

Kraków, 10.06.2013



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Piłat, zatytułowanej „Modulatory
effects of melanosoms on expression of heme oxygenase-1 in retinal pigment
epithelium cells under oxidative stress in vitro”**

Zwyrodnienie plamki żółtej (ang. AMD – *adult macular degeneration*) to poważna choroba dotykająca znaczną część coraz dłużej żyjących ludzi. Choroba ta jest główną przyczyną utraty wzroku u osób powyżej 60 roku życia w krajach rozwiniętych. Jej patogenezę jest nadal słabo poznana. Występują dwie postaci AMD: forma sucha, częstsza, dotykająca około 80-90% chorych oraz forma wysiękowa (tzw. mokra). Cechą charakterystyczną formy wysiękowej jest patologiczny rozrost naczyń krwionośnych. Stwarza to szansę leczenia za pomocą terapii anty-angiogennej. Inaczej jest w przypadku formy suchej, której mechanizm rozwoju jest słabo poznany i nie ma na nią skutecznej terapii.

Jednym z czynników przyczyniających się do rozwoju AMD może być zaburzenie produkcji oraz inaktywacji reaktywnych form tlenu, prowadzące do stresu oksydacyjnego. Jego nasileniu sprzyja duże stężenie tlenu, w szczególności w fotoreceptorach segmentu zewnętrznego oraz komórkach nabłonka pigmentowego siatkówki (RPE). Stres oksydacyjny działa niekorzystnie na komórki siatkówki, zatem lepsze poznanie mechanizmów ochronnych – antyoksydacyjnych w komórkach tej części mózgu może być pomocne w znalezieniu sposobów terapii tej nieuleczalnej nadal choroby.

Celem pracy Pani mgr Anny Piłat było zbadanie zmian w ekspresji niektórych genów antyoksydacyjnych w komórkach pigmentowych siatkówki w warunkach zbliżonych do występujących w oku. Jako model eksperymentalny wybrane zostały komórki ARPE-19, ludzkie komórki pigmentowe siatkówki. Hodowane w laboratorium komórki ARPE-19 pozbawione są pigmentu, co ograniczało dotychczas znaczenie takich badań przeprowadzonych na tych komórkach, w których oznaczono ich odpowiedź na stres oksydacyjny. Autorka zdecydowała się przybliżyć warunki naturalne, w których komórki pigmentowe siatkówki zawierają barwnik, badając komórki uzyskane poprzez fagocytozę melanosomów. Jako kontrolne do takich doświadczeń zastosowała ARPE-19, którym podała nieaktywne biologicznie kulki czarnego lateksu. Stres oksydacyjny osiągnęły poprzez jednorazowe traktowanie komórek określonymi dawkami nadtlenu wodoru, względnie poprzez stałą generację tej reaktywnej formy tlenu przy

Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Biotechnologii

Medycznej

Kierownik zakładu

Prof. dr hab. Józef Dulak

ul. Gronostajowa 7

PL 30-387 Kraków

tel. +48 12 664 6375

+48 506 006 083

fax +48 12 664 6918

jozef.dulak@uj.edu.pl

<http://biotka.mol.uj.edu.pl/zbm/>

wykorzystaniu oksydazy glukozy i glukozy. Innym modelem stresu oksydacyjnego było poddanie komórek ekspozycji na światło niebieskie, a także zastosowanie efektu fotodynamicznego z wykorzystaniem czerwieni bengalskiej i ekspozycji na światło zielone. Wpływ stresu oksydacyjnego na żywotność komórek oceniany był poprzez pomiar aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych z wykorzystaniem testu redukcji MTT oraz pomiar fluorescencji jodku propydy. Doktorantka oceniała ekspresję wybranych genów o potencjalnie antyoksydacyjnym działaniu: oksygenazy hemowej-1 oraz -2, peroksydazy glutationowej, katalazy i ferrytyny. Wykorzystała w tym celu technikę Western blot. Doktorantka oceniała także konsumpcję tlenu przez komórki z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Ponadto związane z wiekiem zmiany w melaninie komórek pigmentowych oceniane były poprzez oznaczanie produktów degradacji melaniny (badania wykonane we współpracy z Fujita Health University School of Health Sciences w Aichi w Japonii) i korelowane ze zmianami paramagnetycznymi wykrywanymi za pomocą spektroskopii EPR.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń Autorka wykazała, że fagocytoza melanosomów bądź czarnych kulek lateksowych indukuje przejściowo – w trakcie 24 godzin - ekspresję HO-1 oraz GPX. Podobnie zwiększoną ekspresję powodowało traktowanie nadtlakiem wodoru. Po siedmiu dniach od fagocytozy ekspresja badanych genów była jednak taka sama zarówno w komórkach kontrolnych jak i fagocytyujących. Co ciekawe, fagocytoza melanosomów, ale nie kulek lateksowych chroniła komórki ARPE-19 przed stresem oksydacyjnym powodowanym jednorazową dawką nadtlenu wodoru, czemu towarzyszyła wyższa ekspresja HO-1, ale niższa GPX (rycina 9). Tymczasem ekspozycja komórek na stałe stężenie H_2O_2 , generowane przez oksydazę glukozy powodowała spadek ekspresji HO-1 oraz GPX w komórkach zawierających melanosomy lub kulki lateksu, przy silniejszym efekcie obserwowanym w komórkach ze sfagocytowanymi melanosomami (ryc. 12). Podobnie jak w przypadku ekspozycji na nadtlenek wodoru, także w przypadku stresu spowodowanego sub-lethalnymi dawkami światła niebieskiego komórki zawierające sfagocytowane cząstki, w szczególności melanosomy, wzrost ekspresji HO-1 oraz GPX był częściowo zahamowany (ryc. 15). Natomiast stres oksydacyjny spowodowany reakcją fotodynamiczną indukował wzrost ekspresji HO-1 niezależnie od tego, czy komórki zawierały czy też były pozbawione sfagocytowanych cząstek, chociaż w mniejszym stopniu w komórkach z lateksem lub melanosomami (ryc. 20). Autorka zaobserwowała także, że umiarkowany wzrost ekspresji HO-1 oraz ferrytyny następował w komórkach ARPE-19 w wyniku ekspozycji na niskocząsteczkowe kompleksy żelaza (ryc. 21) a także na melanosomy wzbogacone

w ten pierwiastek (ryc. 22). Ponadto, badając właściwości melaniny autorka wykazała zmiany, które interpretuje jako związane z wiekiem, a spowodowane utlenianiem melaniny.

Za zaletę pracy można uznać zastosowanie modelu zbliżającego w pewnym stopniu warunki, jakie komórki pigmentowe siatkówki napotykają *in vivo*. Wykazanie odmiennego efektu na geny antyoksydacyjne przy jednorazowym traktowaniu nadtlaniem wodoru aniżeli przy ciągłej ekspozycji na ten reaktywny związek pokazuje na kompleksowość reakcji komórek na działanie stresu oksydacyjnego. Wykorzystanie dwóch innych modeli – subletalnych dawek światła niebieskiego i uszkodzenia fotoksydacyjnego pozwala na analizę zmian, jakie mogą zachodzić w komórkach w trakcie stosowanych terapii.

Przedstawiona do oceny praca skonstruowana jest w sposób typowy i składa się z klasycznych rozdziałów. Praca napisana jest w poprawnym języku angielskim, łatwa dla zrozumienia dla czytającego. Zdarzające się pojedyncze błędy językowe (np. „futures” zamiast „features” – str 94; „Heath” zamiast „Health” – str. 51) i składniowe nie mają wpływu na potoczność wyводу i jego lektury. Zarówno we wstępie jak i w dyskusji Autorka poprawnie i sprawnie prowadzi rozważania, co wskazuje na jej orientację w bieżącej literaturze dotyczącej badanego zagadnienia. W pracy brakuje streszczenia w języku polskim.

We wstępie pracy Doktorantka przeprowadza analizę stanu wiedzy na temat potencjalnych mechanizmów rozwoju AMD, koncentrując się w szczególności na roli stresu oksydacyjnego. Ten rozdział pracy przekonuje, że Doktorantka posiadała obszerny zasób wiedzy i na podstawie posiadanych informacji umie formułować hipotezy badawcze. Niektóre informacje zawarte w tej części rozprawy wymagają jednak pewnego wyjaśnienia. Stwierdzenie, że nie ma skutecznej terapii na AMD jest zbyt kategoryczne. Można je odnieść z pewnością do formy suchej tej choroby, natomiast pewne możliwości istnieją w przypadku formy wysiękowej. Związek tej odmiany z patologicznym rozwojem naczyń krwionośnych pozwala bowiem na zastosowanie terapii anty-angiogennej, która okazuje się nie tylko skuteczna w zapobieganiu postępowi choroby, ale także może w niektórych przypadkach znacząco poprawiać stan wzroku chorego. Mowa tutaj w szczególności o zastosowaniu przeciwciał wiążących VEGF, w postaci preparatów ranibizumab czy też bevacizumab, a także aptamerów Macugen. Te zarejestrowane leki są rzeczywiście skuteczne u dużej liczby pacjentów cierpiących na formę wysiękową. Drugim wymagającym wyjaśnienia stwierdzeniem jest informacja o występowaniu trzech genów oksygenazy hemowej (strona 26). W rzeczywistości znane są obecnie

tylko dwa geny – indukowana oksygenaza hemowa -1 oraz konstytutywna HO-2. Gen opisywany jako HO-3 okazał się być pseudogenem.

