



Wrocław, dn. 31 sierpnia 2022 r.

Recenzja pracy doktorskiej lek. Pawła Matryby pt. „Opracowanie roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego tkanki, służącego do precyzyjnej akwizycji i segmentacji danych pochodzących z mikroskopii fluorescencyjnej”, zrealizowanej w Zakładzie Immunologii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem prof. dr. hab. Jakuba Gołąba

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska liczy 63 strony wydruku komputerowego i ma typowy układ prac na stopień naukowy doktora. Można wyodrębnić w niej następujące rozdziały: wstęp (15 stron) poprzedzony spisem treści, spisem rycin, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim, następnie założenia i cel pracy (1 strona), materiały i metody (6 stron), wyniki (17 stron), dyskusja (5 stron), wnioski (1 strona) oraz 93 pozycje cytowanego piśmiennictwa (7 stron).

We **wstępie** Doktorant zrobił wnikliwy przegląd czterech podstawowych technik oczyszczania optycznego tkanek i wprowadził zagadnienie rozszerzania tkanek, które było głównym przedmiotem rozprawy. Na kolejnych stronach przedstawiono założenia mikroskopowej analizy ilościowej tkanek (histocytometrii) i problematykę segmentacji jąder komórkowych w obrazach mikroskopowych, która jest podstawowym narzędziem przy tego typu analizach. Tak zarysowany wstęp bardzo przystępnie naświetlił tematykę pracy, umożliwiając pełne zrozumienie oraz docenienie użyteczności przeprowadzonych badań.

Cel pracy jest klarownie sformułowany i opiera się na czterech zadaniach badawczych. Głównym celem badań Doktoranta było stworzenie nowej formuły roztworu służącego jednocześnie do oczyszczenia optycznego tkanek, jak i kontrolowanego ich rozszerzenia w celu ułatwienia segmentacji obiektów w gęsto upakowanych komórkowo tkankach, takich jak węzły chłonne. Zadania obejmowały ustalenie ostatecznego składu tego roztworu spełniającego określone założenia (1), sprawdzenie jego funkcjonalności i statusu oczyszczanych/rozszerzanych tkanek (2), weryfikację użyteczności opracowanego roztworu do mikroskopowej analizy ilościowej przetwarzanych tkanek (3) oraz porównanie jego działania względem referencyjnej techniki oczyszczania optycznego (C₃D) (4).

W **materiałach i metodach** Doktorant dość szczegółowo opisał sposób preparatyki tkanek (mysich węzłów chłonnych), przeprowadzone barwienia immunofluorescencyjne, proces obrazowania mikroskopowego i analizę zdjęć z wykorzystaniem programów ImageJ i Imaris oraz ich statystyczną ocenę.

Strona 1 z 5





Opis świadczy o dobrej znajomości narzędzi badawczych niezbędnych do wykonania założonych celów.

Wyniki zostały przedstawione w sposób systematyczny i umożliwiający ich zrozumienie. W treść rozdziału wkomponowano liczne wykresy, tabele i zdjęcia dokumentujące przeprowadzone badania. W toku prac Doktorantowi udało wykazać, że kilkuskładnikowy roztwór o ustalonym składzie (pod nazwą ISEE) pozwala na optyczne oczyszczenie tkanek różnego typu wraz z ich kontrolowaną i umiarkowaną ekspansją. Co istotne, roztwór ISEE umożliwia przeprowadzenie bardziej skutecznej analizy ilościowej sygnału jądrowego i błonowego (po wybarwieniu immunofluorescencyjnym) w porównaniu do innych kontrolnych technik przetwarzania tkanek.

W **dyskusji** Doktorant zgrabnie podsumował uzyskane wyniki, odnosząc je również do osiągnięć innych badaczy, zajmujących się podobną tematyką. Podkreślone zostały zalety i ograniczenia opracowanego roztworu ISEE względem pozostałych metod oczyszczania i rozszerzania tkanek, również w kontekście analizy obrazów mikroskopowych i uzyskiwanych danych liczbowych, umożliwiających obiektywne badania porównawcze.

Rozprawę kończy pięć **wniosków**, które są poprawnie sformułowane, w pełni odpowiadają na wcześniej postawione cele i krytycznie interpretują otrzymane wyniki badań.

Ostatni rozdział - **Piśmiennictwo** zawiera listę cytowanych publikacji, która stanowi bardzo interesujący zbiór prac z tematyki rozprawy, pozwalający na poznanie aktualnego stanu wiedzy i skonfrontowanie wyników Doktoranta z tym, co do tej pory osiągnięto w obranym obszarze badawczym.

