



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dnia 25 maja 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

“Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the quest of new tissue markers of neuromuscular diseases.” wykonanej przez Panią Paulę Kasprzyk pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Marka Lankosza w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie oraz Pana prof. dr hab. med. Dariusza Adamka z Zakładu Neuropatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Choroby mięśni, w których dysfunkcja wynika z patologii samej komórki mięśniowej, nie zaś uszkodzenia układu nerwowego, określa się ogólną nazwą miopatii. Miopatie stanowią grupę schorzeń tkanki mięśniowej o różnej etiopatogenezie, różnym przebiegu dysfunkcji mięśniowej i zróżnicowanym przebiegu klinicznym oraz konsekwencjach dla osoby dotkniętej chorobą.

Jedną z metod rozpoznawania tych schorzeń jest biopsja mięśni z oceną histopatologiczną; nie zawsze jednak pozwala to na postawienie jednoznacznego rozpoznania. Pomocne mogą być wtedy zaawansowane metody współczesnej fizyki pozwalające na ocenę subtelnych zmian pierwiastkowych i biomolekularnych w tkance mięśniowej, między innymi technika fluorescencji rentgenowskiej promieniowania synchrotronowego (SR-XRF), która jest rodzajem jakościowej i ilościowej metody obrazowania rozkładów przestrzennych pierwiastków w próbkach biologicznych oraz spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), pozwalająca w badanych próbkach zobrazować różnice wynikające ze składu biomolekularnego tkanek.

Ponadto, ponieważ zmiany pierwiastkowe jak i biomolekularne mogą odzwierciedlać procesy biochemiczne zachodzące we włóknach mięśniowych, badanie ich na różnych etapach rozwoju choroby może prowadzić do lepszego poznania patofizjologii tych zaburzeń. Co więcej, analiza różnic obserwowanych w prawidłowych i/lub uszkodzonych tkankach może wspomóc i uzupełnić diagnostykę tych zaburzeń.

Katedra Patofizjologii

ul. Czysa 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Tym cenniejsze są więc badania ukierunkowane na poszukiwanie takich właśnie metod, będących w przyszłości wsparciem/uzupełnieniem stosowanych w praktyce klinicznej metod diagnostycznych. Praca doktorska Pani Pauli Kasprzyk pt. "Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the quest of new tissue markers of neuromuscular diseases." wychodzi na przeciw tym oczekiwaniom.

Należy tutaj podkreślić, że praca ma charakter doktoratu interdyscyplinarnego i została zrealizowana w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie pod kierunkiem Pana prof. dr hab. inż. Marka Lankosza oraz Pana prof. dr hab. med. Dariusza Adamka z Zakładu Neuropatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, wybitnych specjalistów o światowej renomie w swoich dziedzinach.

Przedstawiona do recenzji praca Pani Pauli Kasprzyk stanowi przykład dysertacji klasycznej (monografii) o układzie przyjętym powszechnie dla dysertacji doktorskich.

Pracę otwierają streszczenia w języku angielskim oraz w języku polskim. Na kolejne części rozprawy składają się: wprowadzenie, założenia i cele badawcze, wstęp, opis eksperymentów zawierający przedstawienie metod i materiału badawczego oraz narzędzi analizy statystycznej, wyniki pomiarów, dyskusja, wnioski, bibliografia oraz obszerny spis tabel i rycin. Praca w całości liczy 116 stron. Należy nadmienić, że monografia została przygotowana w języku angielskim.

Rozpoczynające pracę streszczenia w języku angielskim oraz w języku polskim przedstawiają zwięźle i rzeczowo treści zawarte w dysertacji doktorskiej.

We wstępie pracy Autorka krótko wprowadza czytelnika w temat w przystępny sposób przybliżając podstawowe pojęcia i techniki wykorzystane w pracy doktorskiej.

Następnie Autorka przedstawia założenia i cele badawcze rozprawy doktorskiej, którymi było zbadanie zmian chemicznych i biomolekularnych zachodzących w tkance mięśniowej

Katedra Patofizjologii

ul. Czysa 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
w Krakowie

Wydział Lekarski

dotkniętej procesem patologicznym, tj. miopatią i dystrofią, w porównaniu z tkanką referencyjną, czyli tkanką mięśniową, która nie wykazywała mikroskopowych cech patologicznych.

W kolejnym rozdziale „Background...” – właściwym wstępie – w pierwszej jego części możemy zapoznać się z budową strukturalną mięśni szkieletowych, najczęstszymi chorobami i zaburzeniami mięśni i uzasadnieniem wyboru tkanki do badań, zaś w części drugiej – „fizycznej” przedstawiono podstawy teoretyczne X-ray Fluorescence Spectroscopy (XRF) oraz metody FTIR - the Fourier transform infrared microspectroscopy. Ta część dysertacji wskazuje na rzetelną znajomość tematu badawczego i logiczną drogę naukową doktorantki, z której wynikają dalej opisane badania, a także dowodzi opanowania warsztatu prezentacji treści naukowych.

