

Kraków, 23 września 2013

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Ewy Biela

p.t. „Obrazowanie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej z wykorzystaniem nowej sondy fluorescencyjnej Col-F” wykonanej w Pracowni Biofizyki Komórki Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ pod promotorską opieką Prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) odgrywa istotną rolę w wielu różnych procesach fizjologicznych i patologicznych, takich jak np. migracja komórek, przebudowa tkanek w toku gojenia ran lub przebudowa naczyń krwiośnych, ma też ważny udział w rozwoju i przerzutowaniu nowotworów. Wśród makromolekuł ECM ważne miejsce zajmuje kolagen i elastyna. Doktorantka postawiła sobie za cel pracy rozwinięcie nowego sposobu obrazowania kolagenu i elastyny za pomocą nowej sondy fluorescencyjnej Col-F. Ten barwnik fluorescencyjny jest połączeniem fizostygminy (dobrze znany inhibitor AChE) oraz fluoresceiny i był pierwotnie zaprojektowany do znakowania acetylocholinesterazy (AChE) w tkankach, został opisany pod nazwą Ph-F (skrót zapewne pochodzi od dwóch składników tej sondy, nie znalazłem wyjaśnienia tego skrótu w rozprawie doktorskiej). Ta sonda fluorescencyjna okazała się jednak również nadawać do wizualizacji kolagenu i elastyny i to znalezisko zespołu Prof Dobruckiego opisane wstępnie wcześniej (praca magisterska pani Celejewskiej – Wójcik, cytowana w rozprawie doktorskiej) stanowiło punkt wyjścia do szerszego opisanie przydatności tej sondy do wizualizacji kolagenu i elastyny, co stanowiło przedmiot rozprawy doktorskiej pani mgr Ewy Biela.

W szczególności, celem przedstawionej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu oddziaływania nowej sondy fluorescencyjnej Col-F z kolagenem, sprawdzenie czy występuje oddziaływanie Col-F z innymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, oraz opracowanie nowej metody barwienia włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności kolagenu, z zastosowaniem Col-F jako nowej sondy fluorescencyjnej.

Rozprawa doktorska jest bardzo dobrze napisana, zawiera 139 stron, a jej układ odpowiada ogólnie przyjętym zasadom.

W obszernym 18 stronicowym wstępie doktorantka wyjaśnia przesłanki do podjęcia pracy i szczegółowo opisuje składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak glikozaminoglikany (GAG), proteoglikany, kolageny, elastynę i fibryliny, fibronektynę, lamininy, oraz dość pobieżnie rolę fizjologiczną ECM i metody barwienia białek fibrylarnych ECM takich jak kolagen elastyna. Pierwszą część wstępu czytałem z przyjemnością. Doktorantka bardzo pięknie opisuje np. bogactwo rodziny kolagenów, strukturę kolagenu, jego syntezę i wydzielanie, rolę hydroksylazy prolinowej i lizynowej w potranslacyjnej modyfikacji kolagenu. Wspomina również o chorobach wynikających z zaburzeń struktury kolagenu, elastyny czy fibryliny, takich jak odpowiednio: wrodzona łamliwość kości, zespół wiotkiej skóry, czy zespół Marfana. Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko w celach wyłącznie edukacyjnych dla doktorantki, że na stronie 12 doktorantka wspomina o roli askorbinianu w działaniu hydroksylazy prolinowej, ale nie wspomina o analogicznej roli w przypadku hydroksylazy lizynowej, choć hydroksylazę lizynową opisuje parę linijek niżej. Na stronie 17 dopiero pojawia się informacja o tym, że witamina C jest również reaktywatorem hydroksylazy lizynowej, a nie tylko prolinowej, co ma znaczenie w rozwoju szkorbutu. O ile do pierwszej części wstępu nie mam zastrzeżeń, to odczuwam pewien niedosyt po przeczytaniu części drugiej wstępu. Bardzo zdawkowo potraktowany jest fragment dotyczący fizjologii ECM, oraz ten dotyczący metod barwienia białek fibrylarnych ECM, takich jak kolagen i elastyna. Istnieją liczne metody histochemiczne barwienia kolagenu i elastyny, a temu zagadnieniu poświęcono zaledwie 4 linijki tekstu wstępu. Wymieniono trzy barwienia, które pozwalają zobrazować kolagen (czewień syriuszowa, błękit anilinowy i sole srebra) oraz trzy barwienia, które pozwalają zobrazować elastynę (rezorcyna-fuksyna, orceina, hematoksylina żelazowa). Tymczasem w podręcznikach histologii jest kilkanaście barwień dedykowanych do barwienia kolagenu i elastyny o różnej specyficzności. Barwienia dedykowane do wykazania obecności kolagenu i uważane za stosunkowo specyficzne są następujące: metoda van Gieson'a (kwas pikrynowy i fuksyna kwaśna -

kolagen czerwony), trichrom Masson'a (kolagen wybarwiany jest błękitem aniliny, lub zielenią świetlną), picro Sirius red (kwas pikrynowy i czerwień Syriuszowa - kolagen wybarwia się na czerwono, tło zostaje wybarwione kwasem pikrynowym na żółto). Barwienie solami srebra nie jest dedykowane do barwienia wszystkich typów kolagenu, ale raczej do barwienia włókien retikulinowych, które wybarwiają się na czarno, podczas gdy inny typ kolagenu wybarwia się na brązowo. Istnieje szereg innych barwień, które pozwalają wybarwić kolagen, elastynę i inne białka włókniste i nie są specyficzne dla kolagenu. Niektóre z nich oparte są o błękit metylenowy. Są to takie barwienia np. picro methyl blue (kwas pikrynowy, błękit metylowy - kolagen wybarwia się na niebiesko, ale i elastyna może wybarwiać się podobnie), PTAH (kolagen wybarwia się na czerwono-pomarańczowo, elastyna na pomarańczowo- brązowo). Nawet w standardowym barwieniu hemotoksylina-eozyną grube włókna kolagenowe wybarwiają się na intensywnie różowy kolor, a elastyna się nie barwi. Z kolei jeżeli chodzi o barwienia specyficzne dla elastyny, doktorantka ma rację, należą do nich barwienie rezorcyno-fuksyną lub orceiną (kilka różnych metod wykorzystuje ten barwnik np. met. Unny), hematoksylina żelazista Verhoeffa (elastyna wybarwia się na czarno, barwienie regresywne). Co istotne, istnieją również barwienia, które pozwalają wybarwić i zróżnicować kolagen i elastynę, takie jak np. pentachrom Movat'a (elastyna - na czarno, kolagen na żółto). Nawiasem mówiąc w tej metodzie kolagen wybarwia się nalewką spirytusową z szafranem. Również kombinacja barwień orceiny i trichromu Masson'a lub orceiny i MSB pozwalają na wybarwienie kolagenu i elastyny. Tę ostatnią metodę barwienia (orceina i MSB – z ang. Martius, Scarlet and Blue, od trzech barwników: żółty - Marius yellow, czerwony - Cristal scarlet, niebieski - Methyl bluel), w którym elastyna jest prawie czarna, a kolagen niebieski stosujemy ostatnio w badaniach histologicznych w JCET, aby ocenić jakościowo i ilościowo zmiany zawartości kolagenu i elastyny w blaszce miażdżycowej, które determinują stabilność blaszki miażdżycowej. Oczywiście barwienia histologiczne, a widać z przytoczonych przykładów że jest ich sporo dla wybarwiania kolagenu i elastyny, choć w miarę specyficznie, to pozwalają jedynie na barwienie tkanek utrwalonych, nie pozwalają na barwienie tkanek żywych. Nie pozwalają również na rozróżnienie typów kolagenów, co

może być istotne w patologii chorób. Do tego konieczna jest immunohistochemia. Szerszego omówienia tych zagadnień zabrakło mi we wstępie, a są one bardzo blisko związane z tematyką pracy, bo dotyczą obrazowania kolagenu i elastyny innymi metodami.

Tak więc o ile wstęp stanowi bardzo dobry przegląd podstawowych wiadomości dotyczących ECM, to jednak zagadnienia związane bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej powinny być bardziej szczegółowo omówione. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na jedną drobną pomyłkę. Doktorantka pisze o tym, że heparyna hamuje powstawanie skrzepów - zapewne chodziło jej o to, że hamuje powstawanie zakrzepów, bo mowa o zastosowaniach klinicznych heparyny, a skrzepy powstają pozaustrojowo.

Założenia i cel pracy są sformułowane jasno, bardzo zwięźle i poprawnie. Aby osiągnąć zaplanowany cel pracy, doktorantka posłużyła się właściwie dobranymi metodami dobrze opisanymi w 11 stronicowym rozdziale Materiały i Metody, które obejmują z jednej strony klasyczne metody obrazowania fluorescencyjnego z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej z dobrze dobranymi porównawczymi sondami fluorescencyjnymi w celu lepszego scharakteryzowania obrazów uzyskiwanych przez Col-F, a z drugiej obejmują również modelowanie molekularne. Szczegółowy opis metod świadczy o dobrej znajomości warsztatu metodycznego przez doktorantkę.

