

Opinia o rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Wandzilak pt.:

Selected chemical elements as potential indicators of cancerous brain tissue

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Wandzilak poświęcona jest wykorzystaniu wybranych metod z zakresu spektroskopii rentgenowskiej do badania koncentracji pierwiastków śladowych w tkankach mózgu ludzkiego w celu porównania ich zawartości i rozkładów w tkankach nowotworowych i zdrowych. Badania te mają wielkie znaczenie fundamentalne, gdyż pozwalają poszerzyć istniejącą wiedzę na temat biochemii procesów tworzenia nowotworów mózgu, jak również duże znaczenie praktyczne w aspekcie medycznym. Opisane w rozprawie badania mają charakter wieloaspektowy i prowadzone były w sposób możliwie systematyczny. Dotyczą one kilku rodzajów nowotworu mózgu o różnych stopniach złośliwości, badane są koncentracje, rozkłady i stan chemiczny kilku pierwiastków śladowych, w badaniach stosowane były różne metody badawcze z zakresu spektroskopii rentgenowskiej, a otrzymane wyniki analizowane były wieloaspektowo stosując zaawansowane metody statystyczne. Podejście takie umożliwiło, mimo złożonej natury problematyki, uzyskać wiele interesujących informacji o roli badanych pierwiastków w procesie powstawania nowotworów mózgu. Dobrym tego przykładem jest opisana w rozprawie możliwość klasyfikacji histopatologicznej nowotworów mózgu na podstawie zbadanych zawartości i rozkładów pierwiastków śladowych. Badania opisane w rozprawie są dobrym przykładem intensywnie rozwijającej się fizyki medycznej, gdzie trudne zagadnienia z zakresu medycyny (nowotwory mózgu) próbuje się rozwiązywać stosując nowoczesne metody badawcze z zakresu fizyki.

Ważnym aspektem rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Wandzilak jest kompleksowe podejście do problemu badania eksperymentalnego koncentracji pierwiastków śladowych w tkankach mózgu poprzez stosowanie różnych nowoczesnych metod badawczych z zakresu spektroskopii rentgenowskiej wykorzystując mikrowiązki promieniowania synchrotronowego lub protonów. Należy zaznaczyć, że małe rozmiary stosowanych mikrowiązek, będące w zakresie od $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (PIXE) do $2 \times 4 \mu\text{m}^2$ (XRF), umożliwiały szczegółowe badanie metodą

fluorescencji rentgenowskiej obserwowanych struktur w tkankach mózgu. Przedstawione badania prowadzone były metodami rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej na mikrowiązce promieniowania synchrotronowego (μ XRF), rentgenowskiej analizy emisyjnej na mikrowiązce protonów (μ PIXE), metodami krawędziowej (XANES) i ponadkrawędziowej (EXAFS) absorpcji rentgenowskiej na wiązce promieniowania synchrotronowego oraz skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej (STIM) na mikrowiązce protonów. Przytoczone eksperymenty przeprowadzone były w czołowych ośrodkach badawczych w Europie dysponującymi źródłami promieniowania synchrotronowego (Diamond Light Source (DLS) w Didcot w Wielkiej Brytanii, DORIS-III w HASYLAB/DESY w Hamburgu w Niemczech i European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) w Grenoble we Francji) oraz w Instytucie Josefa Stefana w Ljublanie w Słowenii posiadającym akcelerator typu tandem wytwarzający mikrowiązkę protonów. Należy podkreślić, że ośrodki te posiadają dobrze rozwiniętą infrastrukturę badawczą, wraz z metodami akwizycji i analizy danych, do prowadzenia badań przedstawionych w rozprawie. Warto również odnotować, że badane próbki tkanek mózgu wymagały stosowania specjalnych kriogenicznych technik preparacyjnych, co wymuszało z kolei zbadanie wpływu działania mikrowiązek promieniowania X lub protonów na koncentracje pierwiastków śladowych w badanych próbkach.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Wandzilak zatytułowana "Selected chemical elements as potential indicators of cancerous brain tissue" przygotowana została pod opieką naukową prof. dr. hab. inż. Marka Lankosza na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH w Krakowie. Rozprawa, napisana w języku angielskim i licząca 116 stron, opisuje wszystkie istotne aspekty prowadzonych badań, w tym poza wstępem, szeroko opisane aspekty biologiczne rozprawy, podstawy teoretyczne stosowanych metod badawczych, opis aparatury i metodologię pomiarów oraz wyniki pomiarów wraz z dyskusją, gdzie prezentowane są główne rezultaty badawcze rozprawy. Rozprawę zamyka podsumowanie (nie ujęte w spisie treści!) oraz obszerny spis cytowanych prac liczący 107 pozycji. Układ rozprawy jest właściwy, uwzględniający wszystkie aspekty prowadzonych badań. Należy zaznaczyć że zwarte opisanie przeprowadzonych badań nie było łatwym zadaniem dla autorki biorąc pod uwagę wieloaspektowość opisanych badań (kilka typów nowotworów o różnych stopniach złośliwości, wiele analizowanych pierwiastków, kilka metod pomiarowych i aspektów analizy danych). Z tego skomplikowanego zadania autorka wywiązała się, w mojej opinii, bardzo dobrze. Pewną niedogodnością redakcyjną rozprawy