Rozdział materiały i metody stanowi klasyczne przedstawienie technik i metod stosowanych w pracy. Opis ich jest poprawny i nie wzbudza większych zastrzeżeń. Należy jednak zauważyć, że praca oparta jest na analizie jednego rodzaju komórek z wykorzystaniem pojedynczych technik analizy ekspresji genów. Modyfikacją w stosunku do innych wcześniejszych badań dotyczących ekspresji genów antyoksydacyjnych w komórkach ARPE-19 było zastosowanie komórek obciążonych melanosomami. Odzwierciedla to bardziej warunki *in vivo*, gdyż w zdrowej ludzkiej siatkówce komórki pigmentowe zawsze zawierają melanię. Jako kontroli użyto komórek, w których fagocytowane były biologicznie neutralne kulki lateksowe. Brakuje jednak w pracy weryfikacji wyników za pomocą niezależnych technik (np. w przypadku ekspresji genów - analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym), przeprowadzone analizy mają głównie charakter opisowy, nie mechanistyczny.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę przedstawione są w sposób czytelny i jasny. Ułatwia to śledzenie kolejnych doświadczeń. Wskazują one na opanowanie przez Doktorantkę warsztatu pozwalającego na analizy zmian ekspresji genów antyoksydacyjnych, pomiaru stresu oksydacyjnego i zastosowania technik indukujących taki stres oraz opanowanie metod biofizycznych niezbędnych do analizy procesów zachodzących w strukturach subkomórkowych oka. Obowiązkiem recenzenta jest jednak także wskazanie na niedociągnięcia, które mogą wpływać na interpretację wyników przedstawionych w pracy. Do najważniejszych uwag należą:

1. Analizy Western blot wykonane zostały bez oznaczania ekspresji białka konstytutywnego, np. tubuliny czy aktyny, co jest standardem w takich badaniach. Nakładanie takiej samej ilości białka w przypadku każdej z badanych grup nie jest uznawane za wystarczające.
2. Na wielu rycinach brak analizy statystycznej wyników lub wykazane różnice nie zostały zaznaczone na rycinie. Dotyczy to rycin 7,9,12 (brak zaznaczonych różnic na ryc. 12 A i 12D), 18,19,20,21 (brak zaznaczonych różnic), 22 (podobnie). Ponadto użycie testu t-studenta do analizy zmiennych zależnych nie jest najlepszym rozwiązaniem. Lepsze byłoby zastosowanie testu Anova i analizy post hoc, np. testu Bonferoni.
3. Z ilu doświadczeń pochodzą wyniki pomiaru fluorescencji jodku propydyiny pokazane na rycinie 8? Można wnosić, że z jednego. Czy w takim razie podobnie było w przypadku innych analogicznych analiz (ryc. 10, 13)? Jaka była powtarzalność tych oznaczeń?

4. Na rycinie 9 także nie zaznaczono grup różniących się statystycznie (informacja jest w opisie, ale powinna być bezpośrednio przy danych). Ponadto jakość Western blot dla GPX pokazanego na rycinie 9E jest słaba – dlaczego nie zastosowano innej metody wykrywania ekspresji tego białka? Podobna uwaga dotyczy analizy western pokazanej na rycinach 11E i 12E.
5. Morfologicznie komórki na rycinie 13 wyraźnie się różnią, co może wskazywać na odmienny stopień ich pobudzenia. Analizy żywotności za pomocą fluorescencji jodku propydyliny mogą być niewystarczające. Co Doktorantka rozumie pod stwierdzeniem, że dawka światła niebieskiego była sub-letalna, w sytuacji, gdy w następnym zdaniu stwierdza, że śmiertelność komórek w obecności tej dawki (oceniana za pomocą jodku propydyliny) była minimalna?
6. Rycina 19 – jak wyjaśnić, iż przy stężeniu 400 μ M czerwieni bengalskiej doszło do indukcji HO-1 a nie zaobserwowano takiej ani przy niższych ani przy wyższych stężeniach?
7. Na ryc. 20 autorka pokazuje wyniki doświadczenia, w którym sprawdzała, czy wcześniejsza fagocytoza lateksu bądź melanosomów chroni przed zmianami wywołanymi działaniem terapii fotodynamicznej. Wyniki przedstawione na rycinie 20 (zmiany w ekspresji HO-1) wskazują na zmiany – mniejszą indukcję ekspresji HO-1 oraz GPX w przypadku komórek obciążonych melanosomami lub lateksem (silniejszą dla HO-1 w przypadku komórek z lateksem). Bez analizy statystycznej nie można jednak stwierdzić, czy mają one istotne znaczenie. Na rycinie tej brak także informacji o liczbie wykonanych powtórzeń. Podobnie nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków, jeśli chodzi o ekspresję GPX pokazaną na rycinie 20D oraz 20E.

Zdaniem Autorki, zaobserwowane zmiany wskazują na znaczenie oksygenazy hemowej-1 oraz melaniny w ochronie komórek przed uszkodzeniem oksydacyjnym. Uważam jednak, że jest to przypuszczenie nie poparte w pełni wynikami. Wiadomo bowiem, że oksygenaza hemowa-1 jest enzymem bardzo łatwo indukowanym przez czynniki uszkadzające komórkę. Wykazanie jej udziału w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym wymaga analiz, których w tej pracy zabrakło. Stwierdzenie jedynie zmian w ekspresji genów antyoksydacyjnych pokazuje, że komórki poddane określonemu traktowaniu rzeczywiście narażone były na działanie stresu oksydacyjnego. Natomiast udowodnienie roli tych genów w ochronie komórek wymaga zastosowania technik, które by tego rzeczywiście

dowodły. Np. fakt, że w 24 godziny po fagocytozie cząstek lateksu lub melanosomów obserwuje się przejściowo wzrost ekspresji HO-1 (ryc. 4, strona 56) i że komórki zawierające melanosomy są bardziej odporne na działanie nadtlenu wodoru (str. 61, ryc. 7) aniżeli komórki po fagocytozie lateksu, nie dowodzi, że efekt ten zależy od HO-1. Dla udowodnienia tego konieczne byłyby dalsze eksperymenty. W recenzowanej pracy zabrakło jednak doświadczeń, w których przypuszczalna rola HO-1 (i potencjalnie innych enzymów antyoksydacyjnych) zostałaby zweryfikowana poprzez badania o charakterze mechanistycznym. Dopiero wykazanie, że zahamowanie ekspresji bądź aktywności HO-1 zwiększa wrażliwość komórek na stres oksydacyjny byłoby dowodem na protekcyjną rolę tego enzymu. Dodatkowa weryfikacja powinna ponadto pochodzić z doświadczeń, w których indukowana wcześniej ekspresja HO-1 chroniłaby komórki przed następującym później działaniem stresu oksydacyjnego. W pracy mamy jedynie do czynienia z opisem zjawisk, które mogą, ale nie muszą wskazywać na mechanizmy sugerowane przez Doktorantkę.

Ostatnia grupa doświadczeń, dotycząca analizy zmian w melaninie związanych z wiekiem jest dość luźno związana z najważniejszą częścią pracy. Jakie konsekwencje zaobserwowane zmiany mogą mieć zdaniem Doktorantki dla przebiegu reakcji na stres oksydacyjny w starzejącym się oku?

Po wynikach następuje dyskusja w której Autorka w sposób zwięzły i prosty stara się opisać i wytłumaczyć zaobserwowane zmiany. Rozdział ten ponownie wskazuje na opanowanie przez Doktorantkę tej części warsztatu naukowego, jaką jest krytyczna ocena uzyskanych wyników i ich analiza w świetle wiedzy zgromadzonej dzięki badaniom innych.

Podsumowanie

Przedstawioną do oceny rozprawę można uznać za poprawny opis zmian jakie mogą zachodzić w komórkach pigmentowych siatkówki poddanych działaniu stresu oksydacyjnego. Analizowana praca nie ma charakteru mechanistycznego, może być jednak uznana za przykład odmiennego i w pewnym stopniu nowatorskiego zastosowania modelu komórek pigmentowych siatkówki do analizy zmian mogących zachodzić w trakcie procesów prowadzących do rozwoju zaniku plamki. Doktorantka wykazała w pracy umiejętność posługiwania się metodami badawczymi z zakresu biologii molekularnej i biofizyki, które mogą być przydatne w dalszym poznawaniu procesów degeneracyjnych w oku. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do zrozumienia procesów patologicznych związanych z wiekiem i stanowią podstawę do dalszych badań, w których poznane mogą być mechanizmy

uszkodzeń. Doktorantka wykazała się umiejętnością analizy literatury i interpretacji wyników, potrafi wysuwać hipotezy na podstawie uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

W świetle przedstawionej analizy stwierdzam, że oceniana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii o dopuszczenie Pani mgr Anny Piłat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

