

**KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII
KLINICZNEJ
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE**

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (81) 448 65 30; 448 65 32 fax (81) 448 65 31
e-mail: patomorfologia@umlub.pl www.patomorfologia.lublin.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Pawła Matryby

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

**wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Jakuba Gołąba
w Zakładzie Immunologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Typowe przygotowanie materiału biologicznego/tkankowego *ex vivo* do badań histologicznych i patomorfologicznych opiera się na odpowiednim utrwaleniu i opracowaniu niezbędnemu do oceny w mikroskopie świetlnym. Rutynowym utrwalaczem jest 10% zbuforowana formalina. Roztwór ten szybko penetruje tkanki, minimalnie wpływa na zmiany strukturalne, jednak powoduje ich obkurczenie rzędu nawet 40-60%. Zbyt długie przetrzymywanie materiału w formalinie może prowadzić do zamaskowania antygenów, co uniemożliwia uzyskanie wiarygodnych odczynów immunohistochemicznych. W przeciwieństwie do technik rozszerzania tkanki, grubość skrawka nie powinna przekraczać 4-5 μm , co zapewnia jednolitą płaszczyznę do oceny preparatu.

Czy mikroskop świetlny ma już swoje lata świetności za sobą? W klasycznej podejściu, tj. jako urządzenie optyczne do obserwacji obiektów w świetle przechodzącym - zapewne tak. Rozdzielczość, zakres przenoszonego kontrastu to podstawowe ograniczenia mikroskopu świetlnego. Co może pozwolić na dokładniejsze obrazowanie morfologii i struktur komórkowych? Oczywiście mikroskopy elektronowe. Wyznaczyły one nowy wymiar poznania i obrazowania materii, umożliwiają ocenę przekrojów/ultrastruktury (transmisyjny mikroskop elektronowy; TEM), a także powierzchni (skaningowy mikroskop elektronowy; SEM). Rozdzielczość i możliwość obrazowania w powiększeniach sięgających powyżej 100 tys. nie pozwalają jednak na ocenę i obrazowanie „żywych preparatów”, w przeciwieństwie do mikroskopów konfokalnych.

Jednak jak każde urządzenie, mikroskop konfokalny ma zalety i wady, które determinują zakres wykonywanych badań. Do niewątpliwy zalet należy zaliczyć małą głębokość ostrości, większą rozdzielczość niż klasyczna mikroskopia optyczna, możliwość rekonstrukcji obrazu (rejestracja serii przekrojów na różnych głębokościach preparatu; 3D, 4D), brak „poświaty” z warstw preparatu leżących poza płaszczyzną ostrości i ocenę wielokrotnego znakowania. Oprócz ceny, istotnym ograniczeniem mikroskopu konfokalnego jest niska rozdzielczość w stosunku do mikroskopii elektronowej i wrażliwość na wpływ otoczenia. Mała głębokość ostrości umożliwia dokładne tj. warstwa po warstwie, skanowanie preparatu a następnie jego rekonstrukcję. Dzięki złożeniu wielu przekrojów (ok. 2 μm każdy) można zobrazować relacje przestrzenne obrazowanej struktury.

Istotną barierą dla złożenia wielu warstw jest brak właściwej przejrzystości tkanki. Optyczne oczyszczanie tkanki przeznaczonej do obrazowania/oceny w mikroskopie konfokalnym powinno pozwolić na uzyskiwanie wiarygodnych danych opisujących badane struktury i ich specyficzną immunoreaktywność. Opracowanie roztworu pozwalającego na rozszerzenie tkanki na potrzeby obrazowania w mikroskopie konfokalnym było podstawowym celem przekazanej do recenzji dysertacji, a podjęty temat uważam za ważny z poznawczego i praktycznego punktu widzenia.

Rozprawa licząca 63 strony ma układ typowy dla prac doświadczalnych.

