



KATEDRA  
BIOFIZYKI

Lublin, 01 września 2020 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS  
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Kubicz pt. „Biomedical applications of Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy: nanostructural characterization of normal and cancer cells and tissues”**

Nowotwory przynależą do tych chorób, które charakteryzują się stosunkowo długim czasem rozwoju oraz trwania. Ich rozrost do formy umożliwiającej wykrycie i podjęcie leczenia może trwać latami. Często, nie obserwuje się przy tym jakichkolwiek objawów klinicznych, które mogłyby wskazywać na ich obecność, co w nierzadkich przypadkach, uniemożliwia wdrożenie odpowiednich działań. Powszechnie rekomendowane są więc procedury pozwalające na diagnozowanie wczesnej fazy nowotworu. Polegają one na wykonywaniu badań histopatologicznych, genetycznych, przeprowadzaniu wywiadów rodzinnych lub diagnostyce przy użyciu wysokospecjalistycznej aparatury. Jak ważkim jest problem zahamowania umieralności na choroby nowotworowe niech świadczy fakt, że w roku 2020 za priorytetowy w dziedzinie zdrowia uznała go Komisja Europejska.

Cykl badań wykonanych przez Panią mgr Ewelinę Kubicz oraz zaprezentowanych w ramach Jej rozprawy doktorskiej jest ściśle związany z tym właśnie obszarem. Celem Jej pracy było zbadanie, głównie przy użyciu techniki czasowo-rozdzielczej, czy pozyton może stanowić znacznik, odpowiedni do zastosowania w diagnostyce nowotworów. Wobec faktu, iż czas życia związanej pary elektron-pozyton zależy od ośrodka, w którym się ona się tworzy,

a w szczególności od rozmiaru wolnej objętości, w której została spuławkowana, powzięta hipoteza zakładała rejestrowanie różnic właśnie tego parametru dla komórek prawidłowych i nowotworowych. Znaczny potencjał aplikacyjny przedłożonej pracy stanowi, że podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest w mojej opinii opracowaniem interesującym oraz ważnym.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Pawła Moskala oraz dr hab. Ewy Stępień, prof. UJ na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego, w jednym z czołowych laboratoriów w kraju zaangażowanym w badania z obszaru spektroskopii czasów życia pozytonów (PALS). Doktorantka kształtowała swój warsztat badawczy w szeregu projektów, których rezultaty ukazały się w znakomitej liczbie artykułów naukowych oraz doniesień konferencyjnych. Prace charakteryzują się różnorodnymi wartościami oddziaływania tzw. impact factor i w znacznej większości są wieloautorskie. W ogólności, Doktorantka jest autorem bądź współautorem 72 publikacji naukowych i doniesień konferencyjnych powstałych w latach 2014-2020. Część eksperymentów wykonana została w innych, niż macierzysty ośrodkach wydziałowych, co świadczy o otwartości Doktorantki na zawieranie współpracy naukowych, mających na celu realizację postawionych sobie celów badawczych.

Praca doktorska została przygotowana w języku angielskim na 105 stronach maszynopisu. Podzielono ją na dziewięć rozdziałów, poprzedzonych oświadczeniem o autorstwie eksperymentów, streszczeniem (przygotowanym zgodnie z wymogami formalnymi w języku polskim i angielskim), informacją o instytucji finansującej badania, spisem treści oraz wykazem użytych skrótów i oznaczeń. Rozprawę rozpoczyna rozdział *Introduction*, który zawiera autorsko dobrany przegląd najistotniejszych informacji wprowadzających w aktualny stan wiedzy, otwarte problemy badawcze, a także cel i motywację dla przeprowadzonych eksperymentów. Rozdział 2 zawiera opis podstaw fizycznych kreacji stanu związanego  $e^+e^-$ , sposobów anihilacji elektronu i pozytonu, a także zależności pomiędzy czasem życia orto-pozytu, a rozmiarem wolnej objętości, w której zostało ono wykreowane. Do opisu zachowania takiej pary przyjęto model teoretyczny Tao-Eldrupa o geometrii sferycznej. Teoria zjawiska wprowadzana jest w sposób systematyczny, poprzez przejrzyste i przemyślane grafiki. Określono w niej notację średniego czasu życia pozytu. Autorka wyraża przekonanie, że skoro promienie wolnych objętości obliczone za pomocą modelu Tao-Eldrupa

leżą w przedziale 0,2 – 2 nm, mogą one w sposób zadowalający służyć dalej za model do odwzorowywania podjednostek układu komórkowego.

