

dr hab. inż. Ewelina Lipiec, prof. UJ
Instytut Fizyki
Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii
ul. Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków
Ewelina.Lipiec@uj.edu.pl
+48 12 664 45 85



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział

Fizyki

Astronomii

i Informatyki

Stosowanej

Kraków, 4 lutego 2025

Recenzja Pracy Doktorskiej

Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych

wykonanej przez mgr inż. Patrycję Śliż-Szpytma

pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Lankosza oraz
prof. dr hab. Dariusza Adamka

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej,

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie,

Badania nad składem cząsteczkowym i pierwiastkowym mięśni szkieletowych mają istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw schorzeń nerwowo-mięśniowych, takich jak dystrofie czy miopatie. Mięśnie, poza funkcją ruchową, pełnią ważną rolę w regulacji procesów metabolicznych, dlatego zmiany zachodzące w ich strukturze mogą odzwierciedlać zarówno lokalne, jak i ogólnoustrojowe zaburzenia. Analiza materiału ludzkiego pochodzącego z biopsji pozwala na bezpośrednie odniesienie uzyskanych wyników do stanu klinicznego pacjentów, co zwiększa wartość poznawczą badań oraz ich potencjalne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne.

Bardzo ważnym aspektem tych badań jest również zastosowanie komplementarnych, zaawansowanych technik analitycznych, które umożliwiają wielowymiarową charakterystykę badanej tkanki. Takie podejście stwarza możliwość identyfikacji nowych markerów chorobowych oraz pogłębia wiedzę na temat patofizjologii schorzeń mięśniowych, co w przyszłości może przyczynić się do rozwoju bardziej precyzyjnych metod diagnostycznych i terapeutycznych.

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

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Śliż-Szpytma wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badaczy, poprzez zastosowanie połączenia metod takich jak μ PIXE/STIM (micro-Particle Induced X-ray Emission combined with Scanning Transmission Ion Microscopy), MeV SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry using MeV primary ions) oraz MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) wraz z analizą fragmentacyjną LIFT (Laser-Induced Fragmentation Technique), w wysokorozdzielczej analizie rozmieszczenia pierwiastków oraz składu molekularnego tkanki mięśniowej.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Śliż-Szpytma została podzielona na cztery główne części, które stanowią spójną całość: i) wstęp, który obejmuje: budowę mięśni szkieletowych, klasyfikację miopatii i dystrofii mięśniowych, znaczenie lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni oraz teoretyczny zarys wykorzystanych metod badawczych; ii) metodologia pomiarowa, iii) wyniki oraz dyskusja, i iv) wnioski.

Rozprawę rozpoczyna streszczenie przedstawiające problem badawczy, zastosowane metody eksperymentalne oraz najważniejsze wnioski. Na początku wstępu został ujęty cel badań: „nie tylko wskazanie potencjalnych biomarkerów zmian patologicznych w mięśniach, ale również zaproponowanie podejścia badawczego integrującego dane chemiczne, molekularne i przestrzenne.” Nie ma natomiast, ani w streszczeniu ani we wstępie postawionej głównej hipotezy badawczej, która była testowana w ramach tej pracy doktorskiej. Zasadność podjęcia tematyki badawczej, która przedstawiona jest we wstępie, nie budzi najmniejszych wątpliwości, a szczegółowe przedstawienie znaczenia lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni pozwala czytelnikowi na samodzielne zaproponowanie hipotezy. Mimo tego, wg mojej opinii, sformułowanie hipotezy badawczej i napisanie jej przez Autorkę stanowiłoby wartość dodaną w tej pracy.