W 14-stronnicowym, strukturyzowanym wstępie Pan Paweł Matryba wyjaśnił znaczenie techniki optycznego oczyszczania tkanek (*tissue optical clearing*, TOC) w obrazowaniu grubych wycinków, w tym całych narządów. Następnie przystępnie opisał cztery kategorie, dynamicznie rozwijających się ostatnio technik TOC w zależności od zastosowanych odczynników, tj. metody rozpuszczalnikowe, rozgadniające, transformujące tkanki i wodne o wysokim współczynniku załamania światła. Uwzględnił elementarne informacje o stosowanych protokołach, wadach i zaletach poszczególnych metod oraz możliwości ich zastosowania w badaniach naukowych. W końcowej części wstępu omówił zagadnienia związane z histocytometrią i zastosowaniami nowoczesnych narzędzi analizy danych uzyskanych z histocytometrii. Wstęp wzbogacił o cztery ryciny ze schematami etapów oczyszczania tkanek z wykorzystaniem i klasyfikacją technik TOC oraz ze złożonymi zdjęciami obrazującymi wyniki badań. Ryciny były zmodyfikowanymi zapożyczeniami z publikacji cytowanych przez Doktoranta.

Wstęp poprzedza spis treści i wykaz skrótów zastosowanych w rozprawie z rozwinięciem w języku angielskim, a jeżeli było to możliwe, także polskim. Umieścił tam także nietypowo spis rycin oraz streszczenia dysertacji w językach polskim i angielskim.

W dalszej części, Doktorant zwięźle sformułował założenia pracy i cztery ambitne cele szczegółowe, którymi są:

1. Identyfikacja związków potencjalnie rozszerzających tkankę, charakteryzujących się wysokim ($>1,40$) współczynnikiem załamania światła, weryfikacja ich wpływu na wielkość tkanek i opracowanie ostatecznego roztworu.
2. Zbadanie kompatybilności opracowanego roztworu z protokołami obrazowania fluorescencyjnego, tj. (1) właściwości roztworu podczas wielogodzinnego obrazowania w warunkach obniżonej temperatury (22°C) pracowni mikroskopii konfokalnej, wpływu na (2) integralność epitopów oraz (3) kształt tkanki, (4) zachowania emisji pochodzącej z endogennie kodowanych białek fluorescencji, (5) zachowania sygnału pochodzącego z komercyjnie dostępnych fluoroforów.
3. Zbadanie użyteczności stosowania roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego w kontekście akwizycji i segmentacji danych mikroskopowych w porównaniu do standardowego schematu obrazowania tkanek.
4. Zbadanie użyteczności stosowania roztworu optycznie oczyszczającego i rozszerzającego w kontekście akwizycji i segmentacji danych mikroskopowych w porównaniu do referencyjnej techniki optycznego oczyszczania mysich WL - Ce3D.

W kolejnym rozdziale szczegółowo opisano materiał i metody badań. Doktorant przeprowadził badania na materiale tkankowym pobranym od trzech szczepów wsobnych myszy. Po utrwaleniu w 4% roztworze paraformaldehydu materiał zatapiał w 3% roztworze agarozy, skrawał a uzyskane skrawki przechowywał w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS).

W pracy oceniał 10 uprzednio wybranych związków chemicznych potencjalnie rozszerzających tkanki, z wysokim wskaźnikiem refrakcji (RI). Węzły chłonne fotografował, inkubował w roztworach badanych związków i ponownie fotografował po 24 godzinach od początku inkubacji. Uzyskane cyfrowe obrazy obrysowywał i mierzył ich powierzchnię z użyciem programu (ImageJ v 1.52n; NIH). W pierwszej serii oceniał wpływ pojedynczych roztworów w sześciu różnych stężeniach na objętość węzłów, a w kolejnej wpływ 10% mieszaniny potencjalnie najbardziej obiecujących substancji (powodujących rozszerzenie powierzchni o $\sim 25\%$).

W celu zbadania kompatybilności opracowanego optymalnego roztworu z protokołami obrazowania fluorescencyjnego wykonywał barwienia fluorescencyjne na skrawkach węzłów. Po zablokowaniu miejsc niespecyficznego wiązania roztworem blokującym stosował szereg przeciwciał pierwszorzędowych lub bezpośrednio skoniugowanych z fluorochromami

oraz barwniki jądrowe. W przypadku przeciwciał pierwszorzędowych, po ostatnim płukaniu dodawano przeciwciała wtórne sprzężone z fluoroforem.

