



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszcki

Przewodniczący Rady Wydziału
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Uniwersytet Wroclawski
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a
50-383 Wroclaw

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Grażyny Palczewskiej „*Application of two-photon excitation to study early changes in the retina associated with environmental stress, genetic manipulations and drug treatment*” (pol. *Zastosowanie metody wzbudzenia dwufotonowego do badania wczesnych zmian w siatkówce oka w odpowiedzi na stress środowiskowy, manipulacje genetyczne i farmakoterapię*)”

Rozprawa doktorska mgr inż. Grażyny Palczewskiej „*Application of two-photon excitation to study early changes in the retina associated with environmental stress, genetic manipulations and drug treatment*” jest zestawem prac przedstawiających opis wykorzystania technik z pogranicza biochemii, biofizyki, biologii i inżynierii biomedycznej do badania procesów biologicznych zachodzących w oku. W szczególności chodziło o udoskonalenie systemu obrazowania z wykorzystaniem fluorescencji dwufotonowej do badania struktury oka dla celów diagnostyki degeneracji siatkówki, jak również do śledzenia postępu jej leczenia, a wreszcie do badań procesów biochemicznych na poziomie molekularnym zachodzących w komórkach oka. Co interesujące i ważne praca została przygotowana w laboratoriach działu rozwoju urządzeń biomedycznych firmy Polgenix (Cleveland, USA), nastawionej na odkrywanie leków związanych z różnymi formami ślepoty i opracowywaniem nowoczesnych technik obrazowania struktur oka we współpracy z Wydziałem Farmakologii Case Western Reserve University w Cleveland, kierowanym przez prof. Krzysztofa Palczewskiego. Doktorantka kieruje od 10-ciu lat działem rozwoju urządzeń biomedycznych w firmie, a całą karierę zawodową pracowała na stanowiskach inżynierskich.

Rozprawa została zgłoszona do obrony jako zestaw sześciu monotematycznych publikacji, opublikowanych w znakomitych czasopismach (dwie w *Nature Medicine* IF=27,36, po jednej w *J. Clinical Investigation* IF=13,26, *PNAS* IF=9,67, *Biomedical Optics Express* IF=3,65 i *Investigative Ophthalmology&Visual Science* IF=3,40). Z wyjątkiem jednej, opublikowanej w 2010 roku, wszystkie pozostałe pochodzą z lat 2014-



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszycski

2015. Co więcej pełny dorobek naukowy doktorantki przedstawiony we *Wstępie* obejmuje 22 publikacje (H=11; łączny IF=165,92), 6 patentów, 5 grantów (w czterech była głównym wykonawcą). W 2016 roku ukazało się sześć kolejnych publikacji, których współautorką jest doktorantka. W czterech z sześciu wybranych prac, w tym obu z *Nature Med.*, pani Palczewska jest pierwszą autorką, w jednej ostatnią i w jednej - jedną z kilkorga współautorów.

Na manuskrypcie rozprawy składa się anglojęzyczny opis stanu wiedzy (10 stron), wypunktowany cel pracy, wraz z założonymi tezami wstępnymi (2 strony), wybór najważniejszych eksperymentów i wniosków z kolejnych sześciu publikacji (23 strony), opis w punktach wkładu własnego (3 strony), wnioski końcowe w kontekście założonych celów, 78 pozycji literaturowych i *Podsumowanie* (5 stron). Do tekstu dołączone jest polskojęzyczne streszczenie (8 stron) i reprodukcje wszystkich publikacji.

Zapoznanie się z treścią całości wskazuje, że opublikowane prace bez wątpliwości można potraktować jako zbiór tematycznie spójnych artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, co wypełnia art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), zgodnie z którym „rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru publikacji opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki (...)”. Faktyczny, bardzo znaczący, udział doktorantki jest opisany w osobnym podrozdziale, a także wynika z dołączonych na piśmie 18-tu oświadczeń współautorów.

Moja bardzo wysoka ocena rozprawy wynika z faktu realizacji wszystkich celów zarówno praktycznych, jak i naukowych tj. 1) budowy aparatu do charakterystyki zmian struktury i funkcji siatkówki wywołanych stanami patologicznymi. Jako biochemikowi trudno wypowiedzieć mi się, o szczegółach technicznych urządzenia, ale doceniam jego możliwości aplikacyjne; 2) opracowaniu metodologii analizy sekwencji zdarzeń związanych z degeneracją siatkówki i 3) analizie wpływu leków na fluorescencję charakterystyczną dla wczesnych symptomów śmierci fotoreceptorów wraz z identyfikacją składu pojawiających się złożeń w siatkówce.

W pierwszej publikacji „*Endogenous Fluorophores Enable Two-Photon Imaging of the Primate Eye*” Autorzy udowadniają, że przy wykorzystaniu wzbudzenia dwufotonowego w mikroskopie fluorescencyjnym można rejestrować obrazy fotoreceptorów oraz nabłonek siatkówki u ludzi. Jako kontrole wykorzystano ekstrakty z oczu małp, a wyniki skonfrontowano z danymi dla myszy, u których zawartość retinoidów była wcześniej znana. Co interesujące Doktorantce udało się rozdzielić i



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszyci

oznaczyć ilościowo izomery *cis*- i *trans*- retinoidów przy pomocy połączonych technik HPLC i MS co nie jest łatwe biorąc pod uwagę małe różnice mas czasteczkowych. Oczywiście na koniec lektury publikacji narzucało się pytanie o możliwości stosowania TPM w badaniach *in vivo*.

Kolejna praca „*Noninvasive two-photon microscopy imaging of mouse retina and retinal pigment epithelium through the pupil of the eye*” stanowi raport techniczny, w którym opisano urządzenie do badań nabłonka barwnikowego i siatkówki żywych myszy. Wykorzystując technikę TPM i fakt, że estry retinylu wykazują znaczącą wydajność kwantową fluorescencji udało się po raz pierwszy otrzymać obrazy intermediatów cyklu retinoidowego w pigmentcie nabłonka barwnikowego żywych ssaków, jak również obrazy TPM fotoreceptorowych komórek pręcikowych, a wreszcie scharakteryzować patologiczne i wywołane lekami, formy fluoryzujące w siatkówce. Ponownie, do szczegółów technicznych nie odnoszę się, ale możliwości urządzenia budzą moje najwyższe uznanie.

Publikacja „*Periscope for noninvasive two-photon imaging of murine retina in vivo*” ma nieco podobny charakter do poprzedniej. Autorzy opisali zalety „swojego” obiektywu peryskopowego montowanego na mikroskopie dwufotonowym, który służył do obrazowania dna oka. Przedstawiono zdjęcia nabłonka barwnikowego u myszy typu dzikiego i mutantów pozbawionych jednego z kluczowych enzymów cyklu retinoidowego- izomerazy/hydrolazy retinoidowej (RPE65). Widma emisji z wzbudzenia dwufotonowego wykazywały istotne różnice wynikające z obecności różnych fluoroforów, co dało asumpt do wniosku o wyższości opisanego rozwiązania technicznego nad obrazowaniem z wykorzystaniem prostszego obiektywu.

Kolejna publikacja z cyklu tzw. raportów technicznych „*Noninvasive multiphoton fluorescence microscopy resolves retinol and retinal condensation products in mouse eyes*” opisuje wyniki obrazowania wielofotonowego dla celów identyfikacji różnych cech fluorescencji nabłonka barwnikowego myszy z podwójnym nokautem genu dehydrogenazy retinolowej 8. Ponownie pokazano różnice w widmach emisji nabłonka myszy typu dzikiego i zmutowanej genetycznie. Co więcej wynik przypisano akumulacji produktów kondensacji retinoidów, a ostateczne wnioski potwierdzono pomiarami biochemicznymi (HPLC) składu retinoidów, co z kolei można było uznać za ostateczny dowód na przydatność nieinwazyjnej mikroskopii wielofotonowej do diagnostyki wielu chorób oczu. Wykorzystanie zakresu IR (700-900 nm) jest wyraźnie korzystniejsze niż w przypadku wzbudzenia jednofotonowego, z punktu widzenia dobra pacjenta, ale też



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryszycycki

możliwości diagnostycznych, które sięgają głębiej w struktury oka co powala na analizę podstaw molekularnych opisywanych procesów.

Piąta z wybranych publikacji „*Two-photon microscopy reveals early rod photoreceptor cell damage in light-exposed mutant mice*” dotyczy właśnie identyfikacji procesów zachodzących pod wpływem nadmiernej ekspozycji na światło, której skutki mogą być podobne do wywołanych przez choroby oczu jak choroba Stargarda czy zwyrodnienie plamki żółtej. Tym razem za największe osiągnięcie Doktorantki uważam odkrycie, że pręciki jako pierwsze ulegają degeneracji. Do powyższego wniosku autorzy publikacji doszli wykorzystując m.in. myszy z nokautem genu transportera kasety wiążącej ATP (ABCA4), którego mutacje powodują chorobę Stargarda. Uważam, że ta praca, która łączy techniki obrazowania, modelowanie trójwymiarowe z klasycznymi metodami biochemii i biologii molekularnej, jest najbardziej zaawansowaną próbą opisu relacji struktura-funkcja siatkówki oka. Opisano sekwencję zdarzeń indukowanych światłem, podczas których dochodzi do gromadzenia pochodnych retinoidów, rodników tlenowych i wreszcie śmierci komórek fotoreceptorowych co w końcu prowadzi do utraty wzroku.

Ostatnia praca „*Molecular pharmacodynamics of emixustat in protection against retinal degeneration*” stanowi logiczną konsekwencję poprzednich. Autorzy skupili się na wykorzystaniu wcześniej opisanej metodologii TPF do oceny ochronnego wpływu różnych leków na siatkówkę mysich oczu. Okazało się, że trzy z czterech medykamentów ma rzeczywiście odpowiednie działanie podczas gdy MB-002 jedynie ograniczone. Co więcej uszkodzenie światłem siatkówki u myszy jest wywołane jest wywołane całkowicie-trans-retinalem uwalnianym z pigmentów wzrokowych.

Kończąc recenzję tej niezwyklej rozprawy doktorskiej i biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie publikacje przeszły przez sito profesjonalnych recenzentów renomowanych pism, mam kilka uwag/pytań do przedyskutowania podczas obrony:

- 1) Co Autorka uważa o ewentualnych niefluoryzujących produktach badanych procesów. Jeżeli pojawiają się to co o nich wiadomo, jak można by je zidentyfikować;
- 2) Doktorantka skupiła się raczej na retinoidach, natomiast bezpośrednią przyczyną zaburzeń wzroku mogą być również uszkodzenia białek zaangażowanych w przekazywanie sygnału świetlnego od receptora (rodopsyny) poprzez białka G, cyklazę guanylanową, kanały jonowe do mózgu, jak też enzymów zaangażowanych w cykl retinowy. Wydaje się, że kolejnym krokiem mogłoby być wykorzystanie egzogennych białek



Wydziałowy Zakład Biochemii, Wydział Chemiczny

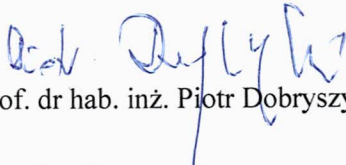
prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki

fluorescencyjnych do monitorowania białkowych składników siatkówki. W związku z tym mam pytanie o badania i możliwości diagnostyczne idące w tym kierunku.

- 3) Na ile opracowana metodyka jest aktualnie rozwijana z punktu widzenia praktyki oftalmologicznej w kontekście stosowania *in vivo* u ludzi, miniaturyzacji, ograniczenia ceny.

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Grażyny Palczewskiej zawiera ogromny materiał eksperymentalny, oparty na ważnych wynikach przeprowadzonych przez siebie badań naukowych, wymagających od eksperymentatora dużej wiedzy z zakresu mikroskopowych technik obrazowania oraz z zakresu biologii komórkowej. Wartość wyników łączy się nie tylko z zaproponowaniem nowej metodologii TPM badania uszkodzeń siatkówki oka, oraz przedstawieniem prób jej zrozumienia, ale przede wszystkim, wnosi do arsenału metod eksperymentalnych bardzo ważne podejście, które może być wykorzystane w leczeniu chorób wzroku. Praca stanowi przykład efektywnego wykorzystania współpracy firma-uczelnia. Co ważne, badania wpisują się w tematykę doświadczeń zespołu promotorów pracy, co stanowi świetny punkt wyjścia do wspólnych projektów naukowych.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Grażyny Palczewskiej spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną i praktyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału o dopuszczenie mgr inż. Grażyny Palczewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego i jeżeli to możliwe o wyróżnienie stosowną nagrodą, gdyż przedstawiony materiał mógłby spokojnie stanowić podstawę bardzo dobrej habilitacji.


prof. dr hab. inż. Piotr Dobryczycki