

Recenzja

rozprawy doktorskiej pt. „*Fizykochemiczna charakterystyka mineralizacji struktur kolagenowych*” mgr Sylwii Orzechowskiej

Rozprawa doktorska składa się ze wstępu literaturowego zakończonego celem pracy oraz części doświadczalnej obejmującej metodykę badań oraz i ich rezultaty wraz z dyskusją. Następnie został omówiony model mineralizacji struktur kolagenowych oraz podsumowanie, gdzie również umieszczono jako dodatek - program BmpBinarizer. Rozprawa wraz ze spisem literatury, streszczeniem napisanym w języku polskim i angielskim oraz wykazem skrótów używanych w pracy liczy 97 stron.

We wstępie doktorantka przedstawiła proces mineralizacji fizjologicznej na przykładzie mineralizacji tkanki kostnej i zębów a następnie skupiła się na patologicznej mineralizacji tkanek miękkich tak zwanej kalcyfikacji ekotopowej. Dokładniej opisała dwa modele mineralizacji zastawki aortalnej: biomechaniczny i biochemiczny z uwzględnieniem reakcji zapalnej w tkance. Model biomechaniczny bierze pod uwagę rolę ciśnienia wywieranego na płatki zastawki podczas skurczu i rozkurczu komory serca a drugi model bazuje na dysfunkcji śródbłonna zastawki aortalnej prowadzącej do powstawania zwapnień z udziałem czynników prozapalnych i szlaków sygnałowych białek morfogenetycznych kości (BMP) i Wnt (glikolipoproteiny). W części literaturowej omówiono również krótko proces mineralizacji struktur kolagenowych oraz stenozę zastawki aortalnej i kanału kręgowego.

Celem pracy doktorskiej była fizykochemiczna i morfologiczna analiza depozytów mineralnych w tkankach miękkich na przykładzie stenotycznych zastawek aortalnych i wiązadeł żółtych kręgosłupa (gdy występowała stenozza kanału kręgowego) w porównaniu z próbkami kontrolnymi oraz tkankami zmineralizowanymi fizjologicznie. Ponadto doktorantka podjęła się oszacowania czasu wzrostu mineralizacji w tkankach w prostym modelu opartym na równaniu dyfuzji. Warto zwrócić uwagę na potrzebę takich badań, gdyż patologiczna mineralizacja prowadzi do wielu chorób, które mają wpływ na długość życia człowieka.

Materiał badawczy stanowiły depozyty mineralne zidentyfikowane w płatkach aortalnych (w 30 zastawkach ze stenozą aortalną, 5 zastawek kontrolnych) oraz 24 więzadeł żółtych pozyskanych od pacjentów operacyjnych ze stenozą kanału kręgowego i 9 próbek więzadeł kontrolnych. Materiałem porównawczym podlegającym mineralizacji fizjologicznej były kości beleczkowate wypreparowane z kręgów lędźwiowych pobranych sekcyjnie (6 próbek) oraz 5 zębów uzyskanych w rutynowej ekstrakcji. Próbkę do badań uzyskano w ramach współpracy z Zakładem Biofizyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego i przygotowywano do badań zgodnie z obowiązującymi procedurami.

Badania próbek przeprowadzono kilkoma technikami pomiarowymi z wykorzystaniem mikrotomografii komputerowej (Mikrotomograf SkyScan 1172 wraz z komputerem DELL Precision T5400, pracującym pod systemem operacyjnym Windows 7), spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej (XRF) z użyciem spektrometru Oxford 2000, spektroskopii w podczerwieni z użyciem spektrometru Nicolet 6700 i dyfraktometrii rentgenowskiej z wykorzystaniem dyfraktometru proszkowego X'Pert PRO MPD, które zostały omówione dokładnie w rozdziale 2.2.