Optyczne oczyszczanie przeprowadzał przy użyciu opracowanego nowego związku (ISEE) oraz Ce3D. W przypadku zastosowania ISEE, skrawki o grubości 40 i 100-200 μm inkubował w roztworze przez odpowiednio 15 i 30 minut, po czym zatapiał i obrazował. Przy oczyszczaniu z użyciem Ce3D stosował uprzednio opisany protokół, a skrawki inkubował przez 24 godziny. Obrazowania konfokalnego preparatów wyznakowanych fluorescencyjnie dokonywał przy użyciu mikroskopu Leica TCS SP8 (Leica Microsystems), wyposażonego w moduł Navigator. Wzbudzenia dokonywał z wykorzystaniem lasera światła białego lub argonowego w odpowiednich dla danych fluoroforów długościach. Detekcja była przeprowadzana w większości z wykorzystaniem detektorów hybrydowych, HyD. Akwizycji obrazów dokonywał w rozdzielczości 1024×1024 (pozostałe parametry pozyskiwania obrazów: głębia 8 bitów, prędkość 600, krok w osi z = 2 μm). Do porównania detekcji jąder komórkowych i sygnałów błonowych (dla skrawków 40 i 100 μm) Doktorant poprawnie wykorzystał możliwości techniczne zastosowanego mikroskopu oraz odpowiednio przetworzył uzyskane dane obrazowania na potrzeby dalszej oceny. Należy, w tym miejscu zauważyć, że do optymalnego obrazowania poszczególnych grup zastosował odmienne moce lasera (z uwagi na inną transmitancję/absorbancję tkanki nieprzezroczystej i po ISEE), więc przedstawione **maksymalne wartości** intensywności nie powinny być porównywane bezwzględnie, a stanowić wskazówkę dotyczącą charakterystyki fluorescencji.

Zarówno oprogramowanie, jak i sposób jego wykorzystania nie budzą zastrzeżeń, co do poprawności obrazowania i analizowana struktur, a w konsekwencji także otrzymanych danych. Należy podkreślić, że do weryfikacji założeń Autor wyznaczył i analizował dwie grupy regionów o odmiennym stopniu upakowania komórek (regiony w obrębie grudek chłonnych i strefę międzygrudkową).

Zastosowane w pracy metody są opisane szczegółowo, z niewątpliwą znajomością tematu. Ponieważ jednak metodyka jest dość złożona i nie zawsze należy zakładać, że będą ją czytali jedynie specjaliści, wskazane byłoby sporządzenie poglądowego schematu badań. Ponadto w rozdziale brak kilku istotnych elementów. Doktorant nie podaje liczby zwierząt, które zostały wykorzystane do realizacji projektu. Brak też informacji o liczbie skrawków węzłów, na których testował roztwory do oczyszczania tkanek i skrawków, na których analizowano następnie właściwości ISEE. Liczby te są konieczne do oceny wiarygodności wyników i poprawnej weryfikacji hipotez. W pracy nie przedstawiono wartości uzyskanych wyników, w związku z tym nie można ocenić poprawności zastosowanych metod

statystycznych. Moje wątpliwości budzi także stwierdzenie o braku konieczności uzyskania zgody Komisji Etycznej wynikające z faktu, że myszy były „jedynie donorami” tkanek. Brak w tym rozdziale informacji o rodzaju wykorzystanych związków chemicznych do oczyszczania tkanek (pojawia się dopiero w wynikach). W tabeli 1 (Lista przeciwciał wykorzystanych w pracy) w kolumnie z nazwami przeciwciał, siedem zostało określonych jedynie jako *anti-rat*, *anti-mouse* itd., czego raczej nie można przyjąć za nazwę przeciwciała. Błąd literowy w nazwie podrozdziału 3.2 (potencjalnie zamiast potencjale).

