instytut biologii doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN

Prof. dr hab.Stanisław Fabczak

Warszawa, 06.04.2016 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Elizy Zimoląg zatytułowanej „Rola endogennego pola elektrycznego w ukierunkowanej migracji mezenchymalnych komórek macierzystych w procesie gojenia rany"

Prawidłowy przebieg gojenia się ran w różnego typu tkankach organizmów żywych jest precyzyjnie kontrolowanym stanem równowagi pomiędzy dwoma zjawiskami, z jednej strony jest to proces destrukcyjny niezbędny dla pozbycia się zniszczonych elementów tkanki w wyniku urazu mechanicznego lub zaistniałych w niej zmian chorobowych, a procesem naprawczym prowadzącym do całościowego odtworzenia tkanki. Wybrany przez mgr Elizę Zimoląg temat pracy należy do drugiej grupy zagadnień związanych ze skomplikowanym, wieloetapowym procesem naprawczym, w którym udział bierze wiele różnych typów komórek. Są to, oprócz komórek występujących w tkance skórnej i komórek układu odpornościowego, które przedostają się z krwioobiegu do rany, także m. in. mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*), uwalniane ze szpiku kostnego w momencie zranienia. Właściwy przebieg poszczególnych etapów gojenia się ran może zachodzić dzięki zdolności do aktywnej migracji tych komórek w rejonie zaistniałej rany, a także obecności komórek wyspecjalizowanych w naprowadzaniu określonych komórek (np. cytokiny, czynniki wzrostowe, i inne) do miejsca uszkodzenia tkanki.

Istotne znaczenie w ukierunkowywaniu ruchu komórek do miejsca zranienia, oprócz czynników biologicznych, może mieć również pole elektryczne, powstające w rejonie zranienia. Jak dotychczas mechanizm związany z recepcją przez komórki zewnątrzkomórkowych bodźców w postaci pola elektrycznego nie jest szczegółowo poznany i wymagają dalszych intensywnych badań. Dlatego podjęcie przez Doktorantkę próby zbadania roli endogennego

pola elektrycznego w procesie rekrutacji komórek macierzystych pochodzenia szpikowego w trakcie gojenia się rany uważam za próbę bardzo interesującą. Pełne poznanie procesów zachodzących w trakcie gojenia się ran jest ciągle aktualnym wezwaniem dla współczesnej nauki i medycyny.

Tekst rozprawy doktorskiej liczy 126 stron i jego układ jest typowy dla tego rodzaju rozpraw. Wstęp zawierający 22 strony składa się z dwóch wyodrębnionych części, w pierwszej tego rozdziału Doktorantka opisuje zjawisko gojenia się ran powstałych w wyniku zranienia skóry charakteryzując skrótowo etapy tego zjawiska, zwracając uwagę na najistotniejsze procesy zachodzące na poszczególnych jego etapach, a w części drugiej - przedstawia jonowe mechanizmy odpowiedzialne za generację pola elektrycznego w obrębie uszkodzenia naskórka, a także podaje przykłady występowania pola elektrycznego w przypadku zranień w innych rodzajach tkanek. W tej części tekstu przedstawiono także istniejące w dotychczasowej literaturze hipotezy dotyczące możliwych procesów mogących kontrolować ukierunkowanie ruchu komórek w polu elektrycznym. Dalsze rozdziały pracy doktorskiej mieszczące się na ponad 70 stronach maszynopisu, zawierają kolejno cel pracy, zastosowane metody badawcze, uzyskane wyniki oraz ich dyskusję na tle dostępnej literatury dotyczącej przedmiotu badań.

Cel główny badań (w rozbiciu na trzy szczegółowe podtematy), tj. poznanie roli naturalnie występującego pola elektrycznego towarzszącego uszkodzeniu skóry, jako czynnika mogącego w sposób bezpośredni ukierunkowywać wybrane komórki macierzyste do miejsca zranienia, został sprecyzowany w sposób przejrzysty i jednoznaczny, co jak uważam, ułatwiło Doktorantce jego realizację.

W swoich badaniach posłużyła się Ona hodowlanymi komórkami pochodzenia szpikowego (BMAC, *Bone Marrow Adherent Cell*) oraz modelowym układem doświadczalnym, w postaci komory elektrotaktycznej umożliwiającej obserwację/rejestrację pod mikroskopem aktywności ruchowej badanych komórek w wybranym środowisku w obecności stałego zewnętrznego pola elektrycznego. Do rejestracji ruchu komórek wykorzystany został wspomagany komputerowo system umożliwiający precyzyjne określanie wielu parametrów, wśród nich takich jak, całkowita długość trajektorii poruszającej się komórki w określonym czasie, przemieszczenie się komórki, współczynnik efektywności migracji lub średnia wartość cosinusa kierunkowego gamma (γ). W pozostałych doświadczeniach zostały też użyte m.in. metody immunofluorescencyjne, cytometryczne i metody proteomiczne. Analizy przy użyciu tej ostatniej metody były przeprowadzane w Zakładzie Biochemii Fizycznej WBBiB UJ oraz

Pracowni Proteomiki Spektrometrii Ośrodka Biologii Strukturalnej Małopolskiego Centrum Biotechnologii.