Obrazowanie μ -CT tkanki kostnej zmineralizowanej fizjologicznie umożliwiło otrzymanie trójwymiarowej struktury kości beleczkowatej oraz zębiny i szkliwa zębowego wraz z rozkładem gęstości. W przypadku płatek zastawek aortalnych (AV) i więzadeł żółtych (LF) trójwymiarowe obrazy μ -CT umożliwiły zaobserwowanie występowania depozytów mineralnych, ich ilość i rozmiar przy czym ich strukturę ze względu na heterogeniczność trzeba było badać z dużą rozdzielczością - 2 μ m. Analiza XRF pozwoliła na oznaczenie składu pierwiastkowego depozytów mineralnych w badanych próbkach a analiza widm FTIR umożliwiła wyznaczenie parametrów dostarczających informacji o strukturze chemicznej poprzez identyfikacje grup funkcyjnych tzn. grupy fosforanowej i grup amidowych. Ponadto można było określić krystaliczność struktury na podstawie rozszczepienia pasm grupy PO_4 w zakresie (450–650) cm^{-1} , związanych z potrójnie zdegenerowanymi drganiami zginającymi O-P-O. Otrzymane wyniki badań wraz z opracowaniem statystycznym zebrano w rozdziale 3; oddzielnie dla tkanek kostnych (3.1 - kości beleczkowatych i zębów) oraz tkanek miękkich ulegających mineralizacji (3.2 – płatek zastawek aortalnych, 3.3 - więzadeł żółtych).

Analizę i dyskusję rezultatów dla tkanki kostnej zmineralizowanej fizjologicznie przeprowadzono głównie ze względu na wiek pacjentów, od których pobrano próbki. Warto zwrócić uwagę, że uzyskano wyraźne zmniejszenie objętości beleczek kostnych z wiekiem przy zachowaniu ich gęstości. Wartość parametru BV/TV wyniosła 21.3% dla młodych i 11.8% dla starszych pacjentów. Skład pierwiastkowy kości beleczkowej oraz zębiny i szkliwa w

zasadzie mieścił się w granicach błędu wartości literaturowych i nie ujawnił istotnych zmian z wiekiem pacjentów. Niestety doktorantka nie podała liczebności grup wiekowych a jedynie ich zakres; 24-50 i 70-80 lat. Nieco większe zróżnicowanie ze względu na wiek otrzymano z badań spektroskopii w podczerwieni (Tabela 3.2). W grupie 70-80 lat wyraźnie spadł parametr określający stosunek obecności grupy fosforowej do grup amidowych i krystaliczność struktury (ponad połowę).

W przypadku mineralizacji płatków zastawek aortalnych otrzymano duże zróżnicowanie depozytów ze względu na ich rozmiar i gęstość świadczące o ich heterogeniczności, mieszanie materiału organicznego i nieorganicznego choć skład pierwiastkowy ziaren mineralnych nie odbiegał znacząco od składu tkanki kostnej. Parametry wyliczane na podstawie widm FTIR (takie jak : PO_4 /Amid I, CO_3/PO_4 , HPO_4/PO_4 i krystaliczność) oscylowały między wartościami dla kości i zębiny wykazując różnice istotnie statystyczne w stosunku do szkliwa zębowego (Tab.3.4, str.49).

W więzadłach żółtych z grupy stenotycznej, na podkreślenie zasługuje fakt znalezienia oprócz depozytów mineralnych zdominowanych przez fazę hydroksyapatytu (wykazujących stosunek Ca/P około 1,7) również ziarna, gdzie zidentyfikowano obecność dwuwodnego pirofosforanu wapnia $Ca_2P_2+2H_2O$ (Ca/P około 1,1), czyli kryształy CPPD co zostało potwierdzone w badaniach XRD i FTIR dla dwóch próbek. Doktorantka zwróciła uwagę, że dwie odmienne struktury chemiczne depozytów mogą wskazywać na dwa niezależne procesy mineralizacji. Tworzenie HAP kojarzone jest z procesem degeneracji tkanki natomiast powstawanie CPPD sugeruje zaangażowanie dodatkowych czynników promujących mineralizację (np. schorzenia reumatyczne). Skład pierwiastkowy depozytów w LF był różny od składu AV głównie z powodu nieobecności magnezu, strontu, miedzi przy jednocześnie podwyższonej zawartości żelaza, co może różnicować mechanizmy mineralizacji tkanek, które jednak nie są jednoznacznie określone.

