

Zakład Patologii

Instytut „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Wandzilak pt. „ Selected chemical elements as potential indicators of cancerous brain tissue”.

Nowotwory układu nerwowego należą obecnie do najtrudniej wyleczalnych nowotworów i dotyczą coraz młodsze osoby. Stanowią one 2% zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce. W ciągu ostatnich trzech dekad liczba zachorowań wzrosła około 2-krotnie. Nowotwory te dotyczą najczęściej dzieci lub osoby po 60 roku życia. Ponad 40% pierwotnych nowotworów mózgu to glejaki, które stanowią aż 80% wszystkich nowotworów złośliwych ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Pomimo szybkiego rozwoju technik obrazownia, postępu w neurochirurgii, radioterapii i chemioterapii wyniki leczenia pozostają dalej niezadawalające. Nowotwory OUN w dalszym ciągu obciążone są dużą śmiertelnością. Do dnia dzisiejszego nie są poznane dokładne przyczyny powstawania nowotworów mózgu. Na pewno promieniowanie jonizujące odgrywa istotną rolę w ich patogenezie. Do czynników ryzyka należą także: pestycydy, herbicydy, substancje petrochemiczne, nitrozoaminy, pole elektromagnetyczne, przebyte urazy mózgu, czy zarażenie wirusem Epstein-Barr. Obecnie uważa się, że pierwiastki śladowe mogą odgrywać istotną rolę w procesach nowotworzenia. Żelazo jest szczególnie ważnym pierwiastkiem z powodu udziału w powstawaniu reaktywnych form tlenu mogących uszkadzać DNA. Z kolei miedź i cynk, obecne w centrach aktywnych dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) odgrywają rolę przy ochronie przed anionorodnikami ponadtlenkowymi.

Doktorantka w swojej pracy podjęła się ważnego zadania oceny różnic stężeń żelaza, miedzi, wapnia, siarki, fosforu, sodu, potasu i cynku w tkankach nowotworów mózgu w porównaniu z tkankami zdrowymi OUN, co niewątpliwie może przyczynić się do wzrostu wiedzy na temat reakcji biochemicznych towarzyszących procesowi nowotworzenia w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Autorka badała również stopnie utlenienia najważniejszych pierwiastków śladowych (Fe, Cu i Zn) w tkankach mózgu. Uważam, że temat pracy jest bardzo ważny i nowatorski.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska zawiera 108 stron manuskryptu w języku angielskim wraz ze streszczeniem w języku angielskim i polskim oraz 107 pozycji piśmiennictwa.

Materiałem badawczym były próbki pochodzące z nowotworów OUN prezentujących różne typy histopatologiczne oraz stopnie złośliwości. Materiałem kontrolnym były tkanki pobrane z mózgu autopsyjnego i ze ściany ropnia.

W swojej pracy autorka stosowała metody XAS (X-ray Absorption Spectroscopy), XRF (X-ray Fluorescence) oraz PIXE (Particle Induced X-ray Emission) do oznaczania składu pierwiastkowego oraz badania własności chemicznych pierwiastków obecnych w tkankach mózgu ludzkiego. W połączeniu z metodami statystycznymi pozwoliło to na wskazanie różnic między tkanką kontrolną a tkankami pochodzącymi z nowotworów o różnych stopniach złośliwości jak również reprezentującymi różne typy histopatologiczne.

W pierwszej części przedstawionych w pracy wyników autorka porównywała przydatność metod XRF oraz PIXE w ocenie stężenia badanych pierwiastków w tkance. Próbki wykorzystane w pomiarach obiema metodami poddane były takiej samej preparatyce. Metoda XRF pozwoliła na wyznaczenie mas powierzchniowych pierwiastków obecnych w próbkach, natomiast metoda PIXE pozwoliła na wyznaczenie ich stężeń. Ponieważ każda z tych metod wyznaczała inne wielkości fizyczne, więc porównano ich skuteczność w różnicowaniu tkanek kontrolnych i nowotworowych. Porównanie to wykazało, że dla wszystkich pierwiastków poza cynkiem wyniki uzyskane przy wykorzystaniu obu metod są rozbieżne. Jako przyczynę tych różnic autorka wskazuje, że w pomiarach PIXE do eliminacji wpływu różnej gęstości próbek na wynik oznaczenia wykorzystano równoczesny pomiar gęstości badanych próbek metodą STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy). Zastosowanie tej metody pozwoliło na zaobserwowanie istotnych różnic gęstości próbek między tkanką kontrolną a nowotworową. Zastosowanie przez autorkę poprawek na średnie gęstości tkanek kontrolnych oraz tych pochodzących z glejaka wielopostaciowego do wyników uzyskanych metodą XRF pozwoliło na normalizację wyników uzyskanych przy pomocy obydwu metod. Zaprezentowane w pracy wyniki wskazują więc na ograniczenia metody XRF w tego typu badaniach. W kolejnych podrozdziałach autorka pokazuje z kolei, że w klasyfikacji próbek na poszczególne typy nowotworu metoda PIXE ma ograniczenia wynikające z mniejszej czułości na cięższe pierwiastki, a w szczególności na Fe, Cu i Zn, kluczowe dla takiej klasyfikacji. W dalszych rozdziałach pracy autorka opisuje wykorzystanie metody XAS do oceny zmian stopni utlenienia najważniejszych pierwiastków śladowych (Fe, Cu i Zn) w tkankach mózgu. Ze względu na specyfikę widm pochodzących od tkanek spowodowaną mnogością form chemicznych badanego pierwiastka dobrała ona metodę oceny położenia krawędzi absorpcji w widmie XANES pozwalającą na powtarzalne i jednoznaczne jego określenie. W dalszej kolejności bada ona wpływ warunków pomiarowych oraz sposobu preparatyki próbek na otrzymane wyniki. Pokazuje różnice między widmami otrzymanymi dla próbek przechowywanych oraz mierzonych w warunkach kriogenicznych, z ograniczonym dostępem powietrza, a tymi eksponowanymi na temperaturę oraz tlen. Jest to o tyle ważne, że większość badań publikowanych dotychczas w tematyce oceny stopni utlenienia pierwiastków obecnych w tkankach prowadzona jest w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza. Stosowanie warunków pomiarowych oraz preparatyki próbek takich jak opisane zostały w tej pracy pozwoli na spowolnienie utleniania się badanych pierwiastków, a co za tym idzie na otrzymywanie bardziej wiarygodnych wyników. Jak słusznie zauważa modelowanie widm EXAFS jest niemożliwe ponieważ każde z otrzymanych eksperymentalnie widm jest superpozycją widm pochodzących od poszczególnych związków chemicznych zawierających badany pierwiastek. Wskazuje jednak na istotne różnice w kształcie tych widm dla poszczególnych próbek. Aby znaleźć przyczynę tych różnic autorka

