

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Grażyny Palczewskiej pt. "Application of two-photon excitation to study early changes in the retina associated with environmental stress, genetic manipulation and drug treatment"

Dwufotonowa mikroskopia fluorescencyjna to nowoczesna technika badawcza mająca potencjalne zastosowanie w naukach biomedycznych jak również technicznych. Ideę dwufotonowej fluorescencji opisała już w 1931 r Maria Göppert – Mayer w swej pracy doktorskiej 1931 roku a potwierdzona została doświadczalnie przez Kaisera i Garreta w roku 1961. Natomiast praktyczną realizację dwufotonowej mikroskopii skaningowej zawdzięczamy naukowcom z Cornell University (Denk W., Strickler JH., Webb WW „*Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*” Science, 1990; 4951(248): 73–6). W mikroskopii dwufotonowej wykorzystuje się fakt, że dwa fotony o niższej energii z zakresu widma 700-1000 nm, zaabsorbowane jednocześnie przez fluorofor mogą wywołać jego emisję w zakresie światła widzialnego, co jest korzystne dla badania układów biologicznych ze względu na obniżoną fototoksyczność przy lepszej zdolności do penetracji próbki i zwiększonej rozdzielczości obrazowania.

Ostatnio pojawia się coraz więcej prac dotyczących doskonalenia systemów fluorospektroskopii wzbudzonej dwufotonowo i obrazowania dwufotonowego oraz możliwości ich wykorzystania w medycynie, farmacji jak również w przemyśle. Tematyka pracy doktorskiej, której głównym celem było zastosowanie metod wzbudzenia dwufotonowego do badania wczesnych zmian w siatkówce oka w odpowiedzi na stres środowiskowy, manipulacje genetyczne i farmakoterapię, bardzo dobrze wpisuje się w najnowsze trendy badawcze w tej dziedzinie.

Przedstawiona mi do recenzji praca została napisana w języku angielskim, natomiast dołączono do niej streszczenie w języku polskim. Jej zawartość składa się ze wstępu

poprzedzonego spisem skrótów i oznaczeń stosowanych w rozprawie, celu i tez pracy oraz omówienia przeprowadzonych badań i dyskusji wyników zawartych w 6 wybranych, naukowych artykułach zamieszczonych w pracy. Załączone artykuły są ściśle związane z tematem pracy doktorskiej i zostały opublikowane w ostatnich pięciu latach (2010 -2015) w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu z wysokim IF (w tym np. Nature Medicine; IF=27,363).

We wstępie przedstawiono stan wiedzy, oparty na najnowszej literaturze, dotyczący biochemicznych reakcji odpowiedzialnych za proces widzenia w tzw. cyklu retinoidowym, oraz nowoczesną nieinwazyjną metodę multifotonowego (dwu- i trójfotonowego) obrazowania fluorescencyjnego, które mogą być wykorzystane do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów odpowiedzialnych za proces widzenia a także do diagnostyki chorób degeneracyjnych siatkówki takich jak choroba Stargarda czy zwyrodnienie plamki żółtej (AMD–Age-related Macular Degeneration) oraz ich zapobiegania i leczenia.

W ramach pracy doktorskiej doktorantka postawiła sobie zasadniczo dwa cele, według mnie. Pierwszy biotechnologiczny cel polegał na modernizacji aparatury opartej na dwufotonowej fluorescencji celem zoptymalizowania metodyki badania zmian strukturalnych i funkcjonalnych siatkówki *ex vivo* i *in vivo*, przy czym szczególnie ważnym było przystosowanie układu pomiarowego do badania oka żywych organizmów. Drugim celem było otrzymanie możliwie dokładnej charakterystyki fizykochemicznej cyklu retinoidalnego w funkcji wieku badanych obiektów, w odpowiedzi na stres środowiskowy, na modyfikacje genetyczne oraz stosowanie farmaceutyków we wczesnym stadium degeneracji siatkówki przy pomocy udoskonalonego mikroskopu dwufotonowego.

