



Kraków 8.11.2022

Dr hab. Ewa Dryzek, prof. IFJ PAN
Oddział Fizyki Materii Skondensowanej
Zakład Badań Strukturalnych

**Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „Implementacja próbnika pozytonowego do
badań tkanek biologicznych”
autor: mgr inż. Konrad Wysogład**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Implementacja próbnika pozytonowego do badań tkanek biologicznych” przygotowana została pod opieką promotorską dr hab. Bożeny Zgardzińskiej w Katedrze Fizyki Materiałowej w Instytucie Fizyki Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej działania miały służyć zweryfikowaniu postawionej przez Doktoranta hipotezy badawczej, która zakłada, że pozyt i pozyton mogą zostać wykorzystane jako próbki w badaniach układów biologicznych, takich jak komórki lub tkanki, pozwalając różnicować badany materiał ze względu na występowanie zmian chorobowych na poziomie nanoskali. Wiązało się to z realizacją dwóch celów szczegółowych:

- 1) Konstrukcja i przetestowanie mobilnego spektrometru spektroskopii czasu życia pozytonów (PALS – Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy), o odpowiednim stopniu miniaturyzacji, przeznaczonego do badań materiału biologicznego, który w dalszej perspektywie mógłby zostać wykorzystany bezpośrednio na terenie szpitala.
- 2) Przeprowadzenie systematycznych testów za pomocą PALS na wybranym materiale biologicznym i skorelowanie ich wyników z wynikami badań histopatologicznych jako wybranej standardowej techniki badawczej.

Krótkie omówienie pracy

Praca liczy 126 stron, włączając spis literatury (68 pozycji), spisy tabel i rycin oraz wykaz osiągnięć Doktoranta. Dysertacja została podzielona na 13 rozdziałów. Zawiera łącznie 79 rysunków (w tym liczne zdjęcia elementów elektroniki, zestawu pomiarowego, komory pomiarowej i próbek biologicznych) oraz 11 tabel.

Po krótkim wstępie zawartym w rozdziale 1 kolejne trzy rozdziały pracy obejmują informacje dotyczące spektroskopii anihilacji pozytonów, zaczynając od rysu historycznego

dotyczącego odkrycia pozytonu oraz opisu zjawiska anihilacji elektronu i pozytonu zawartych w rozdziale 2. W rozdziale 3 omówiony został pozyt, czyli stan związany pozytonu i elektronu, z uwzględnieniem modeli jego tworzenia. Natomiast rozdział 4 prezentuje podstawy zastosowania pozytu jako próbnika lokalnych objętości swobodnych i porów w badanym materiale. Kolejne dwa rozdziały dotyczą detektorów stosowanych w spektroskopii anihilacji pozytonów i technik pomiarowych z uwzględnieniem metodyki przygotowania źródła pozytonów do pomiarów materiałów biologicznych oraz szczegółowego omówienia różnych rodzajów spektrometrów koincydencji opóźnionych stosowanych w pomiarach czasu życia pozytonów. Rozdział 7 wprowadza pewne elementy biofizyki i biochemii, co jest związane z materiałem stanowiącym przedmiot badań, czyli komórkami nowotworowymi. Przegląd literaturowy dotyczący dotychczasowych badań materiałów biologicznych, a w szczególności tkanek nowotworowych, za pomocą spektroskopii anihilacji pozytonów umieszczony został w rozdziale 8, który kończy część przeglądową pracy.

W krótkim rozdziale 9 Doktorant formułuje hipotezę badawczą i przedstawia cele badań przytoczone powyżej. Obszerny rozdział 10 stanowi jedną z dwóch głównych części pracy opisujących osiągnięcia Doktoranta. Prezentuje on mobilny system spektrometryczny mPALS skonstruowany przez Doktoranta, zaczynając od określenia wymagań, jakie powinien spełniać tego typu układ spektrometryczny, poprzez szczegółowe omówienie budujących go bloków elektronicznych łącznie z ich schematami, po testy funkcjonalne zbudowanego prototypu i analizę porównawczą widm uzyskanych za pomocą spektrometru mPALS i konwencjonalnego cyfrowego spektrometru PALS.

W rozdziale 11 opisane zostały procedury zastosowane podczas poboru materiału biologicznego, pomiarów PALS i badań histopatologicznych.