W rozdziale trzecim mgr Kubicz charakteryzuje procesy powstawania komórek rakowych oraz przytacza ogólnie obowiązujące podziały dla grup i rodzajów nowotworów. Dokonuje opisu kinetyki karcynogenezy oraz charakteryzuje własności biofizyczne komórek rakowych, takie jak: adhezja, proliferacja czy proteoliza. Dalej, analizuje różnicowanie morfologiczne występujące pomiędzy komórkami zdrowymi oraz nowotworowymi. Wskazuje na znaczne różnice kształtu obydwu wspomnianych układów, zawartości cytoplazmy, liczby jąder komórkowych oraz mitochondriów czy aparatów Golgiego. Dalsza część rozprawy skupia się już na opisie zmian nowotworowych wybranych obiektów badawczych, scharakteryzowanych w przedłożonej mi do recenzji pracy: śluzaka serca, jako łagodnego guza oraz czerniaka, jako przykładu guza złośliwego.

Rozdział zatytułowany *Material and Methods* przynosi wiedzę zarówno o technikach eksperymentalnych, jak i procedurach badawczych, służących przygotowaniu układu do pomiarów. Świadczy również o warsztacie laboratoryjnym Doktorantki. Wszystkie procedury eksperymentalne, źródła izotopów, kalibracje systemu detekcyjnego czy też metody szacowania wartości średniego czasu życia pozytu opisane są w sposób jasny i dokładny. Pani magister w sposób precyzyjny przywołuje również dane o grupie badawczej pacjentów, czasie poboru tkanek oraz wpływającym do momentu wykonania pomiaru, przygotowaniu linii komórkowych do diagnostyki techniką PALS, mikroskopii optycznej jak i elektronowego rezonansu paramagnetycznego, czy też jądrowego rezonansu magnetycznego. Ani celowość procedur, ani sposób przygotowania układów do badań nie budzą moich najmniejszych zastrzeżeń. Z lektury tej części rozprawy doktorskiej wyniosłem przeświadczenie o wysokiej klasy warsztacie doświadczalnym Pani mgr Eweliny Kubicz. Natomiast opis wykorzystanych technik badawczych wraz z uzasadnieniem ich wyboru jest zarówno klarowny jak i syntetyczny.

Najbardziej obszerny i najciekawszy w mojej opinii rozdział pracy: *Experimental Results* charakteryzuje własności czasowo-rozdzielcze pozytu oraz innych parametrów widm PALS dla komórek normalnych i nowotworowych. W pierwszej kolejności Doktorantka zdecydowała się przebadać i zanalizować tkanki utrwalone w formalinie. Otrzymała znakomitą

zgodność wartości czasów życia orto-pozytu (2,01 ns) dla wycinków tkanek śluzaka serca. Zgodność otrzymanych wartości obserwowała Ona zarówno pomiędzy tkankami pochodzących od jednego pacjenta, jak również innych dawców. Ta sama zgodność wyników charakteryzowała również wartości wyznaczanych natężeń sygnałów (których średnia wartość amplitudy wynosiła 19,9 %). Pani Kubicz przeprowadziła również badania i analizę porównawczą tych samych próbek (śluzaka serca) z tkankami zdrowymi w postaci wycinków tkanki tłuszczowej śródpiersia. W tym podejściu eksperymentalnym tkanki nie były utrwalane, celem wykluczenia wpływu formaliny na wartości rejestrowanych parametrów. Analogicznie jak powyżej, Pani Kubicz skupiła się na różnicach w wartości amplitudy i czasu życia składowej orto-pozytowej. Uzyskała następujące dane dotyczące czasu życia: 1,92 ns oraz 2,72 ns odpowiednio dla próbki nowotworowej oraz zdrowej, a także charakteryzujące je wartości amplitud 18,4 % oraz 29,1 %. Przytoczone wyniki oraz ich powtarzalność dla kolejnych pacjentów umożliwiły Jej sformułowanie konkluzji o przydatności spektrometrii typu PAL jako metody diagnostycznej uzupełniającej obrazowanie przy użyciu pozytonowego tomografu emisyjnego.