jest zbyt uproszczony sposób opisywania rysunków, gdzie o istotnych informacjach dotyczących przedstawianych wyników należy wnioskować z kontekstu, np. rozdziału lub podrozdziału, a nie na z podpisu do rysunku. Przykładem może być ciągła wątpliwość czytelnika: wyniki XRF czy PIXE? Z kolei godnym odnotowania jest fakt, że rozprawa napisana została poprawnie w języku angielskim.

Przedstawione w rozprawie rezultaty badawcze dotyczą zmierzonych metodą fluorescencji rentgenowskiej (μ XRF), z mikronową zdolnością rozdzielczą, 2-wymiarowych rozkładów poprzecznych wybranych pierwiastków mniejszościowych (P, S, Cl, K, Ca) i śladowych (Fe, Cu, Zn) w badanych tkankach mózgu. Pomiarzy przeprowadzone na mikrowiązce protonowej metodą μ PIXE umożliwiły dodatkowo zbadanie rozkładów pierwiastków lżejszych takich jak Na i Mg. W pomiarach synchrotronowych metodą μ XRF określano gęstości powierzchniowe pierwiastków [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$], podczas gdy w pomiarach metodą μ PIXE wyznaczano wagowe koncentracje względne [ppm]. W konsekwencji, granice wykrywalności (LOD) pierwiastków metodą μ XRF określone zostały na poziomie $0.3 - 0.002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (P-Zn) oraz dla metody μ PIXE w zakresie 90-25 ppm (Na - Zn). Rozkłady badanych pierwiastków zmierzone były w obszarach rzędu $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, co umożliwiało szczegółowe badanie rozmieszczenia tych pierwiastków w obserwowanych strukturach biologicznych. Badania absorpcji promieniowania rentgenowskiego przeprowadzone zostały metodami XANES i EXAFS w obszarze krawędzi absorpcji dla powłoki K dla pierwiastków śladowych Fe, Zn i Cu. Pomiarzy XANES umożliwiły określić stan chemiczny (wartościowość) badanych pierwiastków ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Zn/Zn^{2+} , $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$) w związkach chemicznych występujących w tkankach mózgu, podczas gdy pomiary oscylacji EXAFS dały możliwość określania położenia najbliższych atomów w tych związkach. W ten sposób pomiary absorpcyjne XANES/EXAFS umożliwiły określenie otoczenia chemicznego badanych pierwiastków śladowych. Opisana w rozprawie analiza statystyczna zmierzonych rozkładów badanych pierwiastków w tkankach nowotworowych umożliwiła zbadanie korelacji pomiędzy typem histopatologicznym nowotworu i stopniem jego złośliwości (skala I-IV wg. klasyfikacji WHO). W tym aspekcie, w szczególności, badane były zróżnicowania zawartości pierwiastków śladowych w tkankach nowotworowych i zdrowych (tzw. grupa kontrolna), korelacje pomiędzy różnymi pierwiastkami w obszarach homogenicznych i w obserwowanych strukturach, oraz zróżnicowanie chemiczne (wartościowość, struktura otoczenia) pierwiastków w badanych tkankach. Stosowane metody statystyczne obejmowały, właściwy w tym przypadku, nieparametryczny test rangowy, Mann'a-Whitney'a do

porównywania zawartości pierwiastków, wielokrotną analizę dyskryminacyjną (MDA) w badaniu zróżnicowania uwzględniającego wiele cech czy też analizę korelacyjną. Metody te, w przypadku badania pierwiastków śladowych techniką μ XRF, pozwoliły rozróżnić, z wysokim prawdopodobieństwem, typy histopatologiczne nowotworów na podstawie zmierzonych rozkładów pierwiastków. Technika μ PIXE nie umożliwiła takiego rozróżnienia, co może być spowodowane, jak sugeruje rozprawa, zastosowaniem innej metody przygotowania próbek. Należy zaznaczyć, że, generalnie, wyniki otrzymane metodami μ XRF oraz μ PIXE nie są spójne, co wymaga dokładniejszej dyskusji przyczyn tego faktu.