Istotnym wnioskiem wynikającym z porównania cech fizykochemicznych i morfometrycznych próbek kontrolnych i próbek z grupy stenotycznej było, że mineralizacja w płatkach zastawek aortalnych była masywna, dochodziła do 40% podczas gdy więzadła żółte wykazywały znacznie mniejszą obecność złogów mineralnych. Objętość ziaren w 100 mm^3 LF była rzędu 0.01-0.5 %. Należy zaznaczyć, że wyniki badań fizykochemicznych i mikrotomograficznych płatków zastawki aortalnej i więzadeł żółtych zostały opublikowane w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu przy czym doktorantka jest pierwszym autorem w tych artykułach (Orzechowska S, Wróbel A, Goncerz G i wsp. *Physicochemical and microtomographic characterization of inorganic deposits associated with aortic stenosis*. J Heart

Valve Dis.2014; 23:40-47 oraz Orzechowska S, Wróbel A, Koziół M i wsp. *Physicochemical characterization on mineral deposits in human ligamenta flava*. J Bone Miner Metab. 2017; 7:1-9.)

Warto podkreślić, że doktorantka podjęła próbę modelowego określenia czasu wzrostu mineralizacji w tkankach w oparciu o równanie dyfuzji jonów, co zaprezentowane zostało w rozdziale 5. Analizę zmiany promienia ziarna w czasie mineralizacji tkanki przeprowadziła dla wybranych próbek więzadeł żółtych dla dwóch pacjentów z młodziej grupy wiekowej i dwóch pacjentów ze starszej grupy wiekowej uwzględniając złogi zarówno HAP jak i CPPG. Pilotażowe obliczenia wykazały większą zmianę promienia w funkcji czasu wzrostu dla depozytów CPPG niż minerałów HAP i brak wpływu wieku pacjentów na uzyskane wyniki (co może wynikać z małej liczby przeanalizowanych przypadków). W mojej opinii model mineralizacji struktur kolagenowych wymaga głębszego opracowania i odniesienia do literatury.

Ponadto dla potrzeb pracy został stworzony program BmpBinarizer (zamieszczony w pracy jako dodatek), w którym uwzględniono efekt częściowego wypełnienia vokselu (PVE) w oparciu o analizę sąsiedztwa pikseli i binaryzację. Doktorantka na przykładzie pomiarów mikrotomograficznych tej samej próbki przy dwóch zdolnościach rozdzielczych - 13,5 i 2 μm wykazała różnicę obrazów zbinaryzowanych struktur z użyciem programowania globalnego - dedykowanego w programie SkyScan i przy pomocy programu BmpBinarizer konkludując, że korekta PVE udokładnia parametry obrazowanej struktury dla badań wykonanych z wyższą zdolnością rozdzielczością (Rys. D.2 - D.4, Tab.D.1).

Praca jest napisana zrozumiałym językiem, choć autorka nie ustrzegła się od drobnych błędów literowych oraz stylistycznych. Mam też zastrzeżenia do prezentacji niektórych rysunków, szczególnie w rozdziałach 1-2, gdzie brak odnośników literaturowych w podpisach, (choć częściowo są one wspomniane w tekście).

Niemniej uważam, że mgr Sylwia Orzechowska zrealizowała cel swojej pracy doktorskiej wymagającej umiejętności prowadzenia kompleksowych badań doświadczalnych i numerycznych. Wykazała się też odpowiednią wiedzą teoretyczną w dyskusji wyników doświadczalnych zarówno w aspekcie fizycznym jak i medycznym.

Generalnie wysoko oceniam badania dotyczące kompleksowej fizykochemicznej charakterystyki mineralizacji płatków zastawki aortalnej oraz więzadeł żółtych choć niewątpliwie przydałaby się większa liczba przeanalizowanych przypadków w modelu mineralizacji struktur kolagenowych.

W konkluzji, mogę stwierdzić, że Kandydatka spełnia 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.2016.0882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311)) 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 Sylwii Orzechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