W dalszej części eksperymentów, analizie czasowo-rozdzielczej poddane zostały hodowle komórkowe, których parametry orto-pozytu porównywano z wynikami uzyskanymi dla tkanek. Choć wartości rejestrowanych czasów życia, charakterystyczne dla hodowli komórkowych, nie odbiegały znacząco od tych, rejestrowanych dla tkanek, to znikoma liczba zliczeń (ok. 200 w maksimum) nie pozwalała na precyzyjne określenie tych pierwszych. Ponadto, jak można było się dowiedzieć z lektury rozprawy, Doktorantka miała trudności z określeniem pochodzenia sygnału jednej ze składowych czasu życia dla para-pozytu, która jest niemal identyczna co do wartości z sygnałem pochodzącym od materiału komory pomiarowej.

W rozdziale 7 opisano badania techniką PALS przeprowadzone dla linii komórkowych czerniaka, dla których kontrolą była linia komórek pigmentowych – melanocytów. Pierwsza część eksperymentów polegała na określeniu wpływu zawartości wody oraz wybranych jonów ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) na wartości rejestrowanych średnich czasów życia. Zestawienie wyników uzyskanych dla tak przygotowanych próbek pokazało, że różnice pomiędzy kolejnymi środowiskami komórek są znaczące. Rozbieżności uzyskiwanych rezultatów badań Pani mgr Kubicz podjęła się wyjaśnić przy użyciu techniki magnetycznego rezonansu jądrowego, której

sygnał korelował ze zmianą uwodnienia komórek. Analogiczna korelacja przeprowadzona przy użyciu techniki elektronowego rezonansu paramagnetycznego dotyczyła zawartości melaniny wspomnianych linii komórkowych.

Spójność wyników otrzymywanych dla próbek biologicznych pochodzących od osobnych dawców sprawia, że odnosi się wrażenie, iż ta ważna tematyka ma wciąż najlepsze momenty przed sobą, a możliwe kierunki jej rozwoju wskazane przez Doktorantkę w dyskusji rozdziału 8 oraz konkluzjach rozdziału 9 wydają się bardzo prawdopodobne.

Na podkreślenie zasługuje ponadto wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować jedynie jedną poprawkę:

- Str. 55, tabela 6.2, „left atrium” w miejsce „left artium”

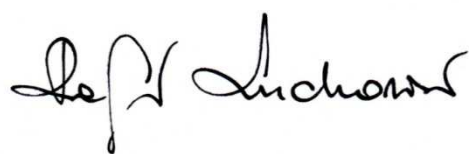
Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji, ale rodzą jednocześnie pytania, które pozwolę sobie sformułować poniżej:

1. Czy znikoma wartość intensywności charakteryzująca składową czasu życia orto-pozytu, która rejestrowana jest dla komórek oraz zaprezentowana w tabelach 6.5 lub 7.1 nie sugeruje, iż metoda PALS użyteczną będzie jedynie przy identyfikacji nowotworów o dużych rozmiarach?
2. W jaki sposób oszacowano, że parametr  $\Delta R = 0,166$  nm (zapisany we wzorze 2.5), określający głębokość wnikania funkcji falowej orto-pozytu poza granicę studni potencjału, w której jest on spuławkowany, jest poprawny dla badanych tkanek?
3. W części wstępnej pracy bardzo dokładnie opisano budowę oraz charakterystykę komórek zdrowych i nowotworowych. Jakie, wg Doktorantki, organelle komórkowe mogą być odpowiedzialne za puławkowanie pozytonium?
4. Jak bardzo wielkość wycinanych tkanek wpływa na wartości rejestrowanych amplitud czasów życia orto-pozytonium?
5. Czy Doktorantka nie obawia się, iż zaburzony metabolizm komórek np. w warunkach stresu, zaburzający gospodarkę wodną organizmu, nie wpłynie na wartości czasów życia orto-pozytu, a tym samym uniemożliwi identyfikację nowotworu?

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Ewelina Kubicz przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaplanowanych oraz

przeprowadzonych eksperymentów. Badania te wymagały swobodnego poruszania się w ramach wielu podejść metodologicznych. Rozprawa doktorska, a także znaczna liczba prac naukowych, dowodzi o dojrzałości naukowej Doktorantki. W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia podstawowe wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr Eweliny Kubicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Gratuluję Doktorantce oraz Państwu Promotorom tak cennych rezultatów.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Prof. Andrzej Sychowski". The signature is written in a cursive, flowing style.