

Prof. dr hab. n. med. Czesław Radzikowski
Instytut immunologii i Terapii Doświadczalnej
Im. Ludwika Hirszfelda PAN
Ul. Rudolfa Weigla 12
53-114 Wrocław

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sybilli Matuszczak

„Charakterystyka mezenchymalnych komórek zrębu izolowanych z ludzkiego serca”.

Populacja osiadłych w różnych tkankach komórek mezenchymalnych zrębu (MSC) wyizolowanych ze szpiku kostnego, różniących się od hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC) jest przedmiotem intensywnych badań z uwagi na poznawane ich szczególnie interesujące cechy. Komórki te, w odróżnieniu od hematopoetycznych komórek są zdolne do samoodnowy, do wzbudzania rozplemu komórek progenitorowych wykazujących zdolność do różnicowania się do różnego typu komórek w zależności od miejsca i aktualnej sytuacji fizjologicznej czy patologicznej danego mikrośrodowiska. Pochodzące do badań z różnych tkanek, z miejsc stanu zapalnego, czy procesu regeneracyjnego wykazują obecność wspólnych niehematologicznych markerów, a także brak antygenów MHC klasy II, odpowiedzialnych za ich immunogenność, nie posiadają cząsteczek kostymulujących CD40, CD 80 i CD86. Poznane ich cechy fenotypowe i aktywności sprawiają, że komórki MSCs są wykorzystywane w przygotowywaniu nowych strategii terapeutycznych, także przeciwnowotworowych, a szczególnie w transplantologii i medycynie regeneracyjnej.

Recenzowana praca doktorska liczy w sumie 93 strony maszynopisu, zawierającego 11 rozdziałów, spis 15 tabel i 18 rycin. Układ pracy jest zgodny z ogólnie przyjętymi normami.

Doktorantka we **WSTĘPIE** do swej rozprawy, opracowanym na bogatym i rzeczowo dobranym piśmiennictwie przedstawia w dwóch podrozdziałach charakterystykę komórek MSC oraz ich właściwości. Podaje kryteria ich oceny i historyczne nazwy, formułując przyjętą w 2005 roku nazwę „multipotentne mezenchymalne komórki zrębu” i akronim MSC. Nazwę tę zaproponował Komitet ds. Mezenchymalnych Komórek Macierzystych i Tkankowych Towarzystwa Terapii Komórkowej dla fibroblastoidalnych, adherentnych do plastiku komórek, izolowanych z różnych tkanek. Jak słusznie Doktorantka podkreśla, określenie w nazwie mezenchymalne oraz zręb – macierz śródkomórkowa odnosi się do pochodzenia komórek, a nie do ich zdolności do różnicowania się w kierunku komórek pochodzenia mezodermalnego.

Doktorantka podaje kryteria oceny przyjęte dla komórek MSCs, pochodzących z różnych tkanek, także uzyskiwanych z tkanki z tłuszczowej, oraz z szeroko stosowanej ich hodowli in vitro. Podaje tabelaryczne zestawienie kierunków ich różnicowania się do osteoblastów, chondroblastów i adipocytów. Interesujące są podane informacje o ich naturalnym pochodzeniu "in situ". Jedna z badanych populacji MSC pochodzi z komórek otaczających małe naczynia krwionośne i naczynia włosowate, to komórki zwane perycytami. Druga populacja komórek MSC pochodzi z zewnętrznej warstwy dużych naczyń, czyli z przydanki. Komórki te odpowiednio stymulowane in vitro różnicują się do pericytów, które są prawdopodobnie ich komórkami progenitorowymi. Zewnętrzną warstwę naczyń krwionośnych – przydankę - uznaje się za niszę komórek MSC w różnych tkankach i

narządach. Niektóre badania wskazują, że komórki MSC podobne do fibroblastów wykazują mniejszą zdolność proliferacyjną, natomiast podobnie do nich regulują proliferację limfocytów i w warunkach *in vitro* modyfikują fenotyp makrofagów.