W części wstępnej znajdujemy kompleksowy, szczegółowy i systematyczny, a mimo to zwięzły opis badanego układu oraz podstaw teoretycznych wszystkich analitycznych metod eksperymentalnych użytych w ramach przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej. Pani mgr inż. Patrycja Śliż-Szpytma przytacza również dotychczasowe osiągnięcia naukowe w zakresie zastosowań poszczególnych technik analitycznych w badaniach próbek biologicznych. W mojej opinii jest to bardzo wartościowa część pracy, stanowiąca kompendium wiedzy, które może być wykorzystywane zarówno przez osoby rozpoczynające badania naukowe w zakresie radiobiologii i fizyki radiacyjnej jak i doświadczonych badaczy. Dość zwięzłe ale dokładne opisy świadczą o tym, iż Autorka posiada szeroką wiedzę i doświadczenie eksperymentalne oraz o pełnym zrozumieniu stosowanej metodologii i podjętej tematyki badawczej.

Opis metodologii pomiarowej jest poprawny, procedury opisane są starannie z dbałością o szczegóły. W opisie metodologii Autorka przedstawia część wyników a następnie odnosi się do nich w rozdziale Wyniki oraz dyskusja co jest nieintuicyjne i trochę niewygodne dla czytelnika.

Zastosowanie techniki PIXE w badaniach dystrybucji pierwiastków w badanych próbkach zostało dokładnie opisane wraz z procedurą kalibracji. Otrzymane wyniki zostały przeanalizowane za pomocą kilku narzędzi statystycznych: test Kruskala-Wallisa oraz Shapiro-Wilka, test U Manna-Whitney'a, wielowymiarowa analiza dyskryminacyjna (MDA) i lambda Wilksa oraz analiza głównych składowych (PCA). Istotne statystycznie różnice między zawartością sodu magnezu fosforu i siarki w badanych widmach wykazano za pomocą testów Kruskala-Wallisa oraz U Manna-Whitney'a. Wielowymiarowa analiza statystyczna wykazała, że zawartość chloru, fosforu siarki i potasu klasyfikuje próbki: kontrolną, miopatii i dystrofii.

Uzyskane za pomocą MALDI wyniki wykazały obecność lipidowych jonów, które można uznać za potencjalne markery charakterystyczne dla analizowanych klas tkanek. Jak pisze Autorka analiza obrazów jonowych w trybie ujemnym MALDI nie wykazała istotnego zróżnicowania ich przestrzennego rozmieszczenia na skrawkach mięśni. Wszystkie piki, które analiza statystyczna zakwalifikowała jako różnicujące pomiędzy analizowanymi grupami, zostały przypisane do różnych form fosfatydylocholiny.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Patrycji Śliż-Szpytma została napisana w języku polskim. Rysunki są przejrzyste, czytelne, i wzbogacają lekturę pracy. Występują niewielkie błędy edytorskie, które nie przeszkadzają podczas czytania rozprawy.

Wyniki prac badawczych opisanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Śliż-Szpytmy zostały zaprezentowane w jednym artykule naukowym. Pierwszo-autorska praca Doktorantki zatytułowana „Sub-cellular elemental imaging of human muscle tissues affected by neuromuscular diseases”, została opublikowana w czasopiśmie *Nukleonika*. Praca jest dość obszerna i przedstawia wyniki badania składu pierwiastkowego tkanek mięśniowych. Jest to wystarczający dorobek naukowy do ubiegania się o tytuł naukowy doktora.

SZCZEGÓŁOWE UWAGI DO ROZPRAWY

Podczas czytania rozprawy nasuwają się pewne bardziej szczegółowe pytania oraz zagadnienia:

- 1) Ilość próbek/pacjentów: jak pisze autorka „Do analiz wykonanych techniką SIMS wykorzystano cztery skrawki tkanek mięśniowych, pochodzące od mężczyzn w wieku 37 - 56 lat. Materiał badawczy obejmował: próbkę o potwierdzonym charakterze dystroficznym D, próbkę kontrolną C, próbkę reprezentującą miopatię M oraz próbkę o niejednoznacznym profilu histopatologicznym” i „W przypadku analiz wykonanych metodą PIXE, materiał badawczy obejmował cztery skrawki tkanek mięśniowych, wyselekcjonowanych zgodnie z klasyfikacją przedstawioną w rozdziale 5.1. Dwie próbki pochodziły z grupy kontrolnej C, natomiast po jednej z grupy miopatii M i dystrofii D.” Z każdej z badanych próbek zebrano setki widm i wszystkie wnikliwie przeanalizowano za pomocą zaawansowanych narzędzi statystycznych. Jestem ciekawa zdania autorki czy tą grupę próbek oraz liczbę pacjentów możemy uznać za reprezentatywne?
- 2) W rozprawie zaprezentowano zastosowanie wnikliwego statystycznego podejścia do danych uzyskanych za pomocą komplementarnych technik analitycznych (PIXE, SIMS oraz MALDI-TOF MS). Rezultaty porównano, natomiast w mojej opinii ciekawa byłaby jednoczesna analiza serii danych uzyskanych za pomocą różnych metod. Jestem ciekawa zdania Autorki jakie metody można zastosować aby zbadać korelacje pomiędzy składem pierwiastkowym i cząsteczkowym.
- 3) Przedstawienie tabel 6.7 i 6.8, zestawiających wartości ładunków czynnikowych, w formie graficznej zwiększyłoby przejrzystość prezentacji otrzymanych wyników.
- 4) W metodzie SIMS kalibrację w celu korekty położenia charakterystycznych pików przeprowadzono poprzez dopasowanie wielomianu trzeciego stopnia do pozycji znanych pików referencyjnych (np. H^+ , Na^+ , K^+ , fragmenty PDMS). Jakie fragmenty PDMS brano pod uwagę?

Powyższe uwagi/komentarze są sugestią do dyskusji, która może zostać podjęta podczas obrony pracy.

PODSUMOWANIE

W mojej opinii niniejsza rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, biorąc pod uwagę duże znaczenie podjętej tematyki badawczej, kompleksowe, dogłębne i systematyczne podejście do wykonywanych prac badawczych i analizy danych. Zrealizowane prace eksperymentalne i wykonana analiza statystyczna otrzymanych danych pozwoliły osiągnąć cel pracy.

Przedstawiona rozprawa wnosi istotny wkład do dyscypliny fizyka, w szczególności w obszarze fizyki medycznej oraz biofizyki, poprzez rozwój i zastosowanie zaawansowanych metod analitycznych do badań materiału

biologicznego. Autorka w sposób kompetentny i oryginalny wykorzystwała komplementarne techniki oparte na oddziaływaniu promieniowania jonizującego z materią, takie jak μ PIXE/STIM oraz MeV SIMS, uzupełnione metodą MALDI-TOF MS, do wysokorozdzielczej analizy rozmieszczenia pierwiastków i składu molekularnego tkanek mięśniowych. Praca stanowi wartościowy przykład interdyscyplinarnego zastosowania metod fizycznych w badaniach biomedycznych, a jednocześnie pogłębia wiedzę na temat możliwości i ograniczeń tych technik w analizie złożonych, niejednorodnych układów biologicznych.

Istotnym osiągnięciem z punktu widzenia fizyki jest także metodyczne podejście do analizy danych eksperymentalnych, obejmujące zaawansowane narzędzia statystyczne i wielowymiarowe, pozwalające na obiektywną klasyfikację badanych próbek na podstawie ich cech fizykochemicznych. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką czułość i użyteczność technik jądrowych i spektrometrii mas w obrazowaniu tkanek oraz w identyfikacji subtelnych różnic w składzie pierwiastkowym i molekularnym. Rozprawa przyczynia się tym samym do rozwoju metodologii pomiarowej i analitycznej w fizyce stosowanej, dostarczając solidnych podstaw do dalszych badań nad wykorzystaniem technik fizycznych w diagnostyce oraz badaniach patofizjologii chorób nerwowo-mięśniowych.

Podsumowując uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Niniejszym wnioskuję do Rady Dyscypliny Fizyka Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Patrycji Śliż-Szpytma do dalszych etapów przewodu doktorskiego.