W mojej opinii praca doktorska lek. Pawła Matryby stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe, które może być bardzo użyteczne dla innych naukowców, zajmujących się histocytochemią i ilościową analizą preparatów tkankowych obrazowanych na drodze mikroskopii świetlnej. Jest to aktualnie „święty graal” dla badaczy próbujących zrozumieć procesy biologiczne zachodzące w tkankach, w których przestrzenna dystrybucja komórek determinuje ich zachowanie i pełnione funkcje. Rozwój technik analitycznych umożliwiających takie badania przy zachowaniu natywnej struktury tkanek jest wysoce pożądanym. W związku z powyższym oceniam rozprawę bardzo wysoko pod względem metodycznym, jak i merytorycznym. Mam jednak dodatkowe pytania i komentarze, które mają raczej charakter redakcyjny i dyskusyjny, i nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy (wg kolejności występowania w tekście):

Strona 2 z 5



1. Str. 14 – Doktorant dość dobitnie stwierdza m.in., że technika ScafeS „oferuje mierny poziom przezroczystości”, z czym bym się nie zgodził. Metoda ta pozwala na oczyszczenie optyczne nie tylko całej tkanki mózgu myszy, ale i tkanek innego typu, o bardzo zwartej strukturze, takich jak np. mysia pochwa (badania własne).
2. Str. 14 – przy cytowaniu publikacji nr 13 Doktorant użył sformułowania „odkrycia potencjału technik TOC przez grupę Dodta” – zwyczajowo to ostatni autor cytowanej pracy stanowi kierownika grupy.
3. Str. 16 – Doktorant odnosi się do „silnej autofluorescencji tkanek zwierzęcych w spektrum koloru niebieskiego i zielonego [od ~400 do ~500 nm]” – zakres niebiesko-zielony, w którym występuje autofluorescencja to raczej 450 – 550 nm.
4. Str. 17 (oraz str. 22, 39, 41, 42) – Doktorant używa wyrazu „wyżarzenie” w przypadku zaniku sygnału fluorescencyjnego pod wpływem różnych czynników, co nie wydaje się adekwatne. W kontekście emisji światła przez białka fluorescencyjne oczyszczanie optyczne za pomocą różnych rozpuszczalników może prowadzić do utraty zdolności do emisji poprzez zmianę konformacji tych białek lub destrukcję fragmentu zawierającego chromofor. „Wyżarzenie” sugeruje raczej proces wypalenia pod wpływem zbyt dużej intensywności światła użytego do wzbudzenia a w takim wypadku bardziej stosowne byłoby użycie wyrazu wygaszanie lub blaknięcie (z ang. bleaching).
5. Str. 17 – przy cytowaniu publikacji nr 35 Doktorant użył sformułowania „Hahn wraz ze współnikami” – wyraz „współpracownicy” byłby bardziej na miejscu.
6. Str. 21 – Doktorant napisał, cytując pracę nr 56, że zmodyfikowany system obrazowania spinning disk umożliwił „rozdzielczość poniżej 20 nm w osi bocznej” – w cytowanej pracy rozdzielczość taka dotyczyła płaszczyzny XY (ang. lateral) w odróżnieniu do osi Z (ang. axial).
7. Str. 25 – Doktorant określił limfocyty i komórki dendrytyczne jako komórki o resztkowej ilości cytoplazmy – nie jest to do końca prawda w przypadku komórek dendrytycznych, które mogą być bardzo bogate w długie i liczne wypustki penetrujące swoje środowisko występowania.
8. Str. 28 – Doktorant określa temperaturę pracowni mikroskopowej jako warunki obniżonej temperatury (22°C) – jest to raczej standardowa temperatura pokojowa.
9. Str. 30 – czy stosowano 2% pełną surowicę wołową czy albuminę z surowicy wołowej, jak sugeruje angielskie rozwinięcie?
10. Str. 30 – bardziej użyteczne dla społeczności naukowej byłoby stosowanie stężeń gramowych/molowych niż podawanie rozcieńczenia roztworu roboczego o nieznanym stężeniu (szczególnie w przypadku Hoechst 33342 i jodku propidyny).
11. Str. 30 – w jakiej temperaturze prowadzono barwienia skrawków za pomocą przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych?

- 12.Str. 30 – w Tabeli 1 „stężenie” powinno być zamienione na „rozcieńczenie”.
- 13.Str. 31 – skład roztworu ISEE korzystniej byłoby wyrazić w stężeniach gramowych/molowych.
- 14.Str. 31 – w jakiej temperaturze prowadzono oczyszczanie za pomocą roztworu ISEE?
- 15.Str. 31 – czy kontrolne oczyszczanie techniką C₆3D prowadzono na całych węzłach chłonnych czy na skrawkach? – ISEE stosowano na skrawkach.
- 16.Str. 32 – opis parametrów obrazowania korzystnie byłoby wzbogacić o wartość przesłony konfokalnej (ang. pinhole) stosowanej przy obrazowaniu, rozmiar piksela w zdjęciu, doprecyzowanie jednostki prędkości skanowania i podanie grubości szkiełek nakrywkowych użytych do zamykania preparatów.
- 17.Str. 32 – preparaty obrazowano przy odstępach między sekcjami o wartości 2 µm. Optymalny krok dla obiektywu 40x jest zdecydowanie mniejszy – czy segmentacja jąder mogłaby być lepsza, jeśli interwał byłby mniejszy, np. na poziomie 0,3 – 0,5 µm?
- 18.Str. 32 – zdanie „Uzyskane dane odtwarzano z wykorzystaniem ImageJ (National Institutes of Health) i za pomocą *polygon selections* na plikach pochodzących z obrazowania z obiektywem 40x po ISEE” nie jest jasne.
- 19.Str. 32 – W jaki sposób określono pomniejszenie obszarów o 12,7%?
- 20.Str. 32 – Doktorant zdecydował się na detekcję jąder komórkowych w programie Imaris za pomocą funkcji „surface” i jako parametr detekcji m.in. używał średnicy 80 µm („Diameter of Largest Sphere”). Średnica jądra limfocyta mieści się w zakresie 5- 10 µm. Skąd taka wartość tego parametru? Czy Doktorant testował do segmentacji funkcję „spots”, która wykrywa obiekty kuliste?
- 21.Str. 36 – Rycina 6 ma tytuł „Stężenie imidazolu i API odgrywa ważniejszą rolę podczas rozszerzania mysich WL niż stężenie mocznika” – skąd taki wniosek?
- 22.Str. 37 – Tabela 4 zawiera wartości czynnika załamania światła (RI). W jaki sposób mierzono te wartości? W rozdziale Materiały i Metod brakuje opisu tej techniki.
- 23.Str. 38 – czy angielskie rozwinięcie skrótu ISEE jest zapisane poprawnie (benign czy benign)?
- 24.Str. 38 – czy wysokie pH roztworu ISEE (pH 12) może mieć wpływ na zanik fluorescencji białek fluorescencyjnych obecnych w tkankach i krótką żywotność barwnika AF488?
- 25.Str. 38 – Rycina 8 zawiera wartości transmitancji roztworu ISEE. W jaki sposób mierzono te wartości? W rozdziale Materiały i Metod brakuje opisu tej techniki.
- 26.Str. 41 – Doktorant określił światło lasera o długości 488 nm jako zielone. Kolor niebieski jest bliższy prawdy.



27. Str. 42 – Rycina 11, panel A – zdjęcie sugeruje zmianę dystrybucji sygnału i lokalny wzrost jego intensywności – czy zdjęcie na pewno pokazuje autofluorescencję?
28. Str. 44 – Rycina 12. W opisie zdjęć ABC powinna być zawarta informacja czy są to pojedyncze sekcje optyczne czy rekonstrukcje 3D w programie Imaris? Sformułowania „początek” i „koniec zakresu” oraz oznaczenia regionów linią ciągłą i przerywaną nie są klarowne bez informacji, że panel B pokazuje całą objętość próbki. Projekcje boczne byłyby bardziej informatywne dla wykazania dwóch różnych głębokości w preparacie. Korzystniej też byłoby podać informacje o głębokości w próbce zamiast początku i końca zakresu.
29. Str. 44 – Jaki był cel obrazowania obiektywem 20x tylko próbek inkubowanych w roztworze ISEE? W tekście rozprawy zabrakło mi wyjaśnienia celowości wykorzystywania tego obiektywu.
30. Str. 45 – Rycina 13 przedstawia analizę średnicy jąder, natomiast jej tytuł postuluje brak zmian kształtu całej tkanki.
31. Str. 46 – Rycina 14, panel D – skąd bierze się 50% kompensacja spadku rozdzielczości w osi Z w analizie liczby jąder komórkowych?
32. Str. 48 – detekcja sygnału błonowego była analizowana w porównaniu roztworów ISEE i PBS. Czy segmentacja obrazów z błonami komórkowymi tkanek po ISEE byłaby lepsza niż dla Ce3D?
33. Str. 49 – Rycina 16. W opisie zdjęcia A powinna być zawarta informacja czy są to pojedyncze sekcje optyczne czy rekonstrukcje 3D w programie Imaris? Sformułowania „początek” i „koniec zakresu” oraz oznaczenia regionów linią ciągłą i przerywaną nie są klarowne bez informacji, że zdjęcie A pokazuje całą objętość próbki. Projekcje boczne byłyby bardziej informatywne dla wykazania dwóch różnych głębokości w preparacie. Korzystniej też byłoby podać informacje o głębokości w próbce zamiast początku i końca zakresu.
34. Str. 50 – Czy obrazy w Rycinie 17 to sklejone w mozaiki pojedyncze pola widzenia prezentujące pojedyncze sekcje optyczne czy rzuty 3D całych objętości?

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych WUM o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych.

[Faint, illegible signature]