W pracy” Endogenous Fluorophores enable Two-Photon Imaging of the Primate Eye opublikowanej w Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014; 55(7): 4438 zostały przedstawione wyniki pomiarów siatkówki i nabłonka barwnikowego z uwzględnieniem dwóch rodzajów retinoidów metodą dwufotonowego obrazowania. Na uwagę zasługują dokładne badania wewnętrznych i zewnętrznych segmentów pręcików i czopków fotoreceptorów w oczach naczelnych (małp i ludzi) wykazujące ich zróżnicowanie. Widma fluorescencyjne z zewnętrznych segmentów potwierdziły emisję z wyraźnym maximum w okolicy 480 nm charakterystyczną dla retinolu i ich estrów a widma fluorescencyjne z wewnętrznych segmentów ujawniły dodatkowy wkład od NADHP. Skład retinoidów został potwierdzony w badaniach analitycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLCP) i spektrometrii masowej. Przeprowadzone badania udowodniły, że mikroskopia dwufotonowa TPF może być przydatna w monitorowaniu cyklu widzenia

retinoidowego nie tylko na modelu zwierzęcym myszy ale także w oczach ludzi w funkcji wieku jak i po zastosowaniu różnych czynników fizycznych (np. wzmożonym naświetlaniu).

Dokładna procedura obrazowania barwnikowego nabłonka i siatkówki żywej myszy przez źrenice oka została przedstawiona w artykule opublikowanym w *Nature Medicine*, 2014;20(7):785. Badania *in vivo* wysokiej rozdzielczości były możliwe dzięki optymalizacji mikroskopii dwufotonowej polegającej na zintegrowaniu lasera tytanowo-szafirowego z modułem kontrolującym dyspersję opóźnienia grupowego (GDD) i wprowadzeniu zaawansowanej optyki adaptywnej (rys.1 w omawianym artykule) i modyfikacji algorytmu zbierania danych, co przyczyniło się do identyfikacji retinozomów i produktów kondensacji w nabłonku barwnikowym. Następną innowacją było wprowadzanie specjalnego obiektywu peryskopu, szczególnie przydatnego w badaniu *in vivo*, gdyż wyeliminował on konieczność używania grubej, spłaszczonej soczewki kontaktowej, szczególnie ważne w przypadku większych żywych obiektów (*Biomedical Optics Express*, 2015; 6(9): 3352).

Ciągłe udoskonalanie dwufotonowego obrazowania mikroskopowego prowadzi do uzyskiwania coraz więcej informacji o endogennej jak również egzogennej, indukowanej genetycznie lub farmakologicznie fluorescencji siatkówki i nabłonka barwnikowego odzwierciedlającej retinoidalny proces widzenia w stanie normy i patologii, co ma bardzo duże znaczenie z punktu widzenia okulistyki w ochronie zdrowia. Badania wykonane w omawianych pracach umożliwiły m. innymi uzyskanie obrazów nabłonka barwnikowego u żywych myszy $Abca4^+Rdh8^+$ z pigmentacją oraz myszy typu albinos $Rpe65^+$ i ujawniły różnice w charakterystykach spektralnych fluoroforów ich nabłonek barwnikowych.

W mojej opinii bardzo interesującą jest praca opublikowana w *Nature Medicine*, 2010; 16(12): 1444-9, w której stosując dwu- i trójfotonowe obrazowanie mikroskopowe dokładnie przebadano fluorescencję nabłonka barwnikowego myszy DKO z podwójnym nokautem genu kodującego RDH8 w porównaniu z nabłonkiem myszy dzikiej (WT). Wykazano nadmierną akumulację produktów kondensacji retinoidów charakteryzujących się maksimum emisji w okolicy 565 nm dla siatkówki myszy DKO podczas gdy maksymalna emisja charakterystyczna dla prawidłowej transformacji endogennych fluoroforów biorących udział w retinoidalnym cyklu widzenia w myszach WT występowała w okolicy 480 nm. Ponadto zaobserwowano, że wzrost fluorescencji długofalowej postępuje wraz z wiekiem badanych mysz obu typów choć z różnym nasileniem i efekt ten może być wykorzystywany w badaniu wczesnych zmian molekularnych związanych z degeneracją plamki żółtej (AMD) i innymi defektami metabolizmu retinoidów, co z powodzeniem rozwinięto w pracach z następnych lat (2014-2015).

