



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Sybilli Matuszczak pt. "Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych zrębu izolowanych z ludzkiego serca"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska skupia się na komórkach określanych w przenośni jako magazyn leków swoicie dobranych dla pacjenta w celu naprawy uszkodzonych tkanek. Mezenchymalne komórki macierzyste zrębu (MSC) uczestniczą w naprawie uszkodzonych tkanek nie tylko jako składniki strukturalne, ale również dzięki właściwościom immunomodulacyjnym, w tym przeciwzapalnym, kształtują mikrośrodowisko patologicznej zmiany regenerując i przywracając homeostazę tkanki. Komórki te, są intensywnie badane nie tylko ze względu na możliwość wykorzystania ich w medycynie regeneracyjnej, ale również ze względu na ich wpływ na mikrośrodowisko tkanek, które wiąże się z procesami inwazji i angiogenezy w progresywnie rosnącym guzie nowotworowym. Zmiana nowotworowa, zwłaszcza inwazyjna, zmienia strukturę i homeostazę tkanki w sposób oczywisty i czasami określana jest jako nie gojąca się rana. Tak więc przedmiot Rozprawy jest aktualnym i ważnym pytaniem-problemem naukowym dotyczącym kilku dziedzin nauk biomedycznych.

Rozprawa ma tradycyjny układ i nie będę szczegółowo go omawiał.

We Wstępie, który czyta się z przyjemnością, gdyż napisany jest rzetelnie, ładnym, jasnym stylem, zawarte są informacje niezbędne do wprowadzenia czytelnika w dziedzinę badań. Godna podkreślenia jest logiczna kompozycja Wstępu, od rozwikłania zagmatwanej historii terminologii, przez definicję MSC, ich rolę oraz właściwości proangiogenne i immunomodulujące, następnie niezwykle istotne dla medycyny regeneracyjnej "immunologiczne uprzywilejowanie" MSC, aż po znaczenie MSC w progresji nowotworu.

Po wprowadzeniu w problematykę swoich badań Doktorantka formułuje krótko i jasno Cel pracy i szkicuje sposób jego realizacji, a następnie opisuje użyte do tego materiały i szeroki wachlarz procedur eksperymentalnych. Zaliczają się do nich: współczesne metody biologii komórkowej począwszy od izolacji komórek z tkanek, hodowli komórkowych z wykorzystaniem pięciu różnych pożywek hodowlanych, określania fenotypu komórek za



pomocą pojedynczego i podwójnego barwienia immunofluorescencyjnego i cytometrii przepływowej, następnie selekcji komórek za pomocą sortera, indukowania ich różnicowania w kierunku adipocytów, osteoblastów, chondroblastów i barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej oraz barwień histochemicznych. Właściwości wyizolowanych komórek badano za pomocą testów określających ich potencjał klonogeny i zdolność do migracji. Technika wykorzystującą chemiluminescencję zbadano wydzielanie przez komórki 80 cytokin i czynników wzrostowych. Dużą zaletą tej Rozprawy jest nie-poprzestanie na izolacji i analizie właściwości komórek *in vitro*, ale i określenie funkcjonalności *in vivo* tak otrzymanych i scharakteryzowanych komórek. W tym celu zastosowano model niedokrwiennej kończyny u myszy, w którą wszczepiono w godzinę po podwiązaniu tętnicy udowej, powierzchniowej milion wyizolowanych i namnożonych komórek CD105+CD34-. Właściwości proangiogenne wszczepionych komórek, zostały zbadane poprzez oznaczanie liczby naczyń krwionośnych, wydzielanie ludzkiej IL-6, ocenę histologiczną mięśnia oraz ocenę sprawności ruchowej kończyny.

Wyniki badań zostały poddane rzetelnej, dobrze opisanej analizie statystycznej wykorzystującej kilka testów statystycznych w zależności od rozkładu wartości, co pozytywnie wyróżnia tę Rozprawę.

