

Katowice, 27.12.2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha CISZKA

zatytułowanej: „Mikrospektroskopowe badania fluorescencyjne tkanki łącznej i jej patologii”.

Procesy chorobowe, ale często również leki stosowane w leczeniu chorób, skutkują zaburzeniami w metabolizmie komórek organizmu co ostatecznie przekłada się na różnego typu patologiczne zmiany w obrębie tkanek i narządów. Standardowo w praktyce klinicznej do oceny zmian na poziomie ekspresji specyficznych mRNA czy kodowanych przez nie białek stosuje się szeroki panel metod biochemicznych i molekularnych. Z kolei zmiany morfologiczne, ale także poziom ekspresji i lokalizację specyficznych białek w tkankach, ocenia się metodami mikroskopowymi. Przygotowanie tkanki do barwienia histochemicznego (immunohistochemicznego) to dość skomplikowany proces obejmujący szereg etapów mających wpływ na ostatecznie uzyskany obraz tkanki. Czy istnieje jednak jakaś alternatywa? W przedstawionej mi do oceny pracy jej autor wyszedł z założenia, że ponieważ szereg obecnych w tkance związków cechuje się zdolnością do autofluorescencji można ocenić różnice pomiędzy tkanką zdrową i patologiczną mierząc różnice w intensywności widm fluorescencji charakterystycznych dla obecnych w danej tkance specyficznych endogennych fluoroforów. W swojej pracy doktorant skoncentrował się 2 rodzajach wysoce wyspecjalizowanej tkanki łącznej, chrząstce i kości. Postawił sobie do realizacji 2 niezależne cele. Pierwszy to ocena wpływu terapii zidowudyną w okresie prenatalnym na rozwój piszczeli noworodków szczurzych. Celem drugim było oszacowanie różnic i podobieństw pomiędzy 4 rodzajami chrząstek ludzkich: nosa, małżowiny usznej, krtani i chrząstki stawowej pod kątem ich wzajemnej przydatności

w autotransplantacji. W obu przypadkach podstawowym narzędziem badawczym był konfokalny mikroskop fluorescencyjny (CLSM) Eclipse Ti-E firmy NIKON®. Do obserwacji mikroskopowych wykorzystano białe oświetlenie transmisyjne, epifluorescencję z lampy PRIOR® w zakresie UV-VIS, jak również oświetlenie laserowe o długościach fali 404, 488 i 544 nm (MellesGriot®) podczas obrazowania konfokalnego.

Pod względem formalnym praca została przedstawiona w formie monografii, która liczy 81 stron i została podzielona na 2 podstawowe części: tzw. Część literaturową -17 stron i Część doświadczalną -40 stron. Podział, moim zdaniem, nie do końca właściwy gdyż rozdział 5. Materiał badawczy i metodyka badań (umieszczony w części literaturowej) z całą pewnością należy już do części doświadczalnej.

Tym niemniej poszczególne rozdziały: 1.-3. wprowadzające w tematykę badań - 9 stron, 4. Cel pracy – 1 strona, 5. Materiał badawczy i metodyka badań – 6 stron, 6. Walidacja metody konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego – 5 stron, 7. Wyniki badania zmian rozwojowych wczesnego osteoidu po prenatalnej aplikacji zidowudyny (wraz z dyskusją) – 27 stron, 8. Wyniki oceny biogodności wybranych chrząstek ludzkich dla potrzeb autotransplantacji otolaryngologicznej (wraz z dyskusją) – 14 stron, 9. Podsumowanie pracy i wnioski – 1 strona, posiadają właściwe proporcje, a ich układ jest logiczny i przejrzysty. Cytowane piśmiennictwo liczące 116 pozycji zostało właściwie dobrane i uwzględnia najnowsze pozycje w omawianej dziedzinie (26 prac z lat 2015-21). Dysertację uzupełnia wykaz podstawowych skrótów stosowanych w pracy, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz 13 czytelnych tabel i 26 ilustracji.

W pierwszych 3 rozdziałach pracy autor w bardzo przystępny sposób opisuje kluczowe dla przeprowadzonych badań zjawisko fluorescencji i metody jej pomiaru, a także przedstawia charakterystykę badanych przez siebie typów tkanki łącznej - kości i chrząstek. Przedstawia także w zarysie problematykę rekonstrukcji w laryngologii z wykorzystaniem różnych typów chrzątki. By uzasadnić wybór zastosowanej w swej pracy metodyki prezentuje także przegląd wybranych badań tkanki łącznej metodą mikroskopii konfokalnej CSLM. Omówione w tej części pracy tematy zarówno

przybliżają czytelnikowi podjętą w pracy problematykę jak i w znacznym stopniu uzasadniają zaplanowane badania.

Przedstawiony w Rozdziale 5. opis materiału badawczego, podział na grupy eksperymentalne jak również szczegółowy opis zastosowanej w pracy aparatury badawczej i metodyki pomiaru (zarówno metody obrazowania jak pomiaru autofluorescencji) jest klarowny i nie budzi zastrzeżeń.

Niezmiernie ważną częścią pracy jest rozdział 6. poświęcony walidacji metody konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego CSLM. Doktorant spisał się tutaj znakomicie rzetelnie sprawdzając i dopasowując liczne parametry i ustawienia używanego sprzętu (konfokalny mikroskop fluorescencyjny Eclipse Ti-E fmy NIKON) co pozwoliło mu ustalić zakresu jego stosowalności w badaniach kości i chrząstek i w rezultacie dokonać odpowiedniej rejestracji widma autofluorescencji badanych próbek.

W części eksperymentalnej wyróżnić można 2 niezależne części. Pierwsza dotyczy badań piszczeli noworodków szczurzych w wieku 7, 14 i 28 dni, których matkom w czasie ciąży podawano lek antyretrowirusowy zidowudynę. Obrazowanie konfokalne fragmentów kości, gdzie autor analizował liczbę przestrzeni międzybeleczkowych, liczbę jamek kostnych, grubość beleczek kostnych oraz grubość macierzy międzyjamkowej wykazało, że podawanie samicom szczurzym zidowudyny skutkuje u ich potomstwa zwiększonym przyrostem macierzy kostnej, szczególnie w pierwszych 2 tygodniach po urodzeniu. Bardzo ciekawe są uzyskane przez autora wyniki pomiarów mikrospektrofluorymetrycznych kości szczurów w badanych grupach wiekowych. Potwierdzają one jednoznacznie występowanie istotnych różnic w przebiegu widma autofluorescencji tkanki kostnej pomiędzy szczurami, których matkom podawano w czasie ciąży lek antyretrowirusowy, a szczurami kontrolnymi dla tych samych grup wiekowych. Różnice te są szczególnie widoczne w drugim tygodniu życia zwierząt gdzie natężenie autofluorescencji w grupie której podawano zidowudynę było niemal 40% większe niż w grupie kontrolnej. Przeprowadzona przez doktoranta dyskusja otrzymanych w tej części wyników badań świadczy, że potrafi on w sposób krytyczny i właściwy interpretować otrzymane dane eksperymentalne konfrontując je z danymi literaturowymi. O znaczeniu i aktualności

wyników otrzymanych w tej części pracy świadczy najlepiej fakt, że zostały już wcześniej pozytywnie zweryfikowane przez niezależnych recenzentów i opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Journal of Fluorescence, 29(5),2019).

Kolejnym zadaniem, którego podjął się doktorant w swojej pracy była ocena biozgodności chrząstek ludzkich izolowanych z różnych narządów (chrząstka stawowa, chrząstka nosa, chrząstka małżowiny usznej i chrząstka krtani) w kontekście ich zastosowania w autotransplantacji laryngologicznej. Uzyskane w recenzowanej pracy obrazy konfokalne chrząstek nie wnoszą nowych informacji odnośnie budowy morfologicznej wymienionych powyżej chrząstek, albowiem zarówno ten aspekt jak również aktywność komórek różnych typów chrząstki i molekularny skład wydzielanej przez nie macierzy pozakomórkowej jest powszechnie znany. Tym niemniej samo potwierdzenie metodą mikroskopii konfokalnej, że użyte w eksperymencie chrząstki zachowują typowy dla nich obraz morfologiczny było ważne ze względu przeprowadzone w kolejnym etapie pomiary spektrofotometryczne. Zarejestrowane widma autofluorescencji macierzy pozakomórkowej badanych rodzajów chrząstek różniły się intensywnością maksimum (przy 475 nm) oraz szerokościami połówkowymi. Obliczenia mediany szerokości połówkowej FWHM pokazały, że widmo chrząstki stawowej było wyraźnie węższe od pozostałych i był to wynik znamieny statystycznie. Pomędzy pozostałymi rodzajami chrząstki różnic (istotnych statystycznie) w wartości FWHM nie odnotowano. Chrząstka stawowa różniła się też znamienie ($p < 0.0005$) od pozostałych chrząstek w całym wstępującym zakresie widma (420-475 nm). Aby uzyskać więcej informacji odnośnie potencjalnej kompatybilności badanych chrząstek autor porównał ich średnie widma różnicowe w odniesieniu odpowiednio do chrząstki stawowej i chrząstki nosowej. W pierwszym przypadku największe rozbieżności pomiędzy porównywanymi parami chrząstek zaobserwował początkowym zakresie widma 420-475 nm, ale także w zakresie 495-570 nm oraz 575-635 nm. Gdy chrząstką referencyjną była chrząstka nosa różnice w emisji z macierzy pozakomórkowej chrząstek także różniły się w zakresie 420-475 nm, natomiast w paśmie powyżej 475 nm dla par chrząstka nosa – chrząstka ucha oraz chrząstka nosa – chrząstka krtani widma różnicowe praktycznie się pokrywały.

Dyskusja wyników w kontekście kompatybilności badanych rodzajów chrząstki jest prowadzona rzeczowo w oparciu o doniesienia prezentujące aktualny stan wiedzy i świadczy o dobrym teoretycznym przygotowaniu doktoranta do prowadzenia badań.

W podsumowaniu swojej pracy autor formułuje 8 wniosków (4 wnioski odnośnie badań kości i 4 wnioski odnośnie badań chrząstki), które wprost wynikają z przedstawionych wcześniej wyników i świadczą o osiągnięciu założonych na wstępie celów.

W trakcie czytania dysertacji napotkałem kilka błędów bądź nieścisłości, które moim zdaniem należałoby wyjaśnić. Dotyczą one przede wszystkim części teoretycznej gdzie autor poświęcił sporo miejsca na charakterystykę badanych przez siebie typów tkanki łącznej. I tak pisząc o kostnieniu na podłożu łącznotkankowym (str.17) autor pisze cyt.: „*Komórki błony mezenchymatycznej przekształcają się w chondroblasty i wydzielają kolagen typu I*”. W rzeczywistości w tym typie kostnienia komórki mezenchymy różnicują się bezpośrednio do osteoblastów nie zaś do chondroblastów. Opisując ogólnie tkankę chrzęstną (str.19) autor stwierdza, że cyt.: „*..budulec tkanki chrzęstnej stanowią włókna kolagenu, najczęściej typu I oraz II ..*”. Sugeruje to, że w macierzy chrząstki dominują włókna kolagenu typu I co nie jest prawdą gdyż typem dominującym jest kolagen typu II. Jedynie chrząstka włóknista (budująca dyski międzykręgowe) zawiera większą ilość kolagenu typu I lecz nie była ona przedmiotem badań w tej pracy. W dyskusji (str. 69) doktorant sugeruje (powołując się na pozycję piśmiennictwa nr 103), że zaniedbywalny wkład elastyny w rejestrowane widmo AF chrząstki stawu spowodowany jest faktem, że cyt.: ”*zlokalizowana jest ona w chondrocytach, które nie były obecne w badanych fragmentach chrząstki*”. Nie mogę zgodzić się z tą interpretacją. Komórki (chondrocyty, ale też fibroblasty czy komórki mięśniówki gładkiej ścian naczyń krwionośnych) syntetyzują jedynie i wydzielają na zewnątrz prekursor elastyny (tropoelastynę), która dopiero w macierzy pozakomórkowej oddziałuje z fibryliną co prowadzi do powstania agregatów elastyny. W macierzy pozakomórkowej chrząstki stawowej (generalnie w chrząstce szklistej) elastyny nie ma bo po prostu nie jest tam produkowana. Na str.64 odnośnie ilustracji 25 autor pisze cyt.: „*odejmując od widma*

chrząstki nosa widma pozostałych typów chrząstek” – powinno być „od widma chrząstki stawowej”.

Pomimo powyższych uwag chciałbym jednoznacznie stwierdzić, iż przedstawioną mi do oceny rozprawę Pana mgr Wojciecha Ciszka oceniam pozytywnie. W swojej pracy wykazał, że stosując wyłącznie metody stricte fizyczne, jak obrazowanie konfokalne i spektrofluorymetria, można pokusić się o ocenę tak skomplikowanych tematów jak wpływ terapii antyretrowirusowej w okresie prenatalnym na rozwój kości u noworodków szczurzych czy szacowanie biozgodności chrząstek ludzkich pochodzących z różnych rejonów ciała w kontekście ich potencjalnego zastosowania w autotransplantacji. Precyzyjne zaplanowanie przedstawionego w ocenianej pracy eksperymentu naukowego, jego skuteczne przeprowadzenie, a przede wszystkim rzetelna analiza otrzymanych wyników i ich interpretacja świadczą, że jej autor jest w pełni dojrzałym pracownikiem naukowym.

Mając na uwadze powyższe uważam, że **recenzowana praca w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 11 Ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz.U. nr 65/90 poz 386)** i niniejszym wnioskuje do Wysokiej Rady Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Ciszka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Prof. dr. hab. n. med. Ryszard Wiaderkiewicz