



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Rozwoju i Nauk Biomedycznych
Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko



Warszawa, 22 sierpnia 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

**„Opracowanie roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego tkanki, służącego do precyzyjnej akwizycji i segmentacji danych pochodzących z mikroskopii fluorescencyjnej”
autorstwa lek. Pawła Matryby.**

Praca doktorska Pana Pawła Matryby powstała w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem jest prof. dr hab. Jakub Gołąb.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska to praca pisemna licząca 63 strony, z czego *Wstęp* stanowi 15 stron, *Materiały i metody* 6 stron, *Wyniki* 16 stron, a *Dyskusja* 4 strony. Ponadto praca zawiera *Spis treści*, wymagane *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Spis rycin*, *Wykaz skrótów*, *Założenia i cel pracy*, *Wnioski* i *Piśmiennictwo*.

Temat precyzyjnie określa zawartość pracy. Nie jest to oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oparte o testowanie nowatorskiej hipotezy, ale oryginalne rozwiązanie techniczne, mogące mieć istotne znaczenie dla analiz różnego rodzaju tkanek. Doktorant podjął się opracowania, a raczej udoskonalenia już istniejącej metody przygotowywania tkanki, w taki sposób aby mogła być ona analizowana z zachowaniem jej struktury trójwymiarowej i aby możliwe było precyzyjne lokalizowanie wybranych składników w oparciu np. o lokalizację antygenów specyficznych dla danych organelli czy struktur. Uznaję, że pod tym względem rozprawa spełnia warunki przedstawione w ustawie, a podjęta tematyka jest istotna nie tylko dla rozwoju obrazowania wykorzystywanego w badaniach podstawowych, ale także w badaniach klinicznych i diagnostyce. Wykorzystanie opisanego w rozprawie roztworu może umożliwić przeprowadzanie precyzyjnych analiz tkanek, stawianie nowych hipotez badawczych i sprawne ich weryfikowanie. *Założenia i cel* pracy nie budzą moich zastrzeżeń i uważam, że zostały dobrze sprecyzowane a potencjalne znaczenie praktyczne opracowanego roztworu może być bardzo duże.

Wstęp poprzedzający opis wyników skupia się jedynie na zwięzłym przedstawieniu obrazowania tkanek metodami, które były przez Doktoranta doskonalone. W tej części Doktorant opisuje rolę optycznego oczyszczania tkanek i narządów w celu ich precyzyjnego obrazowania, skrótowo charakteryzuje techniki TOC, w zasadzie nie prezentując ich „mnogości”, a tylko skupiając się na opisie "metod rozpuszczalnikowych", "metod rozładniających", „wodnych o wysokim

współczynnika załamania światła” i „metod transformujących tkankę”. Sposoby analiz tak przygotowanych tkanek przy użyciu mikroskopii oraz metody analizy ilościowej uzyskanych preparatów zostały opisane niezwykle skrótowo. **Wstęp** przypomina raczej niezbyt obszerny artykuł przeglądowy w zakresie metodologii niż istotny fragment rozprawy doktorskiej, który ma świadczyć o rozległej wiedzy teoretycznej Doktoranta a także wprowadzić czytelnika w problematykę prowadzonych badań na tle szerszej ujętego stanu wiedzy w dziedzinie. Przedstawiony w pracy opis jest wysoce skondensowany. Zabrakło w nim szerszego tła dla prowadzonych badań. Ta część pracy powinna zostać uzupełniona m.in. o rozdziały dotyczące metod analiz tkanek i narządów, przedstawienie technik, które są obecnie stosowane (czy tylko immunocytochemia?), szczegółowe przedstawienie koncepcji i „mnogości” technik TOC, rodzaje mikroskopii wykorzystywanej do takich analiz oraz szerszego spektrum przykładów metod analizy ilościowej danych mikroskopowych. W charakterystyce technik TOC brakuje wielu istotnych dla czytelnika informacji, np. jakie jest znaczenie użycia tego czy innego odczynnika (woda utleniona, aldehydy, eter). Uważam, że istotne byłoby też zwrócenie uwagi na wykorzystanie technik "oczyszczania" tkanek w celu identyfikacji innych niż białka związków, np. wykrywanie RNA metodą hybrydyzacji in situ? Czy jest to możliwe?

Materiały i metody stanowią zwięzły opis technik stosowanych w prowadzonych analizach. Ten rozdział nie budzi zastrzeżeń.