proponuje metodę liniowej kombinacji widm jako dającą możliwość na zaobserwowanie różnic w składzie biochemicznym pomiędzy tkankami kontrolnymi a nowotworowymi. Podsumowując, najistotniejszym wynikiem było wykazanie wzrostu stężenia Zn w nowotworach w porównaniu z tkanką kontrolną. Interesujące zmiany zostały również zaobserwowane w dystrybucji pierwiastków. Zauważono, że wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu spada korelacja przestrzenna pierwiastków. Najsilniejsza zależność została zaobserwowana dla pierwiastków przejściowych takich jak miedź i cynk. Wzięcie pod uwagę stężeń wszystkich badanych pierwiastków równocześnie oraz zastosowanie statystycznej analizy wielowymiarowej pozwoliło doktorantce na skuteczną klasyfikację próbek do poszczególnych typów nowotworów. Równocześnie Doktorantka wykazała, że obniżony stopień utlenienia żelaza może być wskaźnikiem procesu nowotworowego.

Moje zastrzeżenia budzi fakt, że w pracy jako kontrolę badano materiał pochodzący ze ściany ropnia mózgu. Ponadto doktorantka nie podała liczebności badanych grup nowotworów. Porównywanie zawartości pierwiastków w różnych typach nowotworów o różnej histogenezie może być pewnym niedociągnięciem pracy. Wyniki w większości odnoszą się jedynie do stopni złośliwości, a nie do rodzaju nowotworów. Praca byłaby znacznie ciekawsza, gdyby analizie poddano różne typy nowotworów glejowych np. astroglejowych i porównano zawartość pierwiastkową w glejakach o niższym stopniu złośliwości (WHO grade I i II) w porównaniu z glejakami złośliwymi (WHO grade III i IV). W tekście pojawiają się niefortunne sformułowania takie jak, że wskutek resekcji zwiększa się stopień złośliwości czy, że gwiazdziaki rozlane to jedne z częstszych nowotworów mózgu u dzieci. To nie resekcja zwiększa stopień złośliwości, tylko w resekowanych wznowach obserwuje się zwykle progresję stopnia złośliwości gwiazdziaków rozlanych. Z kolei najczęstsze nowotwory wieku rozwojowego to gwiazdziaki o ograniczonym charakterze wzrostu. Właściwsze jest używanie określenia *Glioblastoma* zamiast *Multiform Glioblastoma*. Ponadto doktorantka traktuje gwiazdziaka włóknienkowego i rozlanego (ang. *fibrillary astrocytoma*, *diffuse astrocytoma*) jako odrębne jednostki, podczas gdy gwiazdziak włóknienkowy jest podtypem gwiazdziaka rozlanego. Doktorantka używa w tekście skrótu GBM bez wcześniejszego jego wytłumaczenia. Rycina nr 5.26 nie jest właściwie podpisana. Zdjęcia mikroskopowe A i B są wykonane pod różnymi powiększeniami, a umieszczona skala jest jednakowa na obydwu fotografiach. Ponadto legenda nie zawiera istotnych informacji dotyczących zastosowanej reakcji. Doktorantka nie ustrzegła się również drobnych błędów językowych. Ostatnia moja uwaga dotyczy tytułu pracy doktorskiej: właściwsze byłoby użycie sformułowania „*neoplastic brain tissue*” zamiast „*cancerous brain tissue*”.

Podsumowując: temat pracy jest bardzo ważny i nowatorski; założenia, metodykę i realizację pracy Doktorantki, a także umiejętność analizy wyników i przeprowadzenia dyskusji oceniam wysoko. Jestem przekonana, że pomimo wyżej wymienionych uwag krytycznych praca ta spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk fizycznych w świetle zmodyfikowanej ustawy o stopniach i naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 roku. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Wandzilak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wioletta Gryckiewicz