W podrozdziale poświęconym materiałowi i metodom zaprezentowano obszernie sposób gromadzenia i kwalifikacji materiału oraz jego przygotowania i dalszej analizy. Próbkę tkanki mięśniowej pobrano chirurgicznie od 24 pacjentów (13 mężczyzn i 11 kobiet) – 8 osób z dystrofią, 9 sklasyfikowanych jako miopatie i 7 przypisanych do grupy referencyjnej. Opisano sposób przygotowania preparatów do badań histologicznych i spektrometrycznych, szczegółowo uzasadniając wybór metody obrazowania tkanek, liczbę skanów oraz przedstawiono także wynikające z zastosowanych procedur ograniczenia. Opisano także wyczerpująco zastosowane metody obrazowania. Należy podkreślić, że zaletą było przeprowadzenie analiz tego samego materiału w różnych ośrodkach europejskich, na różnych urządzeniach o różnej charakterystyce wiązek dobranych odpowiednio do zakładanych celów oznaczeń, a jednak pozwalających w sumie na komplementarną ocenę próbek i uzyskanie interesujących wyników.

Bardzo ciekawy z punktu widzenia odbiorcy wyników takich analiz był, często nieuświadomiony przez nie-fizyków fakt, że pozyskiwanie wyników z próbek wiąże się ze zniszczeniem lub co najmniej uszkodzeniem próbki badanej przy zastosowaniu niszczącej techniki SR-XRF, a także FTIR, dlatego cenne jest, że Autorka pokusiła się o ocenę wpływu uszkodzeń radiacyjnych na tkankę próbki, a widma uzyskane przed i po ewentualnych

Katedra Patofizjologii

ul. Czysta 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
w Krakowie

Wydział Lekarski

uszkodzeniach przedstawiła w części wynikowej pracy.

Warto także podkreślić, że do analizy danych uzyskanych podczas eksperymentów wykorzystano dedykowane oprogramowanie, a dane poddano analizie metodami zaawansowanej statystyki wspartej specjalistycznym oprogramowaniem. Ponadto zwracają uwagę bardzo czytelne i dopracowane ilustracje zamieszczone w monografii.

Z obowiązku recenzenta, należy tylko zwrócić uwagę na niefortunne użycie słowa „methodology” w tytule rozdziału; lepszym byłoby użycie np. słowa „Methods”, co mam nadzieję uwzględni Autorka w przygotowywanych w przyszłości publikacjach.

Cześć wynikowa jest bardzo obszerna, szczegółowa, bogato zilustrowana wykresami oraz dopracowana. Z przeprowadzonych badań wynika, że istnieje różnica zarówno w składzie pierwiastkowym jak i biomolekularnym pomiędzy tkanką zdefiniowaną jako grupa referencyjna, a tkankami uszkodzonymi - grupą dystrofii oraz miopatii. Największe różnice dla włókien stwierdzono dla pierwiastków takich jak: P, K, Ca oraz Cr, jednak dla wszystkich analizowanych pierwiastków można zauważyć zmniejszenie ich zawartości w grupie osób z dystrofią. W przypadku pomiarów składu biomolekularnego z wykorzystaniem FTIR zaobserwowano, że wartość pola powierzchni netto pod analizowanym pikiem była najwyższa dla grupy z dystrofią w porównaniu z pozostałymi dwoma grupami. We włóknach hipertroficznym zaobserwowano wyższą zawartość białka, natomiast we włóknach atroficznym stwierdzono ponadto zmianę tkanki mięśniowej w kierunku stłuszczenia.

W kolejnej części dysertacji - dyskusji - doktorantka w oparciu o dane z piśmiennictwa poddała analizie uzyskane wyniki własne i porównała z dostępnymi badaniami innych autorów. Wykazała znajomość dyskutowanych zagadnień oraz literatury tematu. Warto zaznaczyć, że zarówno ośrodki, w którym doktorantka realizowała pracę badawczą, jak i opiekunowie są uznanymi w kraju i w świecie ekspertami w swoich dziedzinach.

Dyskusję wieńczą wnioski, które wynikają bezpośrednio z założonego celu pracy i są należycie uzasadnione przedstawionymi wynikami badań, a mianowicie:

Katedra Patofizjologii

ul. Czysła 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

- na podstawie pomiarów składu pierwiastkowego przeprowadzonych metodą SR-XRF stwierdzono obecność następujących pierwiastków: Cl, K, P, S, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr i Br.

