

Olsztyn, 16.10.2017

Recenzja pracy doktorskiej mgr Urszuli Kozłowskiej
„Właściwości biologiczne mezenchymalnych komórek macierzystych rezydujących
w tkankach człowieka”
pod kierunkiem Pani dr hab. Aleksandry Klimczak prof. nadzw.

Rozprawa Pani mgr Urszuli Kozłowskiej dotyczy właściwości biologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych (z j. ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSC), które posiadają wysoki potencjał proliferacyjny, immunomodulujący, do różnicowania się w kierunku komórek innych typów oraz wydają się niezwykle obiecującym narzędziem medycyny regeneracyjnej. Dodatkowo istotne jest to, że pozyskanie ich jest możliwe z tkanki dorosłego osobnika, a to nie wzbudza kontrowersji etycznych. Grupy badawcze intensywnie pracują nad opracowaniem nowoczesnych terapii komórkowych, wykorzystaniem odkryć inżynierii komórkowej co daje możliwość wykorzystywania potencjału komórek macierzystych w regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów.

Tematem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej była charakterystyka biologiczna *in vitro* ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych zlokalizowanych w czterech niszach tkankowych organizmu człowieka: w szpiku kostnym (BM-MSC), tkance tłuszczowej (AT-MSC), mięśni szkieletowym (SM-MSC) oraz skórze (SK-MSC). Materiał wykorzystany do badań pochodził ze szpiku kostnego pobranego od zmarłych, mięśni szkieletowych oraz tkanki tłuszczowej, pozyskanej w formie pozostałości po zabiegach chirurgicznych oraz skóry pozyskanej po zabiegu amputacji kończyn dolnych.

Praca doktorska przedstawiona mi do oceny rozpoczyna się prezentacją dorobku naukowego Pani mgr Urszuli Kozłowskiej, który świadczy o samodzielności oraz bardzo dobrym warsztacie naukowym Doktorantki zagwarantowanym przez Panią Promotor dr. hab. Aleksandrę Klimczak prof. nadzw., co już w tej chwili zaowocowało zdobyciem przez Doktorantkę prestiżowego stażu zagranicznego w renomowanym ośrodku naukowym.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska ma typową konstrukcję dla rozpraw doktorskich i obejmuje streszczenie w języku angielskim i polskim, listę zastosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo (liczące 211

pozycji literaturowych anglojęzycznych, opublikowanych głównie w ostatnich 10 latach). Streszczenie zamieszczone w języku polskim i angielskim umożliwia szybkie zapoznanie się z problematyką i wynikami pracy. Praca liczy 230 strony, obejmuje 72 ryciny i 42 tabele. Rozprawa jest napisana poprawną polszczyzną, nie mniej nieliczne błędy interpunkcyjne i edytorskie pojawiające się w pracy oraz braki w opisie pojedynczych zdjęć wchodzących w skład rycin (np. rycina 21, 24, 38, 42, 43, 45 brak skali/opisu/skala nie zgadza się z wielkością powiększenia p), nie mają wpływu na zrozumienie i przejrzystość formy pracy.

„Wstęp” zawiera wprowadzenie do wszystkich ważnych wątków merytorycznych występujących w pracy. We „Wstępie” Doktorantka w bardzo ciekawy sposób wprowadza czytelnika w problem badawczy, którym zajęła się w dalszej części przygotowanej rozprawy doktorskiej. Doktorantka w dokładny i niezwykle interesujący sposób przedstawia w tej części:

- zarys historyczny odkrycia komórek macierzystych,
- właściwości komórek MSC (podstawową charakterystykę fenotypową oraz biologiczną MSC, charakterystykę genów związanych z ich multipotencjalnym charakterem),
- zdolności MSC różnicowania i formowania się do tkanki łącznej (osteogeneza, andiogeneza, chondrogeneseza),
- wpływ czynników troficznych na chondrogenesez,
- właściwości immunomodulujące MSC mogące mieć wykorzystanie w medycynie (przez wpływ na lokalne mikrośrodowisko wpływające na regenerację w terapiach takich schorzeń jak: choroba Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Alzheimera, udar czy dystrofie mięśniowe, rozległe obrażenia ciała np. poparzenia, urazy mechaniczne skóry, rozległe urazy mięśni, kości czy chrząstki oraz w transplantologii, dzięki swojej naturalnej zdolności MSC do regulowania odpowiedzi odpornościowej i tworzenia środowiska sprzyjającego przyjęciu przeszczepu).

Brakuje długoterminowych obserwacji potwierdzających bezpieczeństwo stosowania MSC i zatwierdzonych protokołów, co uniemożliwia ich aplikację w codziennej praktyce. Liczne badania dostarczają cennych informacji na temat biologii tych komórek oraz prób klinicznych z udziałem pacjentów. Jednak wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi dotyczących potencjalnych powikłań związanych z odpowiedzią immunologiczną, nowotworzeniem, różnic osobniczych w biologii MSC pozyskiwanych od różnych dawców, czy inne ograniczenia aplikacyjne.

