

Warszawa 7 stycznia 2013

**Prof. dr hab. Krystyna Jabłońska-Ławniczak**  
**Instytut Fizyki**  
**Polskiej Akademii Nauk**

**Recenzja rozprawy habilitacyjnej dr Magdaleny Szczerbowskiej-  
Boruchowskiej pt. „Rozwój metod jakościowego i ilościowego mikro-  
obrazowania chemicznego tkanek z zastosowaniem promieniowania X i ich  
wykorzystanie dla potrzeb neuropatologii”  
oraz ocena dorobku naukowego**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa habilitacyjna składa się z 8. publikacji pochodzących z stosunkowo krótkiego okresu 4. lat tj. z roku 2008 oraz z lat 2010-2012. Prace te zostały wybrane z 43 publikacji znajdujących się w dorobku autorki (23 z listy filadelfijskiej i 20 innych). Prace wchodzące w skład rozprawy dotyczą szeregu aspektów związanych z jakościową, topograficzną i ilościową analizą składu pierwiastkowego i stopnia utlenienia pierwiastków w materiale biologicznym z wykorzystaniem metod rentgenowskiej fluorescencyjnej oraz absorpcji. Dodatkowo stosowano również metodę synchrotronowej absorpcji w podczerwieni. Metody te doskonalono i testowano dla specyficznych zastosowań, dla których nie można bezpośrednio stosować rutynowych, komercyjnie dostępnych metod i programów. Autorka metody te stosowała do badań tkanek ośrodkowego układu nerwowego stawiając sobie dwa podstawowe cele naukowe. Po pierwsze ocenę potencjalnego udziału wybranych pierwiastków w procesach biochemicznych towarzyszących zmianom patologicznym w wybranych schorzeniach neurodegeneracyjnych oraz nowotworach mózgu, jako uzupełnienie badań histopatologicznych. Po drugie poszukiwanie możliwości wykorzystania analizy fluorescencyjnej w diagnostyce medycznej jako metody wspomagającej tradycyjną diagnostykę, tam gdzie diagnoza jest trudna i nie jednoznaczna. Zebrany materiał badawczy poddała autorka analizie statystycznej poszukując cech pozwalających w sposób obiektywny dokonać klasyfikacji stopnia złośliwości badanych nowotworów. Wyznaczone cele narzucały konieczność weryfikacji wiarygodności uzyskanych ilościowych wyników dla tak specyficznego materiału badawczego. Było to szczególnie ważne tam gdzie podjęła autorka pionierskie, ilościowe badania w modzie mikroskopowym z rozdzielczością mikrometryczną. Testowane w publikacjach, wchodzących w skład rozprawy, techniki wspomagające obrazowanie chemiczne tkanek mogą służyć, jak słusznie podkreśla kandydatka w autoreferacie, jako zbiór wskazówek i wytycznych umożliwiających potencjalnemu badaczowi wykonanie kompleksowej analizy ilościowej składu pierwiastkowego i stopnia utlenienia pierwiastków w materiale biologicznym. Podjęte przez habilitantkę badania ze względu na specyfikę materiału biologicznego i mnogość czynników które mogą wpływać na zawartość, rozkład oraz stan chemiczny analizowanych pierwiastków nie prowadzą jeszcze do jednoznacznych wniosków ale wskazują drogę poszukiwań nowych metod diagnostycznych wykorzystujących osiągnięcia współczesnej

fizyki rentgenowskiej. Metody te potrzebne są wtedy kiedy dotychczas stosowane procedury nie dają jednoznacznych odpowiedzi.