Kolejny, najważniejszy rozdział, dotyczy wyników i uzupełnia go 13 rycin, w większość złożonych, bardzo sugestywnych, prezentujących przykładowe wyniki prac własnych. W rozdziale tym Doktorant wreszcie wyjaśnia znaczenie tajemniczego akronimu ISEE (*Improved Segmentation with bEning Expansion*; str. 38!). Wyniki wskazują na bogate doświadczenie oraz zaawansowanie prac zmierzających do opracowania związku, który musi odpowiadać dwóm kryterium dla wykonania preparatów do oceny w mikroskopie konfokalnym, tj. rozszerzać powierzchnię tkanek (o około 30%) oraz doprowadzać do oczyszczenia optycznego ($RI \geq 1,45$). Selekcja pozwoliła na opracowanie czterech związków (różna zawartość procentowa) na bazie imidazolu, API [1-(3-aminopropyl)imidazolu] i mocznika. Właściwą część doświadczeń wykonano wykorzystując roztwór ISEE zawierający: 30% API, 25% imidazolu, 20% mocznika i 25% wody. Doktorant zadeklarował, że roztwór taki charakteryzuje się wysoką transmitancją w zakresie widma światła widzialnego, jego pH wynosi około 12, a $RI = 1,47$. Pan Matryba obserwując węzły chłonne wykazał, że ISEE dokonuje rozszerzania izometrycznego i tym samym utrzymuje strukturę subkomórkową preparatów. Co istotne, stwierdził stabilizację sygnału fluorescencyjnego podczas IHC z wykorzystaniem drugorzędowych przeciwciał. Jednak dla przeciwciała AF 488 nie uzyskał stabilnego efektu, tj. silny sygnał utrzymywał się wyłącznie w dniu oczyszczania i rozszerzania. Ponadto, dla odczynów z przeciwciałami drugorzędownymi wykazał skuteczną detekcję białkowych fluoroforów, pomimo ich pierwotnego wyzarzenia.

Zarówno opis, jak i interpretacja wyników dotyczących segmentacji jąder komórkowych po zastosowaniu ISEE budzi pewne wątpliwości. Uzyskane rozszerzenie o 15% skrawków 100 μm węzłów wskazuje na odstępstwa od pierwotnie zakładanych wartości granicznych. Jednak uwzględniając morfologię węzła, a także brak wstępnej oceny czy węzeł nie wykazywał zmian zapalnych/odczynowych, pewne trudności w osiągnięciu większej segmentacji jąder wydają się naturalne. Doktorant słusznie podniósł, że optymalne obrazowanie jest zależne od dobranej mocy lasera, w związku z tym intensywność należy odnosić po poprawnie dobranego wzorca (kontroli). Według mnie, za najistotniejszą

obserwację/wynik niniejszej dysertacji należy uznać to, że ISEE pozwala na zachowanie pierwotnego kształtu tkanki (pomimo jej rozszerzenia) oraz sygnału fluorescencyjnego.

Z uwag technicznych do rozdziału – pan Matryba w opisie analizy statystycznej zadeklarował, że na rycinach zostały zaprezentowane średnie ze słupkami błędów, jako błędów standardowych średniej. „Ocena wzrokowa” rycin oraz brak wartości może przemawiać za niepoprawną analizą statystyczną (brak liczebności grup, duży zakres wartości odchylenia standardowego), tj. brak rozkładu normalnego dla analizowanych cech. Ponadto, nie zamieścił legendy do rycin, a należało opisać co symbolizują – poza słupkami i błędem standardowym średniej arytmetycznej. Stwierdzenie „stężenie wody” należy uznać za co najmniej niezręczne (tabela 4).

Następną częścią dysertacji jest dyskusja licząca tylko cztery strony. Doktorant przypomniał w niej skrótowo najważniejsze wyniki swoich badań. Odniósł się do korzyści, jakie można uzyskać przy zastosowaniu opracowanego przez niego roztworu ISEE. Wykazał przewagę ISEE nad innymi metodami, wynikającą z unikalnych właściwości roztworu. Umiarkowane, powtarzalne i izometryczne rozszerzenie badanej tkanki po zastosowaniu ISEE wpływa bezpośrednio na dokładniejszą segmentację uzyskanych danych, bez wybitnego wzrostu ich objętości, a także pośrednio na zwiększenie komfortu prowadzonych badań. Pan Matryba wspominał w Dyskusji o ograniczeniach opracowanego roztworu - niekompatybilności przy zastosowaniu przeciwciał bezpośrednio skoniugowanych oraz wskazał potencjalne kierunki dalszych dociekań naukowych. Dyskusja, mimo, że krótka, napisana została bardzo rzeczowo i logicznie, co najlepiej świadczy o doskonałej znajomości przedmiotu wykazanej przez Doktoranta.