Rozdział 12 prezentuje wyniki badań dwóch serii próbek tkanek nowotworowych i ich zdrowych odpowiedników. Pierwsza z nich to tkanki pobrane z macicy i jajnika. Badania tej serii powiększyły statystykę dotychczasowych pomiarów i potwierdziły ogólną tendencję wykazywaną przez parametry PALS, która może wskazywać na występowanie zmian chorobowych w tkance. Podczas badań drugiej serii próbek pobranych z wątroby zadbano, aby obszar badań histopatologicznych dokładnie odpowiadał obszarowi naświetlonemu przez pozytony podczas badań PALS. Umożliwiło to wyeliminowanie jednego ze źródeł niezgodności między wynikami pomiarów przeprowadzonych za pomocą obu metod. Zastosowanie rozkładu widm czasu życia pozytonów na cztery składowe pozwoliło otrzymać spójne wyniki, przypisując dwa najdłuższe czasy życia pozytonów do anihilacji orto-pozytu zachodzącej odpowiednio w nanopęcherzykach w obszarze frakcji płynnej i w nanoobjętościach w obszarze frakcji stałej badanych próbek. Co więcej, zaproponowany model zdaje się znajdować odzwierciedlenie w budowie komórki. Dla próbek zdrowych komórek wątroby została wyznaczona referencyjna wartość czasu życia orto-pozytu w nanopęcherzykach. Wykazano również, że PALS różnicuje pacjentów poddawanych chemioterapii. Kończący pracę rozdział 13 zawiera jej podsumowanie i wnioski.

Ocena rozprawy doktorskiej

Należy stwierdzić, że problematyka przedłożonej do oceny rozprawy jest interesująca i nowatorska. Została ona podjęta przez Doktoranta jako członka zespołu naukowego pracującego nad tym zagadnieniem, działającego w Katedrze Fizyki Materiałowej UMCS.

Zaletą rozprawy jest jej konstrukcja i przemyślany dobór przedstawionych w niej informacji, jeżeli pominięto liczne mankamenty redakcji tekstu omówione w dalszej części recenzji, które mogą zepsuć to wrażenie. Ze względu na interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań Doktorant stanął przed trudnym zadaniem, wymagającym przedstawienia wielu zagadnień z różnych dziedzin nauki wprowadzających w tematykę podjętą w rozprawie. Zostało to zrobione w sposób interesujący i syntetyczny. Na szczególną uwagę zasługuje kompleksowy przegląd literatury dotyczącej dotychczasowych zastosowań spektroskopii anihilacji pozytonów w badaniach próbek biologicznych, w tym tkanek nowotworowych.

Osiągnięcia Doktoranta zawarte w rozprawie ogniskują się w dwóch obszarach, co jest odzwierciedleniem realizacji wyznaczonych celów. Pierwszy z nich to zbudowanie i przetestowanie mobilnego, zminiaturyzowanego, cyfrowego spektrometru mPALS. Realizacja tego celu, która wymagała wiele wysiłku, rozległej wiedzy z zakresu elektroniki i żmudnych testów, doprowadziła do powstania prototypu urządzenia. W rozprawie zamieszczono przykłady widm czasu życia pozytonów uzyskanych przy jego użyciu. Jak zostało wspomniane, prototyp zostanie poddany dodatkowo testom kompatybilności elektromagnetycznej i certyfikacji, aby mógł pracować jako urządzenie medyczne na terenie szpitali. Jednak należy sobie uświadomić, że droga do zastosowania PALS jako metody diagnostycznej, jest jeszcze bardzo daleka, ale można przypuszczać, że spektrometr mPALS może być wykorzystany na przykład w kolejnych etapach badań.

Doktorant wspomina w podziękowaniach, że praca nad spektrometrem pozwoliła mu zdobyć doświadczenie w dziedzinie elektroniki jądrowej, co zaowocowało otworzeniem przez niego działalności gospodarczej związanej z detekcją promieniowania jonizującego. Można mieć nadzieję, że jego dalsza praca w tej dziedzinie przyczyni się do wzrostu innowacyjności, a środowisko naukowców wykorzystujących PALS jako metodę badawczą również będzie mogło odnieść z tego korzyści.

Szczególnie ważnym osiągnięciem metodologicznym, związanym z realizacją drugiego z wyznaczonych celów, zaprezentowanym w rozprawie jest skorelowanie wyników PALS z badaniami histopatologicznymi w taki sposób, aby w obu przypadkach badany był ten sam obszar próbki. Pozwoliło to wykazać znaczące różnice między tkanką nowotworową a tkanką zdrową dla danego pacjenta, eliminując jedną z przyczyn rozbieżności w wynikach obu metod.

Nie mniej istotny jest aspekt poznawczy prowadzonych badań. Zaproponowana analiza widm czasu życia pozytonów z rozkładem na cztery składowe poszerzyła możliwości interpretacji wyników pomiarów PALS i umożliwiła określenie parametrów PALS charakteryzujących zdrowe komórki, w tym przypadku wątroby, co może ułatwić wykrycie komórek nowotworowych w badanych próbkach.