W stanowiącym zasadniczą część rozprawy rozdziale Wyniki, Doktorantka opisuje izolację materiału z tkanki prawej komory serca od 20 pacjentów poddanych zabiegowi transplantacji głównie z powodu choroby niedokrwiennej serca. Doktorantka zwraca uwagę, że materiał pobierano ze zdrowego wizualnie fragmentu prawej komory, co jest istotnym szczegółem ze względu na dużą plastyczność i wrażliwość komórek macierzystych na warunki mikrośrodowiska, zwłaszcza sąsiedztwo uszkodzonej hypoksją tkanki. Wróć do tej sprawy w dalszej części recenzji. W tym miejscu chcę podkreślić rzetelność i skrupulatność Doktorantki w wykonaniu i opisie przeprowadzanych eksperymentów, co zasadniczo wzmacnia wartość naukową pracy. Cechy te można obserwować w całej Rozprawie, gdzie właściwości wyizolowanych komórek porównywano w stosunku do kontrolnych fibroblastów GMO7492, a ekspresja antygenów powierzchniowych badana była w stosunku do odpowiednich kontroli izotypowych. Fenotyp izolowanych i namnażanych komórek określano nie tylko za pomocą pozytywnych markerów, ale również wykazując brak ekspresji markerów negatywnych. Eksperymenty powtarzane były co najmniej 3-krotnie. Rozprawa napisana jest w sposób zwięzły, ale szczegółowy. Zwięzłość wypowiedzi naukowej jest moim zdaniem dużą zaletą. Pozwala na zwrócenie uwagi na istotne wyniki. A jest ich w tej pracy wiele. Oto kilka ciekawych przykładów. Zwraca uwagę fakt, że już od 3 dnia hodowli, wyizolowanych ze

zdrowej części ludzkiego serca komórek, zanika w populacji mnożących się komórek antygen powierzchniowy CD34 natomiast wzrasta odsetek komórek posiadający na powierzchni antygen CD105. Chcę zwrócić uwagę, że hodowla prowadzona była w atmosferze 5% dwutlenku węgla i przy atmosferycznym 21% stężeniu tlenu. W tkankach stężenie tlenu jest znacznie niższe nawet w obszarach około-naczyniowych (krew tętnicza 13%, żylna 5%, mięśnie 4%, szpik 6%). Komórki macierzyste in vivo zasiedlają nisze o większej lub mniejszej hipoksji, również częściej są identyfikowane w obszarach guzów nowotworowych o dużej hipoksji. W związku z tym mam pytanie do Doktorantki: Czy tak szybki spadek odsetka komórek progenitorowych CD34 w hodowli in vitro spowodowany może być zmianą stężenia tlenu w ich mikrośrodowisku? Eksperymentalnie można to założenie zweryfikować prowadząc hodowlę in vitro bezpośrednio po izolacji w warunkach np. 15% i 5% hipoksji. Czy przeprowadzono taki eksperyment? Nie było to celem pracy, gdyż chodziło o uzyskanie populacji zawierającej mniej niż 2% komórek CD34, zgodnie z definicją MSC, lecz naukowo poznanie warunków indukcji komórek MSC z komórek CD34 jest ciekawe. Jego pozytywny wynik tzn. utrzymanie się wysokiego odsetka komórek CD34 mogłoby mieć znaczenie w ich lepszej przeżywalności po ponownym wszczepieniu in vivo, gdyż komórki MSC, choć immunologicznie uprzywilejowane, ze względu na niski poziom HLA to jednak giną, a w hodowli in vitro tracą potencjał proliferacyjny w kolejnych pasażach. W związku z tym pojawia się pytanie - Czy spada również wraz z czasem hodowli in vitro ich stosunkowo wysoki potencjał klonogeny (około 30%) porównywalny z komórkami nowotworowymi? Odsłania się tu kolejny ciekawy problem z biologii MSC, dlaczego komórki MSC CD105+CD34- szybko giną in vivo? Technologia ich otrzymywania ukierunkowana jest na uzyskanie dużej liczby wysoce oczyszczonych komórek, należących do zdefiniowanej subpopulacji. Może korzystne byłoby mniej rygorystyczne oczyszczanie subpopulacji i pozostawienie w populacji większego odsetka komórek CD34, nawet kosztem liczebności, powodując być może spowolnienie procesu śmierci in vivo komórek MSC a zwiększając ich zdolności naprawcze? Kolejną kwestią wynikającą z uzyskanych przez Doktorantkę wyników jest stwierdzenie, że zdolności naprawcze MSC w modelu niedokrwiennej kończyny związane są nie tyle z samymi komórkami i ich zdolnościami do różnicowania w kilka typów komórek, co wydzielanymi przez nie interleukinami, przede wszystkim IL6 i IL8. W związku z tym pytanie - czy podawanie w miejsce uszkodzenia kończyny IL6 i IL8 może mieć podobny efekt terapeutyczny? Interesują mnie poglądy Doktorantki na poruszone tematy.

Rozdział Dyskusja rozpoczyna się syntetycznym podsumowaniem uzyskanych wyników badań zawartych w Rozprawie. Następnie w oparciu o literaturę przedstawiono

poglądy na temat komórek progenitorowych CD34 i omówiono wyniki własne, stwierdzając zmiany w ich odsetku w zależności od dnia hodowli i stężenia surowicy płodowej w pożywce. O ewentualnym wpływie stężenia tlenu zapytałem Doktorantkę przy omawianiu tego problemu w części Wyniki. Kolejno omówiono pozostałe markery pozytywne i negatywne, zwłaszcza wiodący i użyty do selekcji pozytywnej CD105 stwierdzając, że "zastosowane warunki hodowli umożliwiły otrzymanie komórek MSC stabilnych pod względem obecności mezenchymalnych antygenów powierzchniowych", co było celem pracy. Doktorantka zwraca w Dyskusji uwagę na fakt, że znany w piśmiennictwie wpływ bFGF na zmianę fenotypu z „miofibroblastoidalnego” z ekspresją alfa-aktyny mięśni gładkich (alfa-SMA) na "fibroblastoidalny" i bez ekspresji alfa-SMA może być przełamany przez kontakt komórek i zależy od gęstości hodowli, co spektakularnie wykazała w eksperymentach przedstawionych na Rycinie 10C. Umiejętnie prowadząc dyskusje wyników własnych i innych autorów sugeruje, nadrzędny wpływ braku kontaktu pomiędzy komórkami nad hamującym działaniem bFGF. Postuluje, że brak kontaktu międzykomórkowego jest nowym, i moim zdaniem istotnym, czynnikiem w dodatku do znanych już czynników TGF beta i stresu mechanicznego, które indukują różnicowanie komórek MSC w miofibroblasty. Uważam to odkrycie za godne podkreślenia, gdyż poznanie regulacji różnicowania MSC w miofibroblasty jest kluczowe w naprawie uszkodzonych tkanek oraz terapii przeciwnowotworowej. Jak podkreśla Doktorantka, zbyt mała aktywność miofibroblastów hamuje gojenie się ran, a ich nadreaktywność jest przyczyną zwłóknienia tkanek i patologii narządów. W terapii przeciwnowotworowej umożliwi kontrole komórek MSC związanych z nowotworem (TA-MSC), które wydzielają czynniki wzrostu, zwiększają inwazyjność nowotworu i lekooporność. W dalszej części Dyskusji omawia właściwości immunomodulujące MSC, podkreślając rolę wydzielanych przez nie cytokin IL-6 i GRO w zwiększaniu liczby makrofagów M2 i naprawie uszkodzonej tkanki na modelu niedokrwiennej kończyny u myszy. Moim zdaniem, zbyt mało uwagi poświęca wydzielanej przez MSC IL-8, która rekrutuje i aktywuje neutrofile w miejsce przerwania fizjologicznej czy mechanicznej ciągłości tkanki oraz roli neutrofili w procesach zapalnych.

Wyciągnięte Wnioski są sformułowane poprawnie, a Piśmiennictwo jest dobrze dobrane i obejmuje najnowsze publikacje również z roku 2017.

Wysoka Rado, Rozprawę oceniam wysoko jako bardzo dobrą i omawiając poszczególne jej rozdziały dałem temu wyraz. Doktorantka wykazała się wiedzą z zakresu biologii komórki i immunobiologii nowotworów, opanowaniem nowoczesnych, różnorodnych i wzajemnie się uzupełniających technik eksperymentalnych. Przedstawiona rozprawa mgr Sybilli Matuszczak

- to ważna, solidna praca naukowa, która dostarcza nam istotnej wiedzy na temat komórek CD105+CD34-, wyizolowanych z ludzkiego serca, zdolnych do różnicowania się w kierunku adipocytów, osteoblastów i chondroblastów in vitro i posiadających właściwości terapeutyczne in vivo w uszkodzonej niedotlenieniem tkance.

W oparciu o powyższe stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt.: "Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych zrębu izolowanych z ludzkiego serca" spełnia wymagania Ustawy o stopniach i tytułach naukowych i wnoszę do Wysockiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie mgr Sybilli Matuszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W związku z moją wysoką oceną Rozprawy oraz zważywszy, że część wyników przedstawionych w Rozprawie doktorskiej została opublikowana w PLoS One składam Wysockiej Radzie wniosek o wyróżnienie Rozprawy mgr Sybilli Matuszczak stosowną nagrodą.

Wrocław, 26.06.2017


Prof. dr hab. Leon Strzdała