Metodyczną stronę pracy oceniam bardzo wysoko, także dobór stosowanych metod oraz ich różnorodność. Opis metod jest klarowny i dokładny, co umożliwia w razie potrzeby, powtórzenie przeprowadzanych w pracy doświadczeń oraz może być bardzo przydatny jako źródło praktycznych informacji dla osób pragnących wykorzystać podobne metody w prowadzonych doświadczeniach.

Wyniki uzyskane w swoich badaniach Doktorantka przedstawiła na 37 stronach maszynopisu, dokumentując je 20 rycinami, 5 tabelami oraz dołączonymi 6 filmami (Suplement). W pierwszym etapie badań, stosując rejestrację zachowania się ruchowego komórek adherentnej frakcji mysiego szpiku kostnego (BMAC) w komorze elektrotaktycznej, Doktorantka wykazała, że charakteryzują się one wyraźną zdolnością do elektrotaksji. Szczegółowa analiza migracji tych komórek w nałożonym zewnętrznym polu elektrycznym prądu stałego ujawniła, że we frakcji tych komórek wyróżniają dwie populacje. Jedna grupa komórek migruje w stronę anody (A-BMAC), natomiast druga - porusza się w przeciwnym kierunku, ku katodzie (K-BMAC). Różnice w reakcji komórek są w wyraźny sposób skorelowane z ich zróżnicowaniem morfologicznym oraz właściwościami funkcjonalnymi, do elektrody ujemnej migrują mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), a do anody - komórki typu hematopoetycznego, tj. makrofagi szpiku kostnego. Kierunek poruszania się komórek MSC do katody w warunkach *in vitro* może świadczyć o ich udziale w procesie gojenia się ran, ponieważ przy zaniku potencjału transepitelialnego w miejscu zranienia, rejon ten stanowi obszar bardziej ujemny względem pozostałego obszaru. Zatem można przypuszczać, że i w warunkach *in vivo* komórki MSC mogą migrować do miejsca uszkodzenia tkanki, tak jak ma to miejsce w komorze doświadczalnej. Obserwacje powyższe mogą oznaczać zatem, że komórki MSC mogą być kierowane do miejsca zranienia nie tylko poprzez czynniki chemiczne, ale także w wyniku zaistnienia pola elektrycznego w rejonie rany.

Z uwagi na powyższe obserwacje logiczną więc konsekwencją było rozdzielenie za pomocą sortera frakcji komórek BMAC na oddzielne, jednorodne populacje komórek po uprzednim immunofluorescencyjnym ich barwieniu, a następnie podjęcie poszukiwań wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych mogących brać udział w regulacji odmiennych odpowiedzi komórek obu rozdzielonych już populacjach komórkowych BMAC na działanie stałego pola elektrycznego. Badając mechanizm ruchu komórek trudno pominąć rolę cytoszkieletu w badanym procesie i dlatego Doktorantka w pierwszym etapie pracy skupiła

dynie fragment Dyskusji odnoszący się do udziału jonów wapnia w badanym procesie (str. 110), gdzie Autorka napisała, że „ Udział mechanizmów zależnych od jonów choć odpowiadałby swoją dynamiką i zaangażowaniem mechanizmów elektrycznych, został jednak częściowo wykluczony (przynajmniej w przypadku jonów wapnia) dla komórek BMAC". A to właśnie wyeliminowanie jonów wapnia w przypadku komórek A-BMAC spowodowało „całkowite zniesienie kierunkowości ruchu komórek A-BMAC w polu elektrycznym" (Wyniki, str. 80). Rozprawę kończy rozdział Podsumowanie, w którym przedstawiono główne osiągnięcia badawcze i konkluzje płynące z przeprowadzonych badań. Cytowana przez Doktorantkę Bibliografia liczy około 160 pozycji, przy czym znacząca liczba cytacji pochodzi z ostatnich lat, co pokazuje, że problematyka pracy jest bardzo aktualna.

Od strony edytorskiej praca jest napisana jasno, ilustracje są bardzo dobrze opracowane, z dokładnymi opisami umożliwiającymi zrozumienie przedstawionych wyników bez wczytywania się w tekst pracy. Doktorantka nie ustrzegła się jednak niezbyt licznych błędów w podawaniu odnośników do brakujących rycin (np. Ryc. 9B, str. 64) lub rycin nieprawidłowo cytowanych (np. Ryc. 11C i 11DE zamiast 12C i 12DE, str. 67), a także na kilku rycinach brak jest pełnego opisu (np. Ryc. 17/18, str. 80/81).

Pod względem stylistycznym tekst też jest poprawny, chociaż Doktorantce nie udało się uniknąć kilku niefortunnych sformułowań, jak np.: komórki przenoszone do probówki wirowniczej (str. 39), komórki migrujące w prądzie (str. 103) lub kierunkowość komórek anodowych (str. 105). Powyższe jak też i inne drobniejsze dostrzeżone w trakcie czytania tekstu uchybienia w żadnym stopniu nie umniejszają niewątpliwych zalet tej pracy.

Podsumowując, uważam, że praca doktorska mgr Elizy Zimoląg, zatytułowana „Rola endogennego pola elektrycznego w ukierunkowanej migracji mezenchymalnych komórek macierzystych w procesie gojenia rany" wnosi do literatury naukowej nowe, interesujące wyniki, które otwierają szerokie perspektywy badawcze na przyszłość. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw, nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wobec powyższego wnoszę do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Elizy Zimoląg do dalszych etapów przewodu doktorskiego.