

Recenzent

Prof. n. techn. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

Politechnika Wrocławska

50-370 Wrocław

Wybrzeże Wyspiańskiego 27

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

*Mikrospektroskopowe badania fluorescencyjne tkanki łącznej i jej patologii*

**Autor rozprawy: mgr Wojciech Cizek**

Promotor: **prof. zw. dr hab. Zofia Drzazga**

Promotor pomocniczy: **dr Jarosław Paluch**

**Uniwersytet Śląski**

**Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych Instytut**

**Fizyki im. Augusta Chelkowskiego**

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Zastępcy Dyrektora Instytutu Fizyki im. Augusta Chelkowskiego –Pani dr hab. Elżbiety Stephan prof. UŚ, wyrażoną w piśmie z dnia 23. listopada 2021 na podstawie Uchwały Rady Instytutu z dnia 22. listopada 2021. Data wpływu pisma na Politechnikę Wrocławską: 30 listopada 2021.

### **Ocena aktualności zagadnień poruszanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej**

Badanie układów biologicznych, w tym analiza sygnałów generowanych przez komórki czy tkanki, nie jest tylko domeną ściśle medyczną, gdyż jest to zagadnienie inter- i wielodyscyplinarne, wymagające współpracy lekarzy z inżynierami i fizykami. Na świecie, ale także i w Polsce rozwija się medycyna spersonalizowana, oparta na prewencji, predykcji i zindywidualizowanym podejściu do pacjenta, w ścisłym powiązaniu z badaniami podstawowymi. W tym kontekście bardzo ważne są badania właściwości zdrowych tkanek i porównania do tkanek objętych procesem chorobowym.

**Problematyka rozprawy obejmująca mikrospektroskopowe badania fluorescencyjne tkanki łącznej i jej patologii autorstwa Pana Wojciecha Ciszka jest więc ważna i aktualna, a także dobrze wpisująca się w zakres uprawianej dyscypliny naukowej.**

## Ocena struktury rozprawy i sposobu prezentowania zagadnień

Recenzowana rozprawa doktorska liczy wraz z przypisami, spisem rysunków i tabel, 81 stron. Podzielona jest na część literaturową i część badawczą. Trochę niezrozumiałe jest zaliczenie celu pracy, materiału badawczego i opisy aparatury do części literaturowej – tak przynajmniej wynika ze spisu treści.

Bibliografia liczy 116 pozycji i jest prezentowana w kolejności cytowania. Bibliografia jest adekwatna do omawianych treści, zawiera pozycje należące do klasyki w tej tematyce, a także dużą liczbę cytowań prac w miarę współczesnych, chociaż mało jest najnowszych publikacji, z ostatnich 5 lat. W spisie literatury jest wymieniona jedna publikacja współautorstwa Doktoranta w *Journal of Fluorescence* z 2019 roku.

Część teoretyczna zawiera rozważania na temat obiektów badań, czyli tkanki kostnej i chrzęstnej. Omówiono też zagadnienia badań tkanki łącznej za pomocą skaningowej mikroskopii konfokalnej.

Należy uznać, że Doktorant ma dość przyzwoitą ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie dyscypliny naukowej, w której ubiega się o nadanie stopnia doktora, zgodnie z *Art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi nowelizacjami*, stwierdzającym, iż rozprawa doktorska powinna „wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej”.

Część doświadczalna prezentuje wyniki badań wskazanych w celu pracy, a mianowicie badania piszczeli noworodków szczurzych w różnym wieku, których matki w czasie ciąży leczono lekiem antyretrowirusowym i wyniki badań grupy kontrolnej, której nie poddano takiej terapii. Innym nurtem badań są badania biozgodności chrząstek ludzkich z rejonu nosa, ucha, krtani i stawu kolanowego na potrzeby rekonstrukcji w laryngologii. Praca ma więc szerszy aspekt, jednakże pewnym mankamentem tej części jest brak postawionych hipotez, które można by było udowodnić lub odrzucić, realizując opisane cele pracy.

Przed przystąpieniem do badań Doktorant dokonał walidacji metody pomiarowej, co dość poprawnie zostało opisane w rozdziale 6. i niewątpliwe jest zaletą tej pracy. Jednakże pewnym mankamentem rozprawy jest dość nieprecyzyjny język; w tym używanie terminów, które nie są prawidłowe, jak np. „moc iradiacji lasera”, albo „ekspozycja wiązki lasera na badany obiekt” czy „moc obiektu 10x”.

Następny rozdział 7. zawiera obszerny raport z przeprowadzonych badań obrazowych kości szczurów i rejestracji widm autofluorescencji w zakresie długości fali 400-700 nm,

pozyskanych z obrazu po wzbudzeniu emisji falą o długości 404 nm. Wyniki tych badań obszernie przedyskutowano w rozdziale 7.5, wskazując, iż kość stale się rozwija aż do momentu osiągnięcia dojrzałości, niezależnie od zastosowanej prenatalnej terapii antyretrowirusowej zydowudyną. Ponadto w drugim tygodniu życia szczurów przez matki leczone lekiem antyretrowirusowym, dochodzi do wzmocnienia syntezy białek, wzrostu aktywności koenzymów, co z kolei może prowadzić do przedwczesnego procesu modelowania przestrzennego i zwiększonej ilości kolagenowych wiązań poprzecznych.