Doktorantka podkreśla, że komórki MSC występują praktycznie we wszystkich unaczynionych tkankach organizmu ludzkiego, ale różnią się w zależności od tkanki, z której pochodzą, od stosowanej metody izolacji i warunków hodowli *ex vivo*. Dostępne informacje pochodzą głównie z badania ich funkcji i fenotypu w warunkach ich pasażowania *in vitro*. Ze względu na korzystanie w ocenianej pracy jako ich źródła komórek MSC izolowanych z ludzkiego mięśnia sercowego warto przytoczyć cytowaną w tej części wstępu ocenianej rozprawy pracę Rossiniego i wsp. z roku 2010, którzy porównali komórki MSC uzyskane ze szpiku kostnego lub mięśnia sercowego tego samego dawcy. Porównywane komórki nie różniły się morfologią, tempem wzrostu oraz antygenami powierzchniowymi, ani ekspresją genów, cząsteczek miRNA i produkowanymi białkami. MSC izolowane z serca wykazywały niższą zdolność do różnicowania się w kierunku adipocytów i osteoblastów, efektywniej różnicowały się w kierunku fenotypu komórek śródbłonkowych i kardiomiocytów.

Doktorantka podkreśla wszechobecność występowania komórek MSC, ich lokalizację w pobliżu naczyń krwionośnych, gotowość do różnych funkcji utrzymujących homeostazę - równowagę w warunkach fizjologicznych i patologicznych, w szczególności w procesach zapalnych i w procesach regeneracyjnych. Zamieszczone w tej części pracy ryciny nr. 1 – nr 5 stanowią cenną ilustrację bogatego zakresu działania rozmieszczonego w całym ustroju układu stanowiącego niezwykle środowisko dla utrzymania harmonii współdziałania w różnych częściach ale i w całym organizmie w zdrowiu i w stanach chorobowych.

Prezentację i omówienie wyników badań poprzedza rozdział **MATERIAŁY I METODY**. Na 19 stronach dysertacji podane są informacje szczegółowe dotyczące użytych odczynników, pożywek, przeciwciał oraz pozyskiwanego materiału biologicznego (z 20 serc ludzkich), izolowania z nich fragmentów, a następnie otrzymywanej zawiesiny komórek do ich hodowli *in vitro*. Uzyskane próbki analizowane były w cytometrze przepływowym po inkubacji z podanymi przeciwciałami. Kolejny etap przygotowania komórek MSC o fenotypie CD105⁺ CD34⁻ polegał na hodowli *in vitro* przez 7-10 dni, a następnie przygotowywano ich zawiesinę i sortowano po inkubacji z przeciwciałami dla uzyskania czystej hodowli komórek o fenotypie CD105⁺ CD34⁻ do namnażania i stosowania w badaniach i doświadczeniach *in vitro* i *in vivo*.

W doświadczeniach Doktorantka stosowała jako linię komórek kontrolnych utrwalone linie-mysich fibroblastów, linię L929 oraz mysiego glejaka, linię GL 261, a także linię komórek ludzkich fibroblastów o symbolu GMO7492. Z hodowli *in vitro* komórek MSC CD105⁺, CF31⁻ oraz z trzech linii kontrolnych gromadzono płyny hodowlane, nazywane przez Doktorantkę „pożywkami kondycjonowanymi” i poddawano analizie pod kątem zawartych w nich czynników – cytokin i czynników wzrostowych.

Ocena tej części dysertacji jest pozytywna – Doktorantka zaprogramowała szeroki zbiór metod dla poznania cech fenotypowych wytwarzanych czynników przez otrzymane komórki MSC z ludzkich serc, w tym także ich działanie naprawcze w terapii komórkowej w modelu doświadczalnym niedokrwiennej kończyny myszy. Zastosowała 12 celowo dobranych ludzkich przeciwciał dla zbadania obecności antygenów powierzchniowych hodowanych i namnażanych w hodowli *in vitro* wysortowanych komórek MSC. Oceniała zdolność tych komórek do różnicowania się do adipocytów, osteoblastów i chondroblastów stosując w badaniach immunocytochemicznych odpowiedni zestaw

identyfikujący HMSC Function and Identification Kit (R&D system). Ocenie poddane zostało tempo wzrostu wysortowanych komórek MSC CD105⁺CