



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

prof. dr hab. Paweł Olko
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
Radzikowskiego 152
31-342 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Eweliny Kubicz zatytułowanej

„Biomedical applications of Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy: nanostructural characteristics of normal and cancer cells and tissues”

Decydujący wpływ na postęp współczesnej medycyny miało wprowadzenie nowatorskich metod diagnostyki opartej na wykorzystaniu metod fizycznych takich jak produkcja i detekcja promieniowania Roentgena, zjawisko Jądrowego Rezonansu Magnetycznego czy Pozytonowej Tomografii Emisyjnej. Ciągłe poszukiwane są nowe metody diagnostyczne, zwiększające specyficzność i dokładność badań. W badaniach fizycznych i materiałowych od kilkudziesięciu lat stosowana jest metoda spektroskopii czasów życia pozytonów (Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy). Część pozytonów formuje z elektronami nietrwałą strukturę zwaną pozytonium, którego czas życia zależy od parametrów ośrodka. Obecność w ośrodku pustych objętości o rozmiarach do paru nanometrów zmniejsza prawdopodobieństwo anihilacji i prowadzi do zwiększenia czasu życia pozytonium. Ta właściwość pozytonium była dotychczas wykorzystywana w badaniach struktury ciał stałych, głównie pod kątem ich defektów. Pani mgr Ewelina Kubicz postawiła hipotezę, że pozytonium można zastosować w diagnostyce medycznej jako biomarker zmian nowotworowych. Autorka zastosowała podejście fenomenologiczne zakładając, że skoro struktura tkanki nowotworowej jest różna od tkanki zdrowej, to winno to wpływać na czasy życia pozytonium w tych ośrodkach.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest pracą z obszaru fizyki, w której w sposób twórczy użyto techniki pomiarowe stosowane w spektroskopii czasów życia pozytonów do badania komórek biologicznych i tkanek. Praca została zrealizowana pod opieką pana prof. Pawła Moskala i pani prof. Ewy Stępień. W zespole tym opracowano nowatorski tomograf PET oparty o scyntylatory organiczne i prowadzone są zaawansowane prace nad rozwojem tej techniki pomiarowej. Badania pani mgr Eweliny Kubicz stanowią ważny przyczynek do poszerzenia możliwości badawczych i diagnostycznych metod rozwijanych w oparciu o tą nowatorską technologię.

Struktura pracy jest klasyczna i przejrzysta, co ułatwia dotarcie do potrzebnych informacji. Praca napisana jest w dobrym języku angielskim a pojedyncze zauważone niedociągnięcia językowe wymienione są na końcu tej recenzji. We wprowadzeniu do rozprawy Autorka przeprowadziła przegląd dostępnej literatury dotyczącej zastosowań spektroskopii pozytonowej w naukach biologicznych i medycznych. Wyniki nielicznych prac pokazywały zależność parametrów PALS od rodzaju i stanu badanych tkanek i komórek, co uzasadniało przeprowadzenie bardziej systematycznych badań w tym kierunku. Celem pracy było wykazanie, że pozytonium może być nowym biomarkerem chorób nowotworowych, co mogłoby poszerzyć możliwości diagnostyczne skanera J-PET.

Tekst rozdziałów 2 i 3, wprowadzających do tematyki fizycznej i biologicznej pracy, jest napisany ciekawie, starannie i udokumentowany odpowiednimi odnośnikami literaturowymi



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

choć inaczej ująłbym dwie zaprezentowane tezy. Autorka cytuje za danymi WHO, że częstość zgonów z powodu chorób nowotworowych sięga dla populacji światowej 17%. Okazuje się, że w Unii Europejskiej około 30% ludzi umiera z powodu nowotworów i wskaźnik ten ciągle rośnie, głównie z powodu rosnącej wyleczalności innych rodzajów chorób i przedłużającego się średniego czasu życia. Oczywiście, tak wysokie wskaźniki jeszcze bardziej uzasadniają konieczności szukania nowych metod diagnostyki i leczenia nowotworów. Jednym z czynników kancerogennych jest promieniowanie jonizujące. Autorka cytuje publikacje Granta et al. (2017) i Laurada (2015), potwierdzające statystycznie znamienne wzrost zachorowań na choroby nowotworowe występujący już po ekspozycjach z przedziału od 0 do 100 mSv. Publikacje te są jednak przedmiotem kontrowersji i na ogół przyjmuje się granicę 500 mSv, jako wartość dawki pochłoniętej, przy której można starać się zaobserwować wzrost częstości zachorowań na choroby nowotworowe. Te uwagi nie zmieniają mojej opinii, że wstęp teoretyczny został przygotowany w sposób bardzo klarowny i kompetentny, świetnie ilustrowany i dający wystarczający podkład do zrozumienia zastosowanych metod badawczych.