Celem pracy Doktorantki była próba zbadania różnic biologicznych w komórkach o charakterze komórek MSC, izolowanych z czterech ludzkich tkanek oraz weryfikacja ich cech biologicznych na to jak wpływają warunki długoterminowej hodowli *in vitro* na jakość i ilości

przeszczepianych komórek. Badania dotyczyły: lokalizacji tkankowej komórek o badanym fenotypie (9CD73+, CD90, CD105+ oraz CD146+ PDGFR α +), dynamiki zmian ekspresji markerów (charakterystycznych: CD73, CD90, CD105, oraz mniej typowych markerów charakteryzujących komórki macierzyste i progenitorowe: CD146, PDGFR α , PW1, CD56) w czasie długoterminowej hodowli, testów funkcyjnych związanych ze zdolnością do różnicowania w stronę osteoblastów, adipocytów, chondrocytów oraz tworzenia spontanicznych fuzji komórkowych, charakterystyki właściwości immunomodulujących MSC poprzez analizę profilu czynników troficznych, chemotaktycznych oraz immunosupresyjnych w nadsączach po hodowli MSC, analizy stabilności multipotencjalnego charakteru MSC poprzez zbadanie ekspresji mRNA genów: *Oct4*, *Sox2*, oraz ekspresji mRNA genów: protoonkogenego (*c-Myc*) i supresorowego (*p53*) w komórkach MSC w czasie długoterminowej hodowli.

Doktorantka posiada wszechstronny warsztat eksperymentatora. Zarówno tradycyjne jak i nowoczesne metody hodowli i analizy komórkowej oraz biologii molekularnej stosowane w tej pracy są szczegółowo opisane w rozdziale „Materiały i Metody”. Metodologia pracy została przedstawiona bardzo rzetelnie w przejrzysty sposób, co nie budzi wątpliwości w zaangażowanie Autorki w planowanie i wykonanie eksperymentu. Narzędzia badawcze zostały wybrane i zastosowane w prawidłowy sposób. W badaniach wykorzystano metody: cytometrii przepływowej, barwień immunocytochemicznych, real time RT-PCR oraz Multiplex ELISA. Przeprowadzono charakterystykę różnic pomiędzy MSC zależnie od tkanki z której pochodzą oraz badano wpływ na biologię komórek w długoterminowej hodowli *in vitro*. Zmiany fenotypowe analizowano oceniając dynamikę intensywności fluorescencji poszczególnych markerów, co odpowiada zagęszczeniu badanych antygenów w komórce w pasażach P9 - P10.

„Wyniki” przedstawiono na 107 stronach w 5 podrozdziałach w formie opisowej w 23 tabelach i na 68 rycinach. W niniejszej pracy wpływ niszy i czasu trwania hodowli *in vitro* na komórki MSC został zbadany szczegółowo (ocena przebiegu hodowli, analiza podstawowego fenotypu oraz fenotypu zdolności proangiogennych, zmiana intensywności w hodowli długoterminowej, analiza PW1, właściwości multipotencjalności hodowli, wydzielania cytokin i czynników troficznych, ekspresji genów charakterystycznych dla multipotencjalności). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wykazała wpływ niszy tkankowej na potencjał biologiczny izolowanych i hodowanych *in vitro* komórek MSC. Opisywane różnice w biologii mogą być przydatne w celowanym stosowaniu komórek MSC pozyskanych z różnych tkanek, w zależności od zdolności ich potencjału regeneracyjnego i stabilności genetycznej. Autorka sugeruje, że pod uwagę należy wziąć zdolności immunomodulujące, potencjał do różnicowania oraz tworzenia fuzji

komórek MSC, ponieważ może to mieć wpływ na sterowanie procesem regeneracji poszczególnych tkanek oraz wyciszanie agresywnych, cytotoksycznych komórek odpowiedzi odpornościowej.

Doktorantka w swojej pracy przekonująco odpowiedziała na postawione pytania wynikające z przedstawionych wyników w formie prawidłowo sformułowanych wniosków.

W rozdziale „Dyskusja” zostały omówione i uzasadnione otrzymane wyniki badań. Autorka wykazała się dużą znajomością literatury w omawianej dziedzinie przy interpretacji wyników, o czym świadczy duża liczba odniesień. Cytowane piśmiennictwo zawiera aktualne dane dotyczące przedmiotu badań.

Przedstawione punkty w rozdziale „Wnioski” zawierają również prawidłowe i zwięzłe podsumowanie wyników co bardzo ułatwiało całościowy odbiór pracy, ze względu na ogromną ilość bardzo cennych wyników badań, które staną się podstawą do przygotowania interesujących i wartościowych publikacji naukowców oraz klinicystów zajmujących się medycyną regeneracyjną.

Moje krytyczne uwagi, dotyczące opisu niektórych rycin oraz pojedynczych błędów edytorski, są znikome w porównaniu z wartością merytoryczną tej pracy i bogactwem metod zaprezentowanych przez Doktorantkę, dlatego nie zmieniają ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej dysertacji.

Poddana recenzji praca doktorska ma duże znaczenie poznawcze, a jej wyniki pozwalają na opracowanie zoptymalizowanych, powtarzalnych i ujednoliconych metod hodowli in vitro, co jest istotne do kolejnych badań porównawczych.

W przyszłości mogą pomóc w opracowaniu protokołu oceny ewentualnych terapii stosowanych w modelach zwierzęcych oraz w badaniach klinicznych.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 z późn.zm.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Urszuli Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego przed Wysoką Radą Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnych im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników oraz wyjątkową staranność w opracowaniu i przedstawieniu tak dużego i wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej.

dr hab. n. med. Joanna Wojtkiewicz, prof. UWM