Uwagi krytyczne i pytania do Doktoranta

- 1) Na początku rozdziału 3.1 zdanie „Proces nazywany jest swobodną anihilacją i jego widmo czasowe jest ciągle ze względu na związanie anihilującego elektronu z atomem.” nie jest prawdziwe. Prosiłabym o rozwinięcie tego tematu.

- 2) W opisie modelu Tao-Eldrupa brak odnośnika do prac Eldrupa. Sam model jest przedstawiony chaotycznie, co utrudnia jego zrozumienie. Wzór (16) miał prawdopodobnie pokazywać istotę modelu Tao-Eldrupa, tzn., że prawdopodobieństwo znalezienia Ps poza skończoną studnią potencjału jest równe prawdopodobieństwu znalezienia Ps w warstwie elektronowej dołożonej do nieskończonej studni potencjału, która zastąpiła tę pierwszą. W związku z tym radialne części funkcji falowych po obu stronach równania (16) powinny być różne i przede wszystkim powinno być zaznaczone, że równanie dotyczy radialnych części funkcji falowych. Wartość parametru λ_+ występującego we wzorze (18) równa 2 ns jest podana bez żadnego uzasadnienia.
- 3) Omawiając model pęcherzykowy tworzenia pozytu w cieczech autor przedstawił przykład wpływu zmiany napięcia powierzchniowego zależnego od temperatury (tu wartości są podane) na wielkość pęcherzyka w wodzie, jednak nie podał jednak zakresu tych zmian a jedynie odwołanie do literatury. Zatem czytelnik nie mający na co dzień do czynienia z tego typu zagadnieniami, musi do tej literatury sięgnąć.
- 4) W podrozdziale 5.1.1 dotyczącym detektorów scyntylacyjnych autor przedstawia diagram Jabłońskiego. Należałoby jednak przynajmniej zaznaczyć, że dotyczy on scyntylatorów organicznych. Biorąc pod uwagę, że w zbudowanym przez Doktoranta spektrometrze mPALS wykorzystał on scyntylatory nieorganiczne $CeBr_3$, bardziej odpowiedni byłby schemat dla scyntylatorów nieorganicznych.
- 5) Sądzę, że informacje na temat spektrometru mPALS powinny być podane w bardziej systematyczny sposób. Jako użytkowniczkę spektrometru PALS interesują mnie np. wartości czasu narastania impulsów z fotopowielaczy. Skoro skonstruowany spektrometr mPALS charakteryzuje się mniejszymi rozmiarami w stosunku do standardowych spektrometrów, może dobrze by było podać różnicę w wymiarach.
- 6) Moje wątpliwości budzi opis różniczkowania impulsu i kompensacji biegun-zero (PZC) w rozdziale 10.1.1.3 dotyczącym bloku wzmacniacza wolnego (C). Wzory (33)-(36) oraz (37-39) są niespójne (np. napisane od prawej strony). Trudno ocenić ich poprawność, ponieważ symbole w nich występujące nie są wystarczająco wyjaśnione, np. funkcje $G(t)$, $e_1(t)$ i wydaje się, że użyte oznaczenia występują w nadmiarze. Co wyrażają symbole T_0 , T_i i τ , jeżeli stała czasowa zaniku sygnału wejściowego została oznaczona T a stała czasowa obwodu $T_s = R_1C_1$. Przed wzorem (35) podana jest informacja o wykonaniu transformacji Laplace'a do domeny operatora, ale potem nie ma informacji o transformacji odwrotnej do domeny czasowej. Podobnie jest w dla następnych wzorów. Obliczenie transformaty Laplace'a, czy też transformaty odwrotnej, nie powinno obecnie stanowić problemu, biorąc pod uwagę szeroką dostępność w internecie przeznaczonych tego celu kalkulatorów.
- 7) Jako wyniki testu spektrometru mPALS pokazano widma czasu życia pozytonów dla trzech wzorcowych substancji (Podrozdział 10.2.2) oraz dwóch próbek biologicznych (Podrozdział 12.3) wraz z otrzymanymi parametrami. Porównano je z widmami zmierzonymi przy użyciu standardowego spektrometru cyfrowego. Widać, że liczba zliczeń w prezentowanych widmach nie jest duża. Nie podano, jaka jest szybkość zliczeń koincydencji w spektrometrze mPALS. Szybkość zliczeń determinuje czas pomiaru. Zmierzone widma powinny zawierać na tyle dużo zliczeń, aby błędy

otrzymanych parametrów były akceptowalne. W przypadku pomiarów próbek biologicznych różnice w wartościach parametrów otrzymanych w pomiarach dwoma spektrometrami są większe niż w przypadku próbek określonych jako wzorcowe. Nie poświęcono wystarczającej uwagi na przedyskutowanie ewentualnych przyczyn tych rozbieżności.