Analizy przedstawione w **Wynikach** dotyczą węzłów limfatycznych i mózgu myszy. Rozdział ten powinien się więc zacząć od wytłumaczenia dlaczego wybrano te a nie inne tkanki/narządy w celu opracowania opisanego roztworu. Jaka jest ich charakterystyka i jakie były uprzednie doświadczenia innych zespołów w pracach z tymi tkankami? Czy są one szczególnie trudne do przygotowania do tego rodzaju analiz? Autor powołuje się na publikację dotyczącą obszernych badań przesiewowych, które doprowadziły do przetestowania 1 691 substancji. Można oczywiście założyć, że recenzent sięgnie po pracę oryginalną, ale niestety zadaniem Autora jest przedstawienie krótkiego chociażby uzasadnienia dlaczego z tej masy związków wybrano te a nie inne. Czy tylko te 10 wybranych przez Doktoranta miało $RI > 1,45$? Jakie były inne parametry charakteryzujące te związki? Wybrane związki powinny zostać wymienione i krótko scharakteryzowane pod względem ich właściwości. Wyniki powinny więc zostać uzupełnione o uzasadnienie wyboru materiału badawczego oraz charakterystykę wybranych odczynników.

Analizując wpływ wybranych odczynników i ich mieszanin na zmianę powierzchni i „oczyszczenie” węzłów limfatycznych, oraz testując wpływ różnych stężeń tych substancji w roztworach preparujących tkankę, Autor wytypował takie, które dały najlepsze wyniki, a z nich wybrał tylko jedną mieszaninę - API (1-(3-aminopropyl) imidazol), imidazolu i mocznika (30%:25%:20%), określoną jako ISEE. Zabrakło mi jasnego wytłumaczenia dlaczego dokonał takiego wyboru skoro trzy pozostałe miały podobny potencjał do rozszerzania badanej tkanki. Autor nie zamieścił także wyników analizy transmitancji, która zależna jest od grubości warstwy a nie od jej powierzchni, dla wszystkich typowanych roztworów. W dalszych analizach wykorzystano już tylko ISEE. A szkoda, bo istotnym byłoby udowodnienie wyższości ISEE nie tylko w oparciu o jeden parametr, to znaczy zmianę powierzchni tkanki, ale także wskazując na inne jego zalety, w porównaniu np. z innymi roztworami stosowanymi w tego rodzaju analizach. Kontrolę

w prowadzonych badaniach stanowiły tkanki inkubowane w PBS a więc w roztworze, który nie ma pożądanego wpływu na badany materiał. Doktorant przeprowadził analizy polegające na wykrywaniu różnego rodzaju antygenów i wykazał, że ISEE rozszerza tkankę równomiernie, tak że możliwa jest penetracja przeciwciał i wykonanie prawidłowej immunodetekcji. Możliwa była też detekcja jąder komórkowych. Do tej analizy, zastosowano także inny odczynnik, Ce3D. Rycina 13 zawiera porównanie średnicy jąder komórkowych w tkance inkubowanej w PBS i Ce3D. Rycina 14 odnosi Ce3D do ISEE. W obu przypadkach należałoby porównać trzy warianty na jednym wykresie. Bardzo istotne okazało się to, że stosując ISEE można obrazować stosunkowo grube skrawki uzyskane z węzłów limfatycznych oraz bardzo dobrze rozdzielać sygnał, nawet jeżeli jest on „upakowany”. Na koniec części eksperymentalnej pokazano preparaty uzyskane z mózgu myszy. Przyznam jednak szczerze, że na załączonych fotografiach nie dostrzegłam znaczących różnic między PBS a ISEE. Przeważenie dodatkowej dokumentacji wskazującej na opisane różnice byłoby tu pomocne. **Wyniki**, opisują więc podstawowe parametry wpływu ISEE na badaną tkankę. Szkoda, że badania nie zostały poszerzone o inne tkanki i inne roztwory. Mogłoby to lepiej udokumentować wyższość ISEE.