- wyniki analizy dyskryminacyjnej uzyskane dla włókien wykazały, że w rozróżnianiu włókien określanych jako grupa referencyjna od tych sklasyfikowanych jako włókna dotknięte zmianami patologicznymi, największą rolę odgrywa analiza zawartości pierwiastków takich jak P, K, Ca i Cr.

- dla wszystkich analizowanych pierwiastków pole powierzchni netto pod pikiem było najniższe dla grupy dystrofii w porównaniu do grupy miopatii i grupy referencyjnej.

- w przypadku pomiarów składu pierwiastkowego endomysium metodą SR-XRF możliwe było oznaczenie takich pierwiastków jak: Fe, Cu, Zn, Br i Rb.

- ponieważ wartość pola powierzchni netto pod pikiem dla wszystkich analizowanych pierwiastków dla grup dystrofii i miopatii jest znacznie niższa w porównaniu z grupą referencyjną, może to wskazywać, że pierwiastki te są metabolizowane i usuwane z tkanki mięśniowej dotkniętej procesami patologicznymi.

- w przypadku oceny składu biomolekularnego za pomocą FTIR można zauważyć, że wartość pola powierzchni netto pod analizowanym pikiem była najwyższa w grupie dystrofii w porównaniu z pozostałymi dwiema grupami. Wyższą zawartość białka można zaobserwować we włóknach przerostowych, podczas gdy włókna zanikowe wykazują konwersję tkanki mięśniowej w kierunku stłuszczenia.

- niewielkie różnice zaobserwowano w zmianach powierzchni netto pod pikiem dla pasm odpowiadających kwasom nukleinowym. Może to wskazywać, że struktury takie jak jądra komórkowe nie ulegają rozkładowi podczas badanych procesów chorobowych.

- w przypadku badania składu biomolekularnego endomysium największe zmiany powierzchni netto pod pikiem zaobserwowano dla pasm odpowiedzialnych za kwasy nukleinowe i pasma $\sim 1388\text{ cm}^{-1}$ odpowiedzialnego za kwasy tłuszczowe.

Katedra Patofizjologii

ul. Czysła 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
W Krakowie

Wydział Lekarski

- wiązka promieniowania synchrotronowego o energii ~14 keV nie zmienia znacząco struktury biomolekularnej tkanki.

- analiza pierwiastkowa i biomolekularna bioptatów mięśni może stanowić potencjalne uzupełnienie oceny histopatologicznej mięśni.

Załączone w bibliografii piśmiennictwo obejmuje 61 wybranych pozycji, przedstawiające zarówno pozycje uznane za klasyczne, jak również wyniki ostatnich badań, sięgające do roku 2021, które zostały prawidłowo zacytowane w rozprawie.

Załączony na końcu monografii spis rycin i zdjęć jest obszerny, natomiast – ponieważ ryciny i zdjęcia są podpisane w tekście pracy - w zasadzie nie jest on niezbędny w dysertacji.

Byłoby natomiast wskazane, aby w części końcowej dysertacji Autorka zamieściła skan zgody właściwej komisji bioetycznej na przeprowadzenie badań.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca jest oryginalnym, interdyscyplinarnym doniesieniem naukowym. Dotyczy ciekawego zagadnienia z pogranicza kliniki i diagnostyki zmian narządowych, które Autorka próbuje zgłębić metodami specyficznymi dla nauk podstawowych poza-medycznych.

Należy stwierdzić, że cel rozprawy doktorskiej założony przez badaczkę został zrealizowany, a przedstawiona rozprawa może w przyszłości mieć praktyczne implikacje w diagnostyce zmian o charakterze degeneracyjnym w chorobach mięśni i przyczynia się do rozwoju wiedzy w tym zakresie, chociaż jej stosowanie wymaga jednak wysoko specjalistycznej aparatury oraz potwierdzenia na większej grupie bioptatów.

Podsumowując, stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa przygotowana przez Panią Paulę Kasprzyk pt. "Biomolecular and elemental micro-analysis of the skeletal muscle in the quest of new tissue markers of neuromuscular diseases." pod kierunkiem Pana

Katedra Patofizjologii

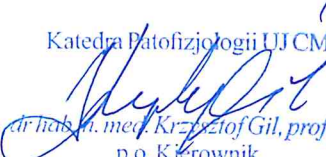
ul. Czysła 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-
uj.krakow.pl



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

prof. dr. hab. inż. Marka Lankosza w Katedrze Fizyki Medycznej i Biofizyki Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie oraz Pana prof. dr. hab. med. Dariusza Adamka z Zakładu Neuropatologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz.478 ze zm.) i dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Fizycznych AGH w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani Pauli Kasprzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Patofizjologii UJCM

dr hab. n. med. Krzysztof Gil, prof. UJ
p.o. Kierownik

Katedra Patofizjologii

ul. Czysta 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, faks +48 12 632 90 56, e-mail: patofizjo@cm-
uj.krakow.pl