfatydylocholiny). Zaobserwowane różnice w rozmieszczeniu przestrzennym i stężeniu wybranych biopierwiastków, oraz w profilach molekularnych analizowanych próbek stanowią przesłankę do kontynuacji prac nad wykorzystaniem tych związków jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych. Zastosowane metody badawcze pozwoliły na identyfikację oraz charakteryzację zmian biochemicznych w tkankach mięśniowych. Wykorzystanie zaawansowanych metod statystycznych umożliwiło klasyfikację próbek oraz identyfikację zmiennych o największym potencjale różnicującym, co szczególnie podkreśla potencjał zaproponowanego podejścia eksperymentalno-analitycznego w diagnostyce różnicowej chorób mięśni. Mgr Patrycja Śliż-Szpytma wskazała również na celowość kontynuowania badań w oparciu o większą liczebność próbek mięśni szkieletowych.

Z obowiązku recenzenta poniżej zostaną wskazane dostrzeżone drobne niedociągnięcia i błędy edytorskie, których Doktorantka nie ustrzegła się:

na stronie 19 powinno być „Spośród”, a nie „Wśród”

Zdarzają się niefortunne określenia w tekście rozprawy doktorskiej jak np.:

„klasyfikacja miopatii dzieli je na dwie grupy” (strona 21)

Na stronie 24 jest „zgodnie w powyższym”, a powinno być „zgodnie z powyższym”

W piśmiennictwie podano 133 pozycje, z których pozycja 1 i 2 nie zostały zacytowane – cytowanie rozpoczęto od pozycji 3 i 4, a także na stronie 32 nie zacytowano pozycji 48.

Na stronie 111 (5 linijka od dołu) podano „w tabeli 6.7”, a powinno być „w tabeli 6.9).

Często używane jest niezręczne określenie „badania eksperymentalne wykazały” np. na stronie 43.

We wnioskach użyto niezręcznego określenia „wyniki jednoznacznie wskazują”.

Na stronie 125 błąd literowy w wyrazie „wykonani”, a powinno być „wykonaniu”

Zauważone błędy w niczym nie umniejszają bardzo dobrej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, a zostały podane, aby podkreślić, że recenzent uważnie przeczytał przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską.

3. Wniosek końcowy

1) W przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej mgr Patrycja Śliż-Szpytma prezentuje szeroką wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki fizyczne opisując szczegółowo i stosując praktycznie do oznaczania badanych składników organicznych i nieorganicznych w próbkach z wykorzystaniem metod: PIXE, MeV SIMS oraz MALDI-TOF. Doktorantka skutecznie wykorzystała swoją wiedzę i umiejętności do zbadania unikalnych próbek wykorzystując szeroką wiedzę i stosując aparaturę i metody specyficzne dla fizyki.

2) Szczegółowy opis wielu przeprowadzonych badań w Polsce, a także za granicą przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę w trakcie realizowania rozprawy doktorskiej świadczy o Jej dużej samodzielności, a uzyskane i opracowane statystycznie wyniki pozwalają na stwierdzenie, że Doktorantka wyczerpująco zrealizowała temat złożonej rozprawy doktorskiej. Dokładne omówienie przez Doktorantkę w każdym z podrozdziałów zastosowanych technik pomiarowych wynika z rzetelnej wiedzy teoretycznej i praktycznej, a opracowanie statystyczne otrzymanych wyników i ich graficzne przedstawienie zasługuje na najwyższe uznanie. Systematyczne podejście Doktorantki do rozwiązywania problemów badawczych i finalne efekty w postaci praktycznego zastosowania przeprowadzonych badań potwierdzają Jej dużą samodzielność i bardzo dobre opanowanie przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę warsztatu naukowego. Analizowanie tego samego materiału z wykorzystaniem różnych urządzeń dobieranych odpowiednio do zakładanych celów oznaczeń analitycznych, które umożliwiły kompleksową ocenę próbek mięśni ludzkich, a tym samym uzyskanie przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę interesujących wyników o znaczeniu praktycznym i świadczących o dobrych perspektywach Jej rozwoju naukowego.

3) Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest oryginalnym doniesieniem naukowym, które dotyczy niezwykle ciekawego zagadnienia z diagnostyki zmian narządowych, które dają

nadzieję dla lekarzy na pozyskanie nowej możliwości diagnozowania w przypadku próbek mięśni zmienionych patologicznie, dla których tradycyjne sposoby diagnostyki z zastosowaniem badań histologicznych i histochemicznych nie są wystarczające. Zaobserwowana synergia metod fizycznych ze statystyczną ewaluacją może być wykorzystana do rozróżnienia zmian chorobowych w przypadkach oceny typu procesu patologicznego, czy też stopnia jego zaawansowania przy badaniu bioptatów, dla których nie można postawić jednoznacznej diagnozy.

Ponadto w celu praktycznego zastosowania opracowanych procedur należy potwierdzić uzyskane wyniki badań na liczniejszej grupie bioptatów z wykorzystaniem wysoko specjalistycznej aparatury, takiej jaką zastosowano w niniejszej rozprawie doktorskiej. Należy podkreślić, że mgr Patrycja Śliż-Szpytma opublikowała część wyników badań w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, a także uzyskane wyniki zostały przedstawione na kilku konferencjach międzynarodowych. Podjęta przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę tematyka badań jest bardzo ważna z punktu widzenia naukowego oraz może mieć duże znaczenie dla potrzeb wspomagania diagnostyki histopatologicznej i histochemicznej tkanek mięśni szkieletowych człowieka objętych procesem patologicznym, a przeprowadzony szeroki zakres badań świadczy o dużych i wszechstronnych umiejętnościach Doktorantki.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska 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.

Bardzo wysoko oceniam istotny wkład wniesiony przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę w przeprowadzenie wyjątkowych i obiecujących, interdyscyplinarnych badań, a w szczególności na unikalnym materiale biologicznym z wykorzystaniem zaawansowanych i szczegółowo opisanych w rozprawie doktorskiej metod analitycznych wraz z zastosowaniem adekwatnych metod statystycznych. Uzyskane wyniki badań Doktorantki w niedalekiej przyszłości mogą mieć bardzo istotne znaczenie w diagnostyce różnicowej zmian patologicznych występujących w mięśniach u ludzi. W związku z tym zaliczam przedłożoną rozprawę doktorską do kategorii wybitnie dobrej i wnioskuję o jej wyróżnienie, które będzie potwierdzeniem bardzo wysokiej jakości rozprawy doktorskiej wykonanej przez mgr Patrycję Śliż-Szpytmę.


Prof. dr hab. n. farm. Włodzimierz Opoka

(podpis recenzenta)