W pomiarach czasów życia pozytonów zastosowano układ pomiarowy składający się z cienkiego źródła Na-22, umieszczonego pomiędzy dwoma foliami kaptonowymi o grubości 6 μm . Źródło to zostało umieszczone w spektrometrze PAL składającym się z dwóch fotopowielaczy oraz scyntylatorów o grubości 25 mm. Sygnał z fotopowielaczy był osłabiany i dyskryminowany przy różnych progach zastosowanych dla obu detektorów. Próg dla pierwszego detektora umożliwił pomiar tylko kwantów 1274 keV z odwzbudzenia Ne-22. Drugi detektor z niższym progiem umożliwiał rejestrację kwantów anihilacji. Sygnały z fotopowielaczy były analizowane pod kątem ich wartości, czasów narastania i koincydencji czasowej. Zastosowanie progów pomiarowych pozwoliło na wyodrębnienie sygnałów 1274 keV i 511 keV i rejestrację różnicy czasów obu kwantów $\Delta T = T_{511} - T_{1274}$. W widmie ΔT można wyróżnić kilku komponentów takich jak anihilacja para-pozytonium, anihilacja swobodnego pozytonu w próbce oraz w folii kaptonowej oraz anihilacji orto-pozytonium. Układ pomiarowy został odpowiednio zoptymalizowany i skalibrowany, a następnie przetestowany w pomiarach czasu życia pozytonium w płytce krzemowej. Uzyskano czas życia 279 ps, co doskonale zgadza się z danymi literaturowymi.

Kolejnym etapem przygotowania eksperymentów było opracowanie metody przygotowania tkanek i komórek. Zastosowano tkanki niezłośliwego nowotworu śluzaka serca pobrane od 10 pacjentów. Mierzono je bezpośrednio (do 4 godzin) po ekstrakcji a dla tkanek z formaliny do 48 h. Jako tkankę kontrolną zastosowano tkankę tłuszczową. Wycinki tkankowe pozyskano przy współpracy ze Szpitalem JP II w Krakowie ale preparatyka tkanki została wykonana przez Autorkę. Parametry składowe z różnymi czasami życia pozytonium wyznaczano dla każdego pacjenta a następnie uśredniono. Ważnym i wcale nieoczywistym wynikiem było pokazanie, że średni czas życia orto-pozytonium oraz względna intensywność tej składowej są spójne dla tego samego rodzaju tkanek pochodzących od różnych pacjentów. Zbadano też czasy życia pozytonium w hodowli komórkowej z wyodrębnionych komórek dwóch pacjentów ze śluzakiem serca. Pokazano, że średni czas życia pozytonium w komórkach i tkankach był zbliżony, choć względna intensywność tej składowej była znacząco wyższa dla tkanki.



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

W pomiarach komórkowych jako model nowotworu złośliwego użyto dwóch liofilizowanych linii komórkowych czerniaka oraz liofilizowanych melanocytów jako kontroli. Przygotowanie komórek do pomiarów obejmowało złożoną procedurę, obejmującą wymrażanie i suszenie komórek. Aby sprawdzić liczebność żywych komórek w próbce, komórki były już po pomiarach PALS nawodniane i podgrzewane do temperatury pokojowej. Zaobserwowano nie tylko różnice poszczególnych składowych czasów życia między komórkami nowotworowymi oraz kontrolnymi, ale również między liniami czerniaka. Hodowle komórkowe przeprowadzono z użyciem różnych pożywek celem optymalizacji tego procesu. Dla zbadania wpływu pożywek na przeżywalność komórek, przeprowadzono ich nawodnienie i oceniono ich żywotność. Najwyższa żywotność zaobserwowano dla pożywek zawierających krioprotektanty.