Wyniki rozprawy doktorskiej stanowią najobszerniejszą część doktoratu i przedstawione są na ponad 70 stronach rozprawy, na 65 rycinach i w 7 tabelach. Sposób przedstawienia wyników oraz ich opis, choć jest on dość rozbudowany i miejscami przyjmuje też formę dyskusji wyników, nie wzbudza zastrzeżeń recenzenta. Na podkreślenie zasługuje fakt, że doktorantka w wielu różnych układach doświadczalnych badała przydatność i selektywność Col-F do wybarwiania kolagenu i elastyny. Począwszy od izolowanego kolagenu *in vitro* poprzez ludzkie fibroblasty, włókna ścięgna myszy, ścianę aorty myszy, ścianę tętnicy udowej, żyły udowej, ściany naczyń krwionośnych nerki, tkanki mięśniówki szkieletowej, tkankę gładką macicy i otrzewnej trzewna myszy. Doktorantka obrazowała też ECM w płucach, przeponie myszy, jak również nić pajęczą, czy kokony moli woskowych. W niemal wszystkich

tych preparatach doktorantka porównywała barwienie z wykorzystaniem sondy Col-F z wynikami uzyskanymi przez sulforodaminę B (SRB), uznawaną za barwnik wykazujący powinowactwo do elastyny. Na podstawie tak obszernych badań doktorantka udowodniła, że Col-F barwi zarówno kolagen, jak i elastynę, przy czym fluorescencja barwnika związanego z elastyną jest silniejsza. Z kolei sulforodamina B uważana za specyficzną dla elastyny barwi również kolagen, jednak intensywność fluorescencji w połączeniu z elastyną jest wyższa niż w połączeniu z kolagenem. Ciekawą obserwacją doktorantki jest to że Col-F barwi również białka fibrylarne produkowane przez bezkręgowce, spidroinę i fibroinę. Doktorantka wykazała, że Col-F barwi nie pajęczą i kokon moli woskowych. Nawiasem mówiąc ciekaw byłam skąd pochodziły zastosowane w pracy nici pająka i kokony moli woskowych, nie znalazłem nigdzie informacji na ten temat.

Bardzo ważnym uzupełnieniem rozprawy doktorskiej jest modelowanie molekularne, dzięki któremu doktorantka mogła stwierdzić, że Col-F wiąże się z elastyną i kolagenem zarówno za pośrednictwem reszty fluoresceinowej, jak i fizostygmminowej. Z kolei dzięki zastosowaniu techniki FRAP mogła stwierdzić, że wiązanie Col-F z kolagenem i elastyną ma charakter niekowalencyjny. Wartościowym uzupełnieniem rozprawy była analiza wiązania oranżu akrydyny, TMRE czy samej fluoresceiny do kolagenu i elastyny. Dla recenzenta bezsprzecznie najciekawszym rozdziałem wyników jest ostatnia część wyników, w której doktorantka na podstawie uzyskanych wyników biologicznych i modelowania molekularnego przebadanych kilku struktur wzorcowych mogła stworzyć ranking wielu związków pod kątem ich wiązania z kolagenem w porównaniu do Col-F. Analogicznie przeprowadzono analizę *in silico* wielu związków pod kątem ich potencjalnego wiązania z elastyną. Szkoda, że w tej części wyników nie ma zbyt wielu szczegółów, np. na jakiej podstawie wybrano 800 związków, dla których przeprowadzono dokowanie. Szkoda również, że doktorantka nie zbadała chociażby tych kilku związków, które wykazywały wyższe powinowactwo do kolagenów III i I w porównaniu do elastyny, żeby potwierdzić, że przewidywania z modelowania potwierdzą się w badaniach doświadczalnych. Ostatnia część wyników rozprawy doktorskiej jest więc jakby niedokończona i pokazuje ważne

potencjalne perspektywy dalszych badań w kierunku poszukiwań takiego związku, który byłby w przeciwieństwie do Col-F selektywną sondą fluorescencyjną dla kolagenu. W ten sposób rozprawa doktorska otwiera pole do dalszych ciekawych badań.