Wyniki badań zostały podsumowane w pięciu wnioskach rozbudowanych, które odpowiadają założonym celom. W rozprawie Doktorant wykazał:

1. ISEE to pierwszy roztwór TOC, który gwarantuje izometryczne, powtarzalne rozszerzanie mysich węzłów limfatycznych o 15% liniowo. Wartość ta tylko nieznacznie (o ~60-70%) wydłuża czas akwizycji danych i zwiększa ich późniejszą objętość, jednocześnie oferując korzystne warunki dla skutecznego procesu segmentacji.
2. ISEE poprawia skuteczność segmentacji sygnału pochodzącego z jąder komórkowych, jak i sygnału błonowego. Efekt ten jest szczególnie znaczący w wypadku gęsto upakowanych regionów, takich jak grudki limfocytów B, zarówno w wypadku porównania z klasycznymi warunkami obrazowania, jak i referencyjną techniką TOC – Ce3D.

3. ISEE, na poziomie rozdzielczości mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem obiektywu powiększającego 40-krotnie, nie prowadzi do deformacji tkanki lub poszczególnych typów jej komórek.
4. ISEE, o współczynniku załamania światła – 1,47, pełni jednocześnie funkcję roztworu optycznie oczyszczającego, rozszerzającego i wyrównującego współczynnik refrakcji, co pozwala na wykorzystywanie go jako medium podczas obrazowania.
5. Podstawowym ograniczeniem ISEE jest niekompatybilność z IHC z wykorzystaniem przeciwciał bezpośrednio skoniugowanych. Weryfikacji wymaga również kompatybilność grubszych skrawków traktowanych ISEE z LSM oraz użyteczność rozszerzania w kontekście segmentacji z wykorzystaniem zaawansowanych technik opartych o uczenie maszynowe.

Moim zdaniem ostatni wniosek jest nieuprawniony, a nawet wewnętrznie sprzeczny, ponieważ uczenie maszynowe wymaga właściwego przygotowania zbiorów danych (w tym tzw. zbioru uczącego) do opracowania algorytmów.

Następną część dysertacji stanowi spis piśmiennictwa liczący 93 pozycje uszeregowane według kolejności cytowań. Zawiera najważniejsze z punktu widzenia podjętej tematyki badawczej artykuły anglojęzyczne, opublikowane głównie w ostatnich kilku latach. Co istotne, znalazły się w nim zarówno publikacje własne Autora, jak też promotora dysertacji pana prof. Jakuba Gołąba (# 14, 16, 17, 41). W spisie piśmiennictwa zauważyłam pewną niekonsekwencję – w niektórych pozycjach podawano niepotrzebnie pełną nazwę gazety (np. #79), zbędne miesiące publikacji lub duże litery we wszystkich wyrazach tytułów publikacji (np. #63, 73, 79). Natomiast sposób cytowania prac w tekście dysertacji nie budzi zastrzeżeń.

Mam także pewne dodatkowe uwagi dotyczące pracy. Pewne zastrzeżenia budzi tytuł dysertacji. Precyzyjna akwizycja danych umożliwia ich dalsze przetwarzanie, do którego należy zaliczyć również segmentację (grupowanie danych). Ponadto, należało jednak w tytule bezpośrednio odnieść się do mikroskopu konfokalnego, ponieważ mikroskopia fluorescencyjna jest pojęciem szerszym, obejmującym kilka technik.

Wskazana byłaby większa dbałość o polską nomenklaturę medyczną i nie tylko (np. niepotrzebne użycie terminów węzeł limfatyczny czy embrion zamiast - węzeł chłonny, zarodek – co jest zgodne z przyjętą nomenklaturą anatomiczną). Oczywiście w dobie powszechności języka angielskiego w codziennej praktyce naukowej jest to trudne.

W podpisach rycin i tabel konieczne są wyjaśnienia zastosowanych akronimów. Należy także unikać stosowania skrótów tam, gdzie są one zbędne (np. zupełnie niepotrzebny i nieprawidłowy skrót WL w tekście i podpisach tabel/rycin).

Nie wszystkie akronimy są wyjaśnione w tekście (patrz DMSO str. 21) albo brak ich w spisie skrótów (np. ISEE, DMSO).

Powyższe uwagi nie wpływają jednak negatywnie na ogólną ocenę dysertacji.

Podsumowując, wartościowy materiał badawczy otrzymany przy zastosowaniu nowoczesnych metod i znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, jak również doskonała znajomość zagadnień zaprezentowana przez lekarza Pawła Matrybę, upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zawartych w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017) z późniejszymi zmianami.

W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lekarza Pawła Matryby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dnia 12 września 2022 r.

Prof. dr hab. n.med. Justyna Szumilo