Jak już wspomniano, wyniki prac tworzących rozprawę zostały opublikowane w 8. oryginalnych, recenzowanych pracach o dużym tzw. czynniku oddziaływania (z ang. *impact factor* -i.f.). Dwie prace jedno autorskie opublikowała autorka w specjalistycznym, dla tej dziedziny nauki, czasopiśmie *X-Ray spektrometry* (i.f. 1.39- 1.445) w latach 2008 i 2012. Pierwsza z tych prac jest przeglądem wiedzy na temat zastosowania rentgenowskiej spektrometrii w badaniach tkanek mózgu. W pracy tej autorka omówiła również wyniki 8 wcześniejszych prac z tej tematyki opublikowanych z jej udziałem, a nie wchodzących w zakres rozprawy. Podkreśla w niej również użyteczność badań z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego (p.s.) zwłaszcza w analizie topograficznej. W dalszych pracach często wykorzystuje właśnie p.s.. Ponieważ w Polsce nie ma źródeł synchrotronowych wszystkie prace wykonywane przez kandydatkę z wykorzystaniem p.s. wymagały zgłoszenia projektu naukowego, ocenianego przez międzynarodowy komitet ekspertów. Autorka wielokrotnie uzyskiwała czas badawczy na synchrotronach, tak więc wartość naukowa prowadzonych przez nią eksperymentów została już pozytywnie zweryfikowana na forum międzynarodowym. Już w roku 2000 uzyskała czas pomiarowy na najlepszy europejskim synchrotronie w ESRF, Grenoble, zanim Polska oficjalnie stała się członkiem tej organizacji w roku 2004. Podkreśla to pionierski charakter prowadzonych przez nią badań tkanek ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W drugiej jedno autorskiej pracy przeanalizowała habilitantka wpływ grubości preparatów biologicznych różnie preparowanych tkanek miękkich i twardych na wynik rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej. Szczegółowo przeanalizowała fakt, że w analizie fluorescencyjnej jednocześnie zbierane są informacje o szeregu pierwiastkach więc próbka, którą można uznać za cienką dla ciężkich pierwiastków może wymagać stosowania przybliżenia próbki grubej lub pośredniej dla lekkich pierwiastków. Nie sprawdzenie warunków jakie spełnia analizowany materiał biologiczny, może prowadzić do błędów sięgających nawet 45%. Ponadto obecność wody w analizowanych próbkach ma istotny wpływ na sposób oddziaływania promieniowania rentgenowskiego, więc prowadzona analiza musi to uwzględnić. Zaproponowała ona stosunkowo prostą metodę pozwalającą uwzględnić formę próbek biologicznych i dokonała weryfikacji doświadczalnej proponowanej metody dla próbek mózgu z różną zawartością wody oraz referencyjnych próbek NIST.

Pozostałe prace są wielo autorskie. W pracy opublikowanej w 2010 w *Neuroscience* (i.f. 3.215) autorka jest na miejscu 2. wśród współautorów. W pozostałych publikacjach jest ona pierwszym, niewątpliwie wiodącym autorem. Dwie prace opublikowała w roku 2011 (*Analytica Chimica Acta* -i.f. 4.555 oraz *Journal of Biological Inorganic Chemistry* - i.f. 3.289). Pozostałe 3 prace zostały opublikowane w roku 2012 w czasopiśmie o i.f. powyżej 2.5 (*J. Analytical Atomic Spectrometry*- i.f. 3.220, *J. Physics: Condensed Matter* - i.f. 2.546, *Neurochemistry International* – i.f. 2.857). Większość prac wchodzących w skład rozprawy została opublikowana niedawno więc w sumie prace te były cytowane 19 razy w tym jedno autorska praca przeglądowa z roku 2008 -11 razy. Udział autorki w pracach wielo autorskich jest dobrze wyodrębniony i określony zarówno przez autorkę jak i w oświadczeniach współautorów. W moim odczuciu nie jest potrzebne określanie procentowego wkładu każdego współautora bo jest to ocena bardzo subiektywna, prowadząca do sumarycznych

wkładów przekraczających 100%. Ważne jest określenie zakresu merytorycznego udziału każdego współautora. W pracy oznaczonej jako H8 zabrakło oświadczenia pani Agaty Ziomber i Pawła Wróbla, niemniej wkład habilitantki został dobrze zdefiniowany.

Wszystkie prace autorki pochodzą z okresu 12 lat i cytowane były łącznie 179 razy (136 bez autocytowań) a index **h** dla autorki wynosi 10, ponadto od września 2012 jej index **h** wzrósł z 9 do 10, a liczba cytowań z 164 do 179.

W dalszej części mojej opinii postaram się wykazać że habilitantka wniosła znaczący wkład do uprawianej dziedziny nauki **czyli przyczyniła się do rozwoju metod mikro-obrazowania tkanek.**