W ocenianej rozprawie, pomimo mojej pozytywnej oceny całości pracy, odnotowuję nieliczne potknięcia, które w większości dotyczą opisu przedstawionych zagadnień i nie wpływają na prezentowane rezultaty. Przykładem tego może być zdanie w rozprawie „Synchrotron Radiation is the electromagnetic radiation emitted by charged particles moving at near-light speed” (str. 26), czy też stwierdzenie “charged molecule passing (magnetic) structure...” (str. 27) w zdaniu opisującym działanie wigglera czy undulatora. Podobnie, omawiając charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie stwierdzenie „dipole transitions” (str. 29) jest niewystarczające (elektryczne czy magnetyczne ?), a przytoczone reguły wyboru są błędne. Masowe współczynniki pochłaniania promieniowania rentgenowskiego, $\mu[\text{g}/\text{cm}^2]$, są przedstawione w rozprawie w zbyt uproszczonej postaci analitycznej (rów. 3.12, 3.13, 3.15) bez wskazania źródła literaturowego, podczas gdy zazwyczaj do ich obliczania wykorzystuje się dostępne programy, na przykład powszechnie znany i stosowany XCOM. Czy to oznacza że w obliczeniach były stosowane te uproszczone formuły? Dodatkowo, wyrażenia 3.15 i 3.16 są błędne wymiarowo. W opisie równania 3.18 wielkość E powinna oznaczać energię fotony (nie elektronu), a w równaniu 3.19 mianownik $\Delta\mu_0(E)$ nie jest zdefiniowany. Opis definicji granic wykrywalności (LOD) i kwantyfikacji (LOQ) w równaniach 4.1 i 4.2 jest niewłaściwy.

Przechodząc do oceny przedstawionych w rozprawie rezultatów badawczych odnotowałem kilka kwestii wymagających ustosunkowania się do nich Doktorantki. Krzywe kalibracji metody XRF (rys. 4.5) i PIXE (rys. 4.10) winny pokazywać błędy eksperymentalne, które istotnie mogą modyfikować kalibrację metody. Tak jest w przypadku krzywej XRF, gdzie rozrzut punktów eksperymentalnych jest znaczny. Jaki wpływ może mieć ten efekt na końcową interpretację wyników? Czy podjęta została próba bezpośredniego porównania

wyników koncentracji mierzonych metodą XRF i PIXE? Pomocna mogła by być w tym kontekście normalizacja widm XRF wykorzystująca obserwowane piki rozproszenia promieniowania X na badanych próbkach. Wyniki pomiarów zawartości pierwiastków w próbkach metodą XRF zestawione są na rysunku 5.3 a charakterystyki zmierzonych rozkładów pokazane są w Tabeli 5.1. Czy w tej tabeli pokazana jest wariancja czy też odchylenie standardowe (na co wskazuje wymiar tej wielkości). Dane przytoczone w tabeli nie są spójne z tym co jest widoczne na rysunku 5.3 (półszerokości rozkładów). W jakim stopniu w diskutowanych wynikach pomiary XRF były poniżej granicy wykrywalności? To są, w mojej opinii, istotne informacje mogące wpływać na końcową interpretację wyników. Należy zaznaczyć, że problem ten pojawia się w rozprawie z całą jaskrawością na stronach 84-85, gdzie znajdujemy że w 70-80% pixeli zmierzone koncentracje wynosiły zero, tzn. w istocie były poniżej progu wykrywalności. Jest to klasyczny, i zarazem trudny, problem „cenzurowanych” pomiarów, którego wpływ na wyniki winien być przedyskutowany. W mojej opinii stosowane w rozprawie metody statystyczne (wielokrotna analiza dyskryminacyjna, analiza korelacyjna), pomimo wykorzystywania powszechnie dostępnych pakietów statystycznych takich jak Statistica, winny być nieco szerzej wprowadzone w tekście rozprawy. Przykładem może być szeroko diskutowany w pracy współczynnik korelacji nigdzie nie zdefiniowany w rozprawie.

Przechodząc do podsumowania oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Wandzilak pragnę podkreślić wieloaspektowy i szeroki zakres przeprowadzonych przez Doktorantkę bardzo interesujących i ważnych badań z zakresu fizyki medycznej dotyczących próby wyjaśnienia roli pierwiastków śladowych w tkankach nowotworowych mózgu. W badaniach tych stosowane były najnowocześniejsze metody eksperymentalne fizyki, w szczególności unikalne źródła promieniowania synchrotronowego czy mikrowiązki protonów. Przeprowadzone badania wykazały istnienie korelacji pomiędzy rozkładem pierwiastków śladowych a typem histopatologicznym, czy złośliwością, badanych nowotworów mózgu. Są to bardzo wartościowe wyniki o dużym znaczeniu zarówno podstawowym jak i praktycznym dla medycyny. Pomimo drobnych wskazanych niedociągnięć, oraz sugestii do wykorzystania w przyszłych badaniach, przedłożoną rozprawę oceniam zdecydowanie pozytywnie. Spełnia ona wszelkie wymagania stawiane formalnie i zwyczajowo rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Pani Aleksandry Wandzilak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

