

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR KATARZYNY SIENNICKIEJ PT.
„BADANIE ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY MORFOLOGICZNYMI I
CZYNNOŚCIOWYMI PARAMETRAMI MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK
MACIERZYSTYCH TKANKI TŁUSZCZOWEJ (ASC) A WIEKIEM SZCZURA –
DAWCY KOMÓREK.”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Siennickiej została przygotowana w postaci monografii w języku polskim. Dotyczy ona niezwykle aktualnego zagadnienia jakim jest problematyka pozyskiwania i przeszczepiania komórek macierzystych. Komórki macierzyste dzięki swojej nieograniczonej możliwości do podziałów, możliwości różnicowania w kierunku różnych typów komórek oraz interesującym właściwościom immunoregulacyjnym są przez niektórych uważane za niezwykle cenne narzędzie terapeutyczne. Niestety nasza dotychczasowa wiedza na temat ich pozyskiwania i praktycznego zastosowania jest ciągle niezadowalająca i wymaga dalszych badań. Z różnych względów najłatwiej dostępne są komórki macierzyste pozyskiwane od dorosłych osobników ze szpiku lub tkanki tłuszczowej. Niestety, mało wiadomo o potencjale tych komórek w zależności od wieku dawcy. Dlatego też uważam, że wybór tematyki pracy doktorskiej mgr Siennickiej jest trafny i wpisuje się w aktualne trendy w tej dziedzinie badań. Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Zygmunta Pojdy w zespole, który ma wieloletnie doświadczenie i ogromne sukcesy w dziedzinie badań nad komórkami macierzystymi.

Praca mgr Katarzyny Siennickiej ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz najczęściej używanych skrótów, wstęp zatytułowany „Wiadomości ogólne”, cele pracy, materiały i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski oraz bibliografię. Całość uzupełniają spisy tabel i rycin, które w mojej ocenie są niepotrzebne.

We wstępie Doktorantka przedstawia podstawowe informacje na temat komórek macierzystych. Opisuje kolejno pochodzenie, właściwości i potencjał komórek macierzystych zarodkowych, płodowych, somatycznych i indukowanych. Następnie przedstawia mezenchymalne komórki macierzyste (MSC). Opisuje pokrótce historię ich odkrycia, dyskutuje sprawy nomenklaturowe oraz opisuje ich fenotyp. Odnosi się też do źródła tych komórek wskazując szpik i tkankę tłuszczową jako główne tkanki, z których można je pozyskiwać do celów badawczych i terapeutycznych. W tym miejscu chciałbym zwrócić Doktorantce uwagę, że termin „stroma szpiku” lub „komórki stromalne” brzmi nie najlepiej. Zgodnie z polską nomenklaturą powinno się używać terminu „podścielisko”. Podobnie, zrezygnuj z używania terminu „szpik”, a nie „szpik kostny”.

W dalszej części wstępu Doktorantka skupia się, zgodnie z założeniami pracy, na mezenchymalnych komórkach macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej (ASC). Opisuje metodologię ich izolacji oraz właściwości. Autorka szczególnie skupia się na opisie właściwości ASC, który doskonale wprowadza czytelnika w zagadnienia ich biologii i potencjału do różnicowania w różne typy dojrzałych komórek organizmu oraz przedstawia ich zdolności do modulowania reakcji odpornościowych, a szczególnie ich właściwości jako komórek supresyjnych.

Dalsze części wstępu poświęcone są potencjałowi terapeutycznemu ASC oraz zastosowaniu terapii z zastosowaniem komórek macierzystych u ludzi w starszym wieku. Ta część jest bardzo dobrym wprowadzeniem pozwalającym zrozumieć dlaczego Doktorantka podjęła się swoich badań oraz stanowi dobre uzasadnienie celów jej pracy.

Podsumowując, wstęp stanowi bardzo dobry, oparty na nowoczesnym piśmiennictwie opis aktualnej wiedzy na temat komórek macierzystych, szczególnie ASC i ich zastosowania w terapii. Z punktu widzenia czytelnika muszę jednakże zaznaczyć, że Autorka, jakkolwiek bardzo dobrze posługuje się językiem polskim, to jednak nie ustrzegła się błędu braku właściwego podziału tekstu na krótsze paragrafy. Na przykład, jeden z paragrafów liczy sobie aż cztery strony (!) co sprawia, że czytanie tekstu nie należy do najłatwiejszych.