Omawiając w autoreferacie prace wchodzące w skład rozprawy autorka skupiła się wokół wybranych aspektów metodologicznych stosowanych technik badawczych po czym zilustrowała znaczenie tych aspektów na przykładzie badań wybranych tkanek mózgu. **Niewątpliwym osiągnięciem autorki jest twórcze przeanalizowanie wpływu fizycznych własności próbek biologicznych na oddziaływanie z promieniowaniem X i wykazanie wpływu rodzaju próbki na wynik ilościowych oznaczeń w rentgenowskiej analizie fluorescencyjnej (XRF).** Gęstość, gładkość czy grubość próbki odgrywa istotną rolę w analizie ilościowej składu pierwiastkowego za pomocą XRF. Jest to następstwem założeń w opisie teoretycznym sposobu oddziaływania promieniowania X z atomami badanego materiału. W odniesieniu do materiału biologicznego dodatkowym problemem jest obecność tzw. ciemnej matrycy, złożonej z pierwiastków H, C, N i O. Stanowią one dominujący składnik tkanek i istotnie wpływają poprzez efekty absorpcji promieniowania zarówno pierwotnego jak i wtórnego na intensywność promieniowania charakterystycznego badanych pierwiastków. Autorka w pracy H6 wykazuje, że w zastosowaniach biologiczno-medycznych różnorodność składu biochemicznego tkanek wymusza konieczność przeprowadzenia analizy z wykorzystaniem współczynników określających przekroje czynne na oddziaływanie promieniowania X z materią w sposób ścisły, aby właściwie powiązać natężenie rejestrowanego promieniowania ze składem chemicznym próbki. Autorka wyznaczyła masy powierzchniowe przy jakich dana próbka może być traktowana, jako cienka, gruba lub o pośredniej grubości w zależności od typu tkanki, rodzaju próbki (wysuszona lub w naturalnej postaci) i pierwiastków poddanych analizie. Klasyfikacja ta jest niezbędna w celu zastosowania odpowiedniej metody korekcji w analizie ilościowej. W obliczeniach wykorzystano dane publikowane głównie dla potrzeb ochrony radiologicznej, dotyczące zawartości C, H, O, N i wody w różnych tkankach organizmu człowieka. Omawiana praca jest posumowaniem doświadczeń autorki z badań materiału biologicznego, który analizowany był w pracach H2, H4, H7 i H8 gdzie próbki dla pierwiastków tam analizowanych spełniały kryteria próbki cienkiej. Dla pierwiastków P i S należało stosować kryterium próbki o pośredniej grubości, ale analiza wprowadzanego błędu wykazała, że nie przekracza on 10%, ponadto w przypadku badań w modzie mikroskopowym pojawia się dodatkowy błąd związany z lokalną zmianą gęstości próbki.

Podstawowym problemem w analizie ilościowej XRF wykonywanej zwykle metodą wzorca wewnętrznego, jest odpowiedni dobór materiałów wzorcowych. Autorka szczegółowo zajmuje się tym problemem w pracach H3 i H5 w odniesieniu do linii charakterystycznych Fe i S i badań mikroskopowych, gdzie szczególnej wagi nabiera jednorodność wzorca. Autorka opracowała dla potrzeb swoich badań specjalne materiały wzorcowe w postaci

cienkich jednorodnych filmów o strukturze zbliżonej do badanych przez nią skrawków tkanek. W pracy H7 wzorce te zostały zastosowane do analizy istoty czarnej mózgu i wykazały dużą zgodność z wynikami badań dostępnymi w literaturze. Poczym z powodzeniem stosowane były w pracy H8.

Podsumowując, materiał biologiczny analizowany w pracach stanowiących rozprawę habilitacyjną dotyczył chorób neurodegeneracyjnych Parkinsona i stwardnienia zanikowego bocznego, glejaków mózgu o różnym stopniu złośliwości i w jednym przypadku analizy mózgu szczurów specjalnie stymulowanych elektrycznie. Metody badawcze przystosowane dla potrzeb analizy takich próbek to rentgenowska analiza fluorescencyjna wykorzystująca źródła konwencjonalne i synchrotronowe, analiza rentgenowskich widm absorpcyjnych. Obydwie techniki stosowane były również w modzie mikroskopowym z rozdzielczością mikronową. Ponadto stosowała autorka również synchrotronową mikroskopię w podczerwieni, która dodatkowo dostarczała informacji o grupach funkcyjnych molekuł. Stosowanie różnych technik dla tego samego materiału badawczego nakładało dodatkowe wymagania co do preparatyki próbek z czym autorka doskonale sobie radziła. Zaowocowało to możliwością wykluczenia np. obecności Fe i innych analizowanych pierwiastków w złogach kreatyny (praca H2). **Do znaczących osiągnięć habilitantki zaliczam zastosowanie metod analizy statystycznej do otrzymanych wyników analizy fluorescencyjnej tkanek mózgu** osób zmarłych na chorobę Parkinsona i wykazanie znaczącego podwyższenie zawartości określonych pierwiastków w ciałach neuronów istoty czarnej osób chorych oraz wskazanie sposobu wyznaczania czynników w największym stopniu różnicujących badaną grupę. Z tematyką związaną z poszukiwaniem możliwości wczesnego wykrywania choroby Parkinsona wiąże się również zaprojektowany, przeprowadzony i opublikowanych przez autorkę w pracy H8, eksperyment na szczurach. Kolejnym znaczącym wkładem autorki wskazującym możliwość praktycznego wykorzystania w diagnostyce medycznej nowoczesnych metod fizyki jest zastosowanie dyskryminacyjnych metod statystycznych do klasyfikacji stopnia złośliwości nowotworów mózgu (praca H7). Autorka wyłoniła spośród wszystkich analizowanych pierwiastków te, które najbardziej różnicują nowotwory pod względem stopnia złośliwości i zaproponowała odpowiedni zestaw pierwiastków, które umożliwiają klasyfikację nowotworów. **Wdrażanie metod statystycznych i poszukiwanie odpowiednik cech różnicujących badane grupy bardzo powoli toruje sobie drogę w praktykach medycznych, ale w moim odczuciu znacznie zwiększa obiektywność diagnozy i jest przyszłością nowoczesnej diagnostyki.**