Dyskusja jest zaskakująco zwięzła (4 strony). W zasadzie jest komentarzem **Wyników**, łącznie z odnoszeniem się do Rycin i powtarzaniem opisu wykonanych analiz. W sposób ograniczony odnosi się do prac innych badaczy. Rozumiem, że rozprawa dotyczy metodyki badawczej i Doktorant chciał się skupić jedynie na wykorzystywanej przez siebie technice oraz na jej zaletach, uważam jednak, że ta część pracy powinna zostać uzupełniona i rozwinięta, tak aby podkreślić dojrzałość naukową i krytycyzm Doktoranta. Prace dotyczące analiz tkanek z wykorzystaniem tego rodzaju metod są liczne i nie dotyczą tylko układu nerwowego, który *nota bene*, nie był szczegółowo analizowany w doktoracie.

Rozprawa doktorska ilustrowana jest **17 rycinami**. O ile rycina nie jest wielopanelowa i mieści się na jednej stronie, to podpis powinien znajdować się na tej samej stronie co rycina, nie być dzielony między stronami. Podpisy są często nieprecyzyjne. Przykładowo, Rycina 3 nie przedstawia technik, ale zdjęcia uzyskane z wykorzystaniem mikroskopu. Jakiego? Konfokalnego? Nie jest też jasne jakie fragmenty mózgu widoczne są na preparatach, co jest źródłem fluorescencji? endogenne białkowe fluorofory - tzn. GFP? Podpisy do rycin powinny zostać krytycznie przeanalizowane przez Doktoranta i uzupełnione, tak aby było wiadomo jaki obiekt jest przedstawiony na fotografiach, czym przeprowadzono immunodetekcję, jak analizowano materiał itd. Podpisy nie powinny zawierać komentarzy do uzyskanego wyniku. Miejscem takich komentarzy jest opis wyników. Zdjęcia zawarte w rozprawie (Ryciny 9-12, 14-17) są bardzo dobrej jakości. Większość wykresów została starannie przygotowana (wyjątkiem jest Rycina 9A – wykres jest zbyt mały), zatem moje zastrzeżenia dotyczą w tym przypadku podpisów.

Praca jest napisana dobrą polszczyzną. W kilku miejscach brakowało spacji przed znakami interpunkcyjnymi. Nie używałabym też określenia "odkryto ISEE", roztwór został opracowany, przygotowany. Ograniczyłabym użycie żargonu czy skrótów myślowych (np. cięcie histologiczne, segmentowanie komórek). Mam jednak nadzieję, że w poprawionej i uzupełnionej ostatecznej wersji pracy te drobne niedoskonałości znikną.

Podsumowując, Doktorant Paweł Matryba zrealizował postawione przed sobą cele. Przeprowadził analizy, które wykazały że opracowany przez niego roztwór może mieć zastosowanie praktyczne. Uzyskane wyniki są cenne dla rozwoju technik analiz tkanek i narządów. Moim zadaniem była ocena rozprawy doktorskiej jako całości, a nie tylko uzyskanych wyników, które jak zaznaczyłam uznaję za nowatorskie i znaczące dla rozwoju technik analitycznych. Rozprawa doktorska wymaga jednak dopracowania. Powinna być napisana w taki sposób, aby szeroko przedstawiała tło planowanych badań i istniejący stan wiedzy, a także jasne wytłumaczenie wszystkich przeprowadzonych doświadczeń i decyzji podejmowanych w trakcie ich planowania, w tym precyzyjny opis materiału badawczego, a także wnikliwą dyskusję wyników. Dzięki temu możliwe będzie odpowiednie udokumentowanie, że rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie. Ponadto, rozprawa doktorska, która według obowiązującego prawa będzie udostępniana publicznie, powinna być rozumiana nie tylko przez specjalistów histologów, osoby używające optycznego oczyszczania tkanek w obrazowaniu narządów, czy nawet szersze grono badaczy. Dlatego, w oparciu o §6, pkt 6 rozporządzenia MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 *w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*, mówiący, że „Recenzja może zawierać wnioski dotyczące uzupełnienia lub poprawy rozprawy doktorskiej, które rada jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski przekazuje kandydatowi i promotorom...”, proszę o uzupełnienie pracy o wskazane przeze mnie elementy. Uważam, że w obecnym kształcie rozprawa doktorska nie powinna być jeszcze skierowana do dalszych etapów postępowania. Dlatego, proszę Radę Naukową Dyscypliny Nauki Medyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o jej przekazanie do uzupełnienia. Doceniam ważkość przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników, ale w obecnej formie rozprawę doktorską oceniam negatywnie.

Maria Anna Ciemerych-Litwinienko

22/08/2022

uzupełniono 20/09/2022