W bardzo krótkiej, tylko nieco ponad 5 stronicowej, dyskusji doktorantka w zwięzły sposób omawia wyniki swoich badań podkreślając zalety drobnocząsteczkowej sondy fluorescencyjnej dla kolagenu i elastyny, jakim jest Col-F, który szybko penetruje w głąb tkanki, jest nietoksyczny, nie wchodzi do komórek i daje dobrej jakości sygnał fluorescencyjny, nadaje się do barwienia tkanek żywych. Doktorantka dostrzega również jego wady, takie jak jego niespecyficzność i słaba przydatność do obrazowania preparatów utrwalonych.

Rozprawę doktorską kończą wnioski, spis rycin i tabel oraz bibliografia. Wnioski stanowią właściwie powtórzenie najważniejszych wyników rozprawy. Może lepiej byłoby gdyby wnioski były bardziej zwięzłe i stawiały na to, co jest najważniejszym odkryciem tej pracy, a nie stanowiły podsumowania wyników tej pracy.

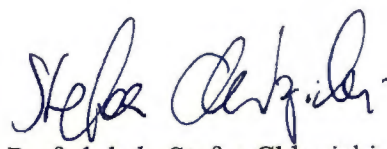
Piśmiennictwo przedstawione jest na ostatnich 9 stronach rozprawy. Z obowiązku recenzenta nadmieniam tylko, że w niektórych pozycjach piśmiennictwa dużymi literami pisane jest tylko pierwsze słowo tytułu czasopisma, a nie wszystkie jego człony (np. Koch M et al., Jandova et al., Kannus P et al.,)

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji starannie przygotowana praca doktorska, okraszona licznymi ładnymi zdjęciami z mikroskopu konfokalnego przedstawia solidną porcję badań, których wyniki uzupełniają naszą wiedzę dotyczącą obrazowania fluorescencyjnego kolagenu i elastyny. W kontekście bogactwa istniejących barwień histologicznych do obrazowania kolagenu i elastyny (o czym piszę omawiając wstęp rozprawy doktorskiej) wydaje się to, że największą zaletą barwienia z wykorzystaniem opisywanej w rozprawie doktorskiej nowej sondy fluorescencyjnej Col-F, jest to że pozwala barwić kolagen i elastynę nieutrwalonej tkankę w ciągu kilku minut. Według mojej wiedzy, przynajmniej jeżeli chodzi o patologię układu krążenia, zmiany struktury elastyny nie dokonują się tak szybko w toku przebudowy tkanek. Znaczne zmiany zawartości i struktury elastyny dotyczą rzadkich

chorób genetycznych, jak np. choroba Marfana. Jednak zmiany dotyczące struktury i ilości kolagenu są dużo bardziej dynamiczne i bardzo ważne w patologii wielu chorób w tym chorób układu krążenia. Opracowanie metody dającej możliwość obserwowania i łatwego ilościowego badania dynamicznych zmian w strukturze i ilości kolagenu w warunkach przyżyciowych *ex vivo* w tkankach bez konieczności utrwalania tkanki, wydaje mi się najważniejszą zaletą nowej metodyki opracowanej przez panią mgr Ewę Biela w ramach jej rozprawy doktorskiej. Ten aspekt nie został w moim odczuciu dość wyraźnie podkreślony w rozprawie doktorskiej, w jej wnioskach, czy w dyskusji. Doktorantka mogłaby się również pokusić o zarysowanie perspektyw dla tego typu badań w jakimkolwiek kontekście biologicznym np. *pro domo sua*, w badaniach nad przebudową ściany naczyń krwionośnych w patologii układu krążenia, a ścianę naczyń krwionośnych doktorantka obrazowała niejednokrotnie w rozprawie doktorskiej. Nawiasem mówiąc ciekaw jestem, czy barwienie z wykorzystaniem Col-F można by zastosować do przyżyciowego barwienia błony podstawnej zawierającej kolagen IV, lub analogiczne podejście badawcze można by zastosować do poszukiwania nowych sond fluorescencyjnych do badania glikozaminoklikanów glikokaliksu śródbłonna, czy też proteoglikanów warstwy podśródbłonkowej, które bardzo dynamicznie reagują na uraz ściany naczynia krwionośnego. Warto dodać że te struktury są bardzo wrażliwe na uszkodzenie przez utrwalenie i nie ma dobrych metod do badania tych struktur przyżyciowo.

Podsumowując, pomimo uwag krytycznych, które przedstawiłem w recenzji, uważam że rozprawa doktorska mgr Ewa Biela stanowi wartościowe, spójne dzieło otwierające pole do dalszych badań i oceniam ją wysoko.

Z przyjemnością pragnę więc stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Ewy Biela spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Stefan Chłopicki