Nowatorskie badania form chemicznych niektórych pierwiastków w tkankach z wykorzystaniem absorpcji rentgenowskiej zasługuje na szczególne podkreślenie ze względu na duży stopień trudności poprawnej analizy takich danych w tak złożonym materiale. Autorka przeprowadziła analizę widm absorpcyjnych dla S (H5) i Fe (H3) z przestrzenną rozdzielczością mikrometryczną. Zebrany materiał doświadczalny poddała szczegółowej analizie, zauważyła efekty związane z błędem systematycznym wynikającym z stosowanej optyki i monochromatyzacji wiązki, zaproponowała sposób korekcji tego błędu oraz wykazała, że poza dominującą formą siarki na -2 stopniu, której obecność w tkance nowotworowej jest 10 krotnie większa niż w tkance zdrowej, istnieją inne formy i zaproponowała sposób ich wyodrębnienia. Zastosowanie modu mikroskopowego pozwoliło precyzyjnie wskazać struktury w których siarka jest gromadzona. Badania form chemicznych

Fe w tkankach nowotworowych mózgu wykazały, że Fe utlenione jest dominującą formą w nowotworach o dużym stopniu złośliwości, autorka zaproponowała również w pełni ilościową metodę wyznaczania masy powierzchniowej żelaza na danym stopniu utlenienia. Myślę, że te wybrane zagadnienia z prac wchodzących do rozprawy habilitacyjnej znakomicie ilustrują znaczący wkład tych prac w rozwój i doskonalenie metod mikroobrazowania tkanek.

### **Ocena dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego**

Pracę magisterską pt. „Badanie liczby i aktywności makrofagów w biopsjach z guzów przed leczeniem” wykonała habilitantka pod kierunkiem prof. dr hab. S. Łukiewicza na Wydziale Fizyki i Techniki Jądrowej AGH na kierunku Fizyka Techniczna, specjalność Fizyka Medyczna i Dozymetria. Materiał do pracy zebrała we współpracy z Zakładem Biofizyki Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Badania, dotyczące wykorzystania promieniowania rentgenowskiego do analizy składu pierwiastkowego tkanek mózgu dla potrzeb neuropatologii rozpoczęła w 1998 roku. Zapoczątkowała wtedy prace nad specyficznymi problemami zastosowania metody fluorescencji rentgenowskiej do badań próbek biologicznych i nawiązała współpracę w zakresie pozyskiwania tkanek do prowadzonych badań i konsultacji biomedycznych z Zakładem Neuropatologii Instytutu Neurologii Collegium Medicum UJ, z którym aktywnie współpracuje do dzisiaj.

Tematyka, rozwijana w ramach doktoratu obejmowała analizę pierwiastkową próbek z dużych obszarów mózgu. Była to więc informacja uśredniona. Badania miały na celu porównanie zawartości pierwiastków w wybranych obszarach anatomicznych mózgu, ocenę różnic zawartości pierwiastków w istocie białej i korze mózgowej, sprawdzenie wpływu czynnika wieku na akumulację pierwiastków w mózgu człowieka. Jako techniki badawcze stosowała rentgenowską analizę fluorescencyjną ze wzbudzeniem z lampy rentgenowskiej jak również wzbudzenie wiązką protonową (Particle Induced X-Ray Emission – PIXE). Badania techniką PIXE prowadziła we współpracy z Instytutem Problemów Jądrowych w Warszawie. Rezultaty badań zostały zebrane w rozprawie doktorskiej pt. „Promieniowanie X w badaniach składu pierwiastkowego tkanki ośrodkowego układu nerwowego człowieka” wykonanej pod kierunkiem prof. Marka Lankosza i obronionej w maju 2003. W spisie dorobku kandydatka wykazała 2 publikacje z listy filadelfijskiej oraz 6 innych prac wykonanych przed doktoratem, 21 publikacji filadelfijskich po doktoracie oraz 14 innych prac. Przed doktoratem zaprezentowała swoje osiągnięcia na 10 konferencjach po doktoracie miała 44 wystąpienia konferencyjne, które dobrze dokumentują jej aktywność naukową. O uznaniu działalności kandydatki w społeczności naukowej zajmującej się analizą fluorescencyjną próbek biologicznych świadczy również fakt zaproszenia jej do wygłoszenia wykładów na spotkaniach użytkowników p.s..