Rozdział 8. dotyczy obrazowania za pomocą mikroskopu konfokalnego chrząstki ludzkiej. Badania przeprowadzono celem oszacowania wzajemnej biokompatybilności zdrowej ludzkiej chrząstki pochodzącej z obszaru nosa, krtani, ucha i stawu kolanowego. Biozgodności tych chrząstek badano za pomocą mikroskopii konfokalnej oraz spektrofluorymetrii macierzy zewnątrzkomórkowej. Nie podano jednak, w jaki sposób w tym przypadku uzyskano widma autofluorescencji badanych chrząstek. Badania obrazowe wykazały różnice strukturalne pomiędzy badanymi chrząstkami i różną liczebność chondrocytów.

Analiza widm autofluorescencji pokazała, że cechą wspólną tych widm jest położenie maksimum autofluorescencji przypadające na 475 nm. Jednakże zaobserwowano także różnice w intensywności sygnału, największe w paśmie 420 – 475 nm, co oznacza różną zawartość endogennych fluoroforów.

### **Ogólna ocena merytoryczna pracy i osiągnięć stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora**

Ogólnym celem rozprawy, jaki wyznaczył sobie Doktorant, było sprawdzenie czy ekspozycja na lek antyretrowirusowy w okresie prenatalnym wpływa na rozwój kości szczurzych niemowląt. Drugim celem było oszacowanie wzajemnej biokompatybilności zdrowej chrząstki ludzkiej pobranej z obszaru nosa, krtani, ucha i stawu kolanowego do celów rekonstrukcji laryngologicznych. W opisie brakuje jakiegoś wyjaśnienia, dlaczego wybrano dwa raczej odległe cele badań czy też przykładowo obszerniejszego wyjaśnienia, że skaningowa mikroskopia konfokalna może wiele wnieść w takie badania, co samo w sobie mogłoby być brakującą hipotezą pracy.

Rozprawa jest w miarę poprawnie zredagowana i dobrze napisana, chociaż pojawiają się błędy językowe, edytorskie, a także niepoprawne sformułowania. Po tytułach rozdziałów występują kropki, co raczej nie jest stosowane.

Brak postawionych hipotez sprowadza skądinąd wartościową pracę do formy

obszerne raportu z przeprowadzonych badań. Praca ma również mocne strony.

Do mocnych stron pracy należy zaliczyć:

1. Różnorodność przeprowadzonych badań i dobre opanowanie techniki pomiarów za pomocą skaningowej mikroskopii konfokalnej i obróbki graficznej zdjęć mikroskopowych.
2. Wykazanie przydatności skaningowej mikroskopii konfokalnej do badania kości i chrząstek bez konieczności stosowania dodatkowych chromoforów.
3. Wykazanie możliwości pozyskiwania widm autofluorescencji preparatów kostnych i chrzęstnych na podstawie badań techniką skaningowej mikroskopii konfokalnej.
4. Wykazanie wpływu prenatalnego oddziaływania zydowuduny na rozwój kości szurzych noworodków.
5. Wykazanie, że badanie widm autofluorescencji tkanki chrzęstnej jest pomocne przy ustaleniu stopnia biokompatybilności różnych chrząstek.
6. Rzetelna analiza wyników, w tym analiza statystyczna.

Słabe strony pracy związane są z następującymi kwestiami:

1. Brak hipotez badawczych.
2. Nieprawidłowe określenia niektórych wielkości fizycznych.
3. Brak dokładniejszych danych na temat obróbki zdjęć.

Wspomniane wyżej usterki nie wpływają jednak specjalnie na ogólnie pozytywną ocenę pracy.

Spodziewam się, że w trakcie obrony, zostaną wyjaśnione pewne niejasne kwestie, a mianowicie:

W jaki sposób na obrazach zliczano obiekty charakterystyczne dla danej tkanki: przestrzenie międzybeleczkowe i jamki komórek kostnych na powierzchni preparatu tkanki kostnej oraz chondrocyty i grupy izogeniczne w tkance chrzęstnej. Przydałaby się też definicja „grupy izogenicznej”.

Czy koliste regiony zainteresowania ROI w płaszczyźnie konfokalnej wyznaczone były ręcznie czy automatycznie? W jaki sposób wybierano wspomniane w pracy „miejsca o najbardziej jednorodnej widocznej emisji”? Jaka jest powtarzalność i dokładność takiego wyboru?

W jaki sposób można by sformułować hipotezy badawcze w rozprawie? Jaki problem

naukowy, który w pracy został rozwiązany, Doktorant uważa za najistotniejszy?

### **Wnioski końcowe**

Recenzowana rozprawa bardzo dobrze ilustruje znaczenie badań podstawowych i laboratoryjnych w medycynie, wskazując na rolę fizyków i inżynierów na tym polu. Całość rozprawy świadczy o dobrej wiedzy Doktoranta w zakresie tematyki pracy.

Uważam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania wspomniane w regulujących te kwestie dokumentach (*Dz. U. 2018 poz. 1668, art. 186, 187 Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*), Doktorant jest współautorem publikacji w recenzowanym czasopiśmie naukowym o obiegu międzynarodowym (art. 186.1. pkt 3).

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę o dopuszczenie Pana Wojciecha Ciszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. Halina Podbielska