Godne podkreślenia jest mnogość użytych technik pomiarowych dla weryfikacji prawidłowego przebiegu eksperymentów biologicznych. Morfologia komórek była kontrolowana pod mikroskopem optycznym NIKON Eclipse TS100. Ocenę nawodnienia komórek przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru NMR Brukera Avance III 300. Badano stosunek protonów znajdujących się w mobilnych cząsteczkach wody do molekuł wody do protonów wbudowanych do ośrodka. Stężenie melaniny potwierdzono pomiarami na spektrometrze elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR.

Kluczową rolę w potwierdzeniu wiarygodności otrzymanych wyników w eksperymencie biologicznym odgrywa jego powtarzalność. Badania powtarzalności procedury przeprowadzono na komórkach czerniaka linii WM266-4, który wykazał najkrótszy czas podwojenia. Otrzymane wartości czasu życia pozytonium były w zgodzie z niepewnościami statystycznymi. Rezultaty dla nawodnionych komórek pokazały, że różnice w czasie życia pozytonium występują nie tylko dla komórek liofilizowanych ale i dla komórek nawodnionych, co jest bliższe sytuacji *in vivo*. Interesującym wynikiem było również potwierdzenie, że matryca zewnątrzkomórkowa i naczynia krwionośne nie wpływają znacząco na średni czas życia o-Ps. Potwierdza to potencjalną możliwość różnicowania komórek nowotworowych i zdrowych w pomiarach *in vivo*. Bardzo ważnym wynikiem pomiarów była obserwacja, że różnice między tkankami tego samego typu pochodzącymi od różnych pacjentów są znacznie mniejsze niż pomiędzy tkanką zdrową i nowotworową. Stanowi to kolejną przesłankę do wykorzystania pozytonium jako biomarkera w diagnostyce nowotworów. Wszystkie te wyniki znakomicie potwierdzają główną tezę pracy, że przez określenie czasu życia pozytonium w ośrodku można odróżnić komórki normalne i nowotworowe, co daje możliwość stosowania pozytonium jako markera chorób nowotworowych.

Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem edycyjnym i językowym. Pojedyncze, zdaniem recenzenta, usterki wypunktowane są poniżej:

Str. 10, l.6 jest: „in both way” winno być “in both ways”

Str.35 równanie 4.6 – brak opisu zmiennych

Str.96, l.1 jest “form” winno być „from”



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

W metodzie PET przy pomocy skanera wyznaczamy obszary koncentracji izotopu β^+ radioaktywnego w narządach i tkankach. W celach pracy i w jej podsumowaniu Autorka podkreśla możliwość połączenia metody PALS z pomiarami skanerem J-PET, co dałoby dodatkowe informacje diagnostyczne o rodzaju tkanki. Niestety, praca nie daje wskazówek, jak tego typu analiza mogłaby przebiegać. Być może chodzi tu o nieujawnianie metod, które staną się niebawem przedmiotem patentu grupy J-PET. Czas życia pozytonium zależy od gęstości elektronowej ośrodka, którą można wyznaczyć na poziomie mikrometrowym przy pomocy skanerów micro tomografu komputerowego μ CT. Ciekawe, na ile tak wyznaczone lokalne gęstości elektronowe korelowałyby z czasami życia pozytonium.

Te wszystkie uwagi nie wpływają w najmniejszym stopniu na moją bardzo wysoką ocenę przedstawionej rozprawy. Przedstawia ona autentycznie nowe wyniki w dziedzinie fizyki medycznej, mogące w przyszłości posłużyć znacznemu udoskonaleniu obecnie stosowanej techniki PET. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Eweliny Kubicz spełnia z nadmiarem wszelkie ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane tego typu pracom. Dlatego też wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne przy Uniwersytecie Jagiellońskim o dopuszczenie pani mgr Eweliny Kubicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyniki rozprawy mogą okazać się bardzo ważne w świetle rozwoju technologii J-PET i jego zastosowań w diagnostyce medycznej. Godny podkreślenia jest bardzo rozległy warsztat eksperymentalny Autorki, która opanowała metodologię preparatyki komórek i tkanek, jak również pomiarów z użyciem spektrometrów PALS, NMR i EPR. Zastosowanie wielostopniowej kontroli prowadzonego eksperymentu znacznie uwiarygodnia jego wyniki i stwarza nadzieję na możliwość ich opublikowania w dobrym czasopiśmie medycznym. Dlatego składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne o wyróżnienie tej rozprawy.

Paweł Olko

Kraków, 31 sierpnia 2020