Pobyty badawcze kandydatki w ośrodkach zagranicznych wiązały się głównie z wykonywaniem projektów badawczych na synchrotronach europejskich w DESY, Hamburg oraz BESSY II Berlin, w Niemczech, ESRF, Grenoble, oraz LURE, Orsay i SOLEIL, St. Aubin, we Francji oraz Diamond, Didcot, w Wielkiej Brytanii. Miała więc ona możliwość prowadzenia prac badawczych na najlepszych stacjach pomiarowych dysponujących optyką umożliwiającą badania z rozdzielczością przestrzenną.

W ostatnim czasie kandydatka prowadzi również aktywną działalność popularyzatorską wygłaszając szereg wykładów dla środowisk medycznych oraz na swoim wydziale dotyczących specyfiki prowadzonych przez siebie badań.

Autorka uczestniczyła lub kierowała kilkoma znaczącymi projektami finansowanymi przez KBN, MNiSW oraz ostatnio NCN. Liczny udział w projektach badawczych wskazuje na jej dobre przygotowanie do starań o zapewnienie środków finansowych na działalność naukową, co jest niezbędnym warunkiem do prowadzenia samodzielnej tematyki badawczej. Prowadząc badania z wykorzystaniem synchrotronów, które finansowane są z projektów EU, zdobywała dodatkowe wymierne fundusze. Za działalność naukową otrzymała w 2006 r. nagrodę im. Prof. Zbigniewa Engela za najlepszą pracę w dziedzinie badań podstawowych oraz wielokrotnie nagrody Rektora AGH zarówno indywidualne (2) jak i zespołowe (5).

Dla potrzeb prowadzonych przez siebie badań naukowych oraz działalności dydaktycznej stworzyła laboratorium mikrospektroskopii w podczerwieni.

Jako pracownik uczelni habilitantka prowadziła również aktywną działalność dydaktyczną prowadząc ćwiczenia laboratoryjne i rachunkowe oraz wykład z fizyki ogólnej dla Wydziału Górniczego i Geoinżynierii AGH, przygotowała również wykład specjalistyczny „Mikrospektroskopia w podczerwieni w medycynie i biologii”. Była opiekunem 17 prac magisterskich i inżynierskich. Za tę działalność otrzymała dwa dyplomy Rektora AGH dla opiekuna pracy magisterskiej nagrodzonej w konkursie Diamenty AGH w kategorii prac aplikacyjnych.

Na tle przedstawionych tu osiągnięć naukowych i dydaktycznych nieco skromnie prezentują się jej osiągnięcia organizacyjne zarówno w zakresie organizacji życia naukowego (konferencji, warsztatów naukowych) czy udziału w pracach towarzystw naukowych. Mam nadzieję, że w przyszłości włączy się aktywnie zwłaszcza w organizację życia naukowego wokół polskiego synchrotronu, który budowany jest w Krakowie.

Podsumowując, wymienione tu osiągnięcia zarówno naukowe jak i dydaktyczne wskazują, że dr Magdalena Szczerbowska-Boruchowska jest dobrze przygotowana do podjęcia obowiązków samodzielnego pracownika naukowego.

W świetle tego co zostało powiedziane uważam, że rozprawa habilitacyjna i cały dorobek naukowy dr inż. Magdaleny Szczerbowskiej-Boruchowskiej wnoszą znaczący wkład do rozwoju rentgenowskiej spektroskopii i mikroskopii fluorescencyjnej i absorpcyjnej w zakresie jej zastosowania do badań próbek biologicznych. Jestem przekonana, że oceniana rozprawa habilitacyjna spełnia kryteria ustawy o tytule i stopniach naukowych, wnosząc więc do Rady Naukowej Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH o nadanie jej stopnia naukowego doktora habilitowanego z fizyki.