W oparciu o dotychczasową wiedzę Doktorantka sformułowała cztery główne cele badawcze:

1. Ocena *in vitro* zależności pomiędzy wiekiem dawcy (na przykładzie młodych i starych szczurów) a morfologicznymi i czynnościowymi właściwościami mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC),
2. Ocena wpływu wieku dawcy na ilościowe i jakościowe parametry ASC poddanych procesowi ekspansji *in vitro*,

3. Badanie *in vivo* wpływu wieku dawcy mezenchymalnych komórek macierzystych (w postaci SVF lub hodowanych ASC) na procesy neoangiogenezy w obrębie przeszczepu tkanki tłuszczowej,
4. Ocena wpływu SVF lub ASC wzbogacających przeszczepy tkanki tłuszczowej na jej stabilność po przeszczepieniu.

Cele te sformułowane są prawidłowo, chociaż w mojej opinii cel nr 1 i 2 są bardzo szczegółowe i można by połączyć je w jeden punkt.

Kolejna część pracy „Materiały i metodyka pracy” poświęcona jest opisowi metod zastosowanych do realizacji postawionych celów badawczych. Znaczącą część tego rozdziału stanowi opis metod izolacji i hodowli badanych komórek. Opis ten jest bardzo szczegółowy i spełnia warunki dobrego opisu metodologii badań. Na uwagę zasługuje fakt, że opisy metod są dodatkowo ilustrowane schematami i fotografiami co ułatwia czytelnikowi zrozumienie skomplikowanych procedur izolacyjnych i doświadczalnych. Całość kończy opis zastosowanych metod statystycznych. Podsumowując, zastosowane przez Doktorantkę metody były prawidłowe i adekwatne do postawionych zadań badawczych. Nie mam również zastrzeżeń do metodologii badań statystycznych.

Następny rozdział pracy mgr Siennickiej to opis uzyskanych wyników. Do opisu tego włączone są wyniki optymalizacji izolacji ASC. Autorka pokazała szczegółowe wyniki porównawcze dotyczące tkanki tłuszczowej pochodzącej z różnej lokalizacji: jej masy, liczby uzyskanych komórek oraz ich żywotności. Ważnym wynikiem tej części badań jest brak istotnych różnic pomiędzy tkanką tłuszczową z różnych części ciała oraz brak różnic związanych z wiekiem dawców (szczurów 6 miesięcznych i szczurów dwu letnich). Analiza cech fenotypowych (łącznie z markerami powierzchniowymi) ASC pozyskanych od młodych i starych zwierząt też nie wykazała istotnych różnic. Jedyną różnicą była większa liczba ziarnistości u szczurów starych i wyższa ekspresja β -galaktozydazy. Komórki izolowane od młodych i starych zwierząt nie różniły się również w szczególny sposób pod względem proliferacji *in vitro*, klonogenności oraz potencjału do różnicowania się w adipocyty, osteoblasty lub chondrocyty. Podobnie nie było istotnych różnic w ich potencjale proangiogennym. Za bardzo ciekawe uważam wyniki uzyskane w doświadczeniach nad rolą komórek macierzystych w utrzymaniu przeszczepów tkanki tłuszczowej. Wynika z nich, że suplementacja takich przeszczepów komórkami macierzystymi wzmacnia miejscowy proces angiogenezy oraz ułatwia utrzymanie objętości przeszczepionej tkanki.

Wyniki zostały opisane bardzo jasno i przejrzysto. Dokumentacja w postaci licznych tabel i wykresów oraz mikrofotografii jest bardzo dobra i nie budzi zastrzeżeń. Moja jedyna uwaga to to, że byłoby wskazane umieścić w opisach do tabel i rycin zawierających wyniki poszczególnych doświadczeń informację na temat zastosowanej metody statystycznej.

Podsumowując, Doktorantka w jasny i elegancki sposób wykazała, że ASC od młodych i starych szczurów nie różnią się w istotny sposób, co z kolei sugeruje, że komórki macierzyste od starych osobników mogą być z powodzeniem stosowane w terapii.

Uzyskane wyniki Doktorantka wyczerpująco przedyskutowała w świetle wyników innych badaczy. W dyskusji odniosła się zarówno do ogólnego przedmiotu badań, jak i do innych aspektów jej pracy takich jak izolacja komórek, ich cechy fenotypowe i czynnościowe, zdolność do różnicowania oraz ich zastosowanie w przeszczepach tkanki tłuszczowej. Dyskusję oceniam bardzo dobrze. Autorka wykazała się umiejętnością korzystania z piśmiennictwa oraz krytycznego spojrzenia na uzyskane wyniki. Podobnie jak w przypadku wstępu, podział tekstu na więcej paragrafów zdecydowanie ułatwił by jego czytanie.

Na podstawie przedstawionych badań oraz ich analizy mgr Katarzyna Siennicka wysnuła 5 wniosków końcowych:

1. Wiek dawcy nie wpływa w istotny sposób na morfologiczne (fenotyp, morfologia) i czynnościowe (tempo wzrostu, czas podwojenia populacji, aktywność metaboliczna, potencjał klonogeny) właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC)
2. Marker starzenia komórek, jakim jest poziom b-galaktozydazy jest wyższy w długoterminowo hodowanych *in vitro* ASC pochodzących od młodych dawców, niż w ASC pochodzących od dawców w podeszłym wieku nie poddanych długoterminowej hodowli. Porównanie to sugeruje potencjalne ryzyko związane ze stosowaniem ekspansji mezenchymalnych komórek macierzystych *in vitro* (wykorzystanie bioreaktorów) celem uzyskania ich większej liczby dla celów terapeutycznych
3. Długoterminowa hodowla ASC (30 pasaży) zwiększa odsetek komórek klonogennych (CFU-F) *in vitro*, zmieniając ilościowo, a być może jakościowo cechy hodowanych komórek. Zmiana ta znajduje odzwierciedlenie w biologicznych efektach wywieranych przez przeszczepiane komórki
4. Zdolność do neowaskularyzacji oraz różnicowania ASC w kierunku tkanki tłuszczowej, kostnej i chrzęstnej jest w pewnym stopniu zależna od wieku dawcy i czasu ekspansji *in vitro*, żadna z badanych cech nie zmieniała się jednak w stopniu większym niż obserwowanym jako rozrzut międzyosobniczy w każdej z grup, co sugeruje przydatność

kliniczną komórek pozyskanych od zaawansowanych wiekowo dawców

5. Zarówno SVF, jak ASC obu badanych grup wiekowych, dodane do przeszczepianej tkanki tłuszczowej zmniejszają tempo jej resorpcji, co potwierdza celowość wzbogacania w autologiczne SVF lub ASC tłuszczu wykorzystywanego do celów medycyny rekonstrukcyjnej lub estetycznej

Dla porządku należy uznać, że przedstawione powyżej stwierdzenia należy traktować raczej jako podsumowanie a nie rzeczywiste wnioski. Właściwymi wnioskami powinny być raczej stwierdzenia, że komórki macierzyste pozyskiwane z tkanki tłuszczowej wykazują potencjał terapeutyczny niezależnie od zaawansowania wieku dawcy oraz, że są potencjalnie przydatne przy przeszczepach tłuszczu w zabiegach z zakresu medycyny estetycznej. Nie zmienia to faktu, że powyższe punkty są dobrym podsumowaniem uzyskanych wyników.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny dysertacja mgr Katarzyny Siennickiej jest bardzo rzetelnym i oryginalnym dziełem oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski. Doktorantka wykazała się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na nowoczesnej metodologii badań doświadczalnych. Uwagi zawarte w mojej recenzji mają raczej charakter techniczny i nie mają wpływu na moją ogólną bardzo wysoką ocenę rozprawy. Uważam, że Doktorantka osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniający ją do ubiegania się o stopień doktora. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie mgr Katarzyny Siennickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze wysokie umiejętności badawcze i samodzielność naukową mgr Katarzyny Siennickiej, aplikacyjny charakter oraz bardzo wysoki poziom merytoryczny jej doktoratu i fakt, że przedstawione w niej wyniki mają realną szansę na publikację w renomowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej składam również wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej.

Warszawa, 28/04/2019

Jacek Malejczyk