Uwagi redakcyjne

Pod względem redakcyjnym praca budzi wiele zastrzeżeń. Poniższa lista zawiera bardziej istotne z nich.

- 1) Na końcu rozdziału 2.1 pozyton został określony jako „cząsteczka”.
- 2) W opisie wzoru (9) napisane jest: „energie stanu w liczbie kwantowej n ”, raczej powinno być: „energie stanu o liczbie kwantowej n ”.
- 3) W rozdziale 3.1 dotyczącym anihilacji pozytonu opis kanałów, którymi zachodzi anihilacja jest nieco chaotyczny. Autor pisze o termalizacji pozytonu w materii, a następnie podaje czas życia orto- i para-pozytonu bez wyraźnego zaznaczenia, że podane wielkości dotyczą anihilacji w próżni.
- 4) Przykłady zdań wymagających korekty w Rozdziale 3.2.2: „takie elektrony biorą udział z największym przekrojem czynnym w reakcję rekombinacji z jonami” i dalej „Promień kuli Osangera, jest odległością dwóch ładunków, w których średnia energia ruchów termicznych kT jest równa energii oddziaływania kulombowskiego.”
- 5) Brak opisu symboli użytych we wzorze (14). Masa pozytonu (elektronu) jest oznaczana raz m , innym razem m_0 .
- 6) Wzór (15), który został opisany, jako określający prawdopodobieństwo znalezienia cząstki wewnątrz studni potencjału, *de facto* opisuje prawdopodobieństwo znalezienia cząstki na zewnątrz studni.
- 7) Zdanie poniżej wzoru (17): „Prawdopodobieństwo anihilacji λ jest proporcjonalne do całki fali funkcji pozytonu.” sprawia wrażenie automatycznego tłumaczenia z języka angielskiego podobnie jak określenie powyżej Tabeli 1 „wierzchołek całkowitych energii” zamiast fotopik lub pik pełnej energii. Ponadto jest dokładnie odwrotnie niż tak, jak to opisuje zdanie: „Ze względu na brak efektu fotoelektrycznego, a co za tym idzie wierzchołków całkowitych energii, chętniej stosowanymi są scyntylatory krystaliczne o dużym Z ”.
- 8) Rysunki 10 i 11 prezentujące zasadę działania detektorów HpGe planarnego i koaksjalnego mogły by pokazywać więcej informacji, np. gdzie jest przyłożone napięcie. Ponadto w tekście jest: „HPGe typu P+”. P jest symbolem fosforu.
- 9) Rozdział 6 dotyczący technik pomiarowych PALS. Jako jedną z nich podano ACAR, czyli pomiar korelacji kątowych kwantów anihilacyjnych. Nie jest to metoda spektroskopii czasu życia pozytonów.
- 10) Schemat rozpadu ^{22}Na na Rys. 18 nie jest poprawny .
- 11) Izotop ^{22}Na otrzymuje się w reakcji $^{24}\text{Mg}(d, \alpha)^{22}\text{Na}$ a nie ^{24}Mn .
- 12) We wzorze (29) w symbolu exp brakuje p, a we wzorze (31) jest o jedno exp za dużo.
- 13) W rozdziale 7.1 Budowa i funkcje komórek ludzkich, w zdaniu: „Od 40% do 60% masy komórki stanowią białka” należało zaznaczyć, że chodzi o suchą masę.

- 14) W rozdziale 10.1.1.8 użyto anglicyzmu: „Podczas developmentu i pierwszego uruchamiania kompletnego układu...”, wcześniej użyto terminu „Impuls ... o charakterystyce expotencjalnej”. Słowo „ekspotencjalna” powinno być zastąpione słowem „eksponencjalna” lub „wykładnicza”.
- 15) W rozdziale 10.1.2.4 wzory na wydajność absolutną są przedstawione, zaczynając od wzoru końcowego, a opis użytych symboli pozostawia wiele do życzenia.
- 16) We wnioskach występuje oznaczenie $Ce:Br_3$ z dwukropkiem między symbolami pierwiastków.

Podsumowanie

Podsumowując, stwierdzam, iż przedłożona do recenzji praca pt. „Implementacja próbnika pozytonowego do badań tkanek biologicznych”, której autorem jest mgr inż. Konrad Wysogład”, zawiera wartościowe i oryginalne wyniki. Istotna jest również jej potencjalna wartość aplikacyjna. Uważam, spełnia ona warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

are Dmpen