W pracy umieszczonej w Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America prześlędzono dokłádnie procesy zachodzące pod wpływem patologicznej ekspozycji na światło (10 000 lux) prowadzące do degeneracji siatkówki, zbieżne z chorobą Stargardta i ADM, na modelu mysz modyfikowanych genetycznie stosując mikroskopię dwufotonową fluorescencji z 3D rekonstrukcją obrazu oraz spektroskopię masową. Badania doprowadziły do odkrycia, że pierwsze objawy patologii związane są ze wzmożoną fluorescencją produktów retinoidów wewnątrz powiększonych nawet trzykrotnie pręcików fotoreceptorów, utratą zmienionych fotoreceptorów a dopiero w następnej kolejności tworzeniem się fluoryzujących w zakresie długofalowym (około 600 nm) granulek w nabłonku barwnikowym siatkówki, w wyniku czego następuje zanik funkcji widzenia potwierdzony za pomocą elektroretinografii.

Cykl prac stanowiących podstawę doktoratu zamyka obszerna (14-stronicowa) praca o charakterze klinicznym opublikowana w The Journal of Clinical Investigation, 2015; 125(7): 2781, w której do oceny efektów farmaceutyków stosowanych w zapobieganiu i leczeniu degeneracji siatkówki zastosowano m. innymi również dwufotonową mikroskopię fluorescencyjną. Badania potwierdziły, że leki zawierające grupy aminowe takie jak *apocynina*, *retinylamina* i *emixustat* skutecznie chroniły fotoreceptory przed indukowaną światłem degeneracją siatkówki w przeciwieństwie do *MB-002*.

Pod względem redakcyjnym zawartość przedstawionej mi do recenzji pracy jest perfekcyjna. Godna podkreślenia jest logicznie wybrana sekwencja artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o wysokim IF potwierdzającym wysoką wartość merytoryczną przeprowadzonych badań. Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora wynosi 84,713 co odpowiada 275 w punktacji MNiSW. W trzech pracach mgr inż. Grażyna Palczewska jest pierwszym autorem, co świadczy o jej decydującym wkładzie w powstanie tych publikacji, w jednej jest drugą autorką przy jednoczesnym zaznaczeniu o jej takim samym wkładzie w publikacje jak pierwszy autor. Do publikacji załączone są oświadczenia większości współautorów o ich udziale w powstawaniu publikacji. Szkoda jednak, że nie ma oświadczeń np. Marcina Golczaka, osoby której nazwisko powtarza się w 4 publikacjach wśród początkowych autorów.

Jeśli zaś chodzi o stronę językową pracy to trudno jest mi ocenić styl i poprawność języka, w którym została napisana praca, gdyż język angielski nie jest moim ojczystym językiem ale stwierdzam, że praca jest zrozumiała, a założony cel został osiągnięty. W

streszczeniu w języku polskim zauważyłam pewne niedociągnięcia ale one nie wpływają na merytoryczną wartość pracy, którą oceniam wysoko.

Z życiorysu dołączonego do pracy i spisu 22 publikacji z lat 2010 -2016 wynika, że zainteresowania mgr inż. Grażyny Palczewskiej, od co najmniej 10 lat, wyraźnie skupiały się na badaniu procesów biologicznych w oku metodą obrazowania przy pomocy mikroskopii dwufotonowej fluorescencji. Optymalizacja systemu dwufotonowego obrazowania oraz badania dotyczące cyklu retinoidowego widzenia i procesów degeneracji siatkówki oraz wpływu stosowania farmaceutyków na procesy komórkowe w siatkówce znalazły odzwierciedlenie w 22 artykułach tematycznych opublikowanych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, przy czym 6 z nich zostało wybranych jako podstawa do ubiegania się o tytuł naukowy doktora. Generalnie uważam, że zaprezentowane w nich wyniki badań są nowatorskie i mają aspekt aplikacyjny a Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną w danej dyscyplinie naukowej i umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W konkluzji, mogę stwierdzić, że Kandydatka spełnia z nadmiarem ustawowe wymogi stawiane osobom ubiegającym się o tytuł naukowy doktora zgodnie z ustawą z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ((Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami, Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767, (Dz.U.2016.0882)) oraz z rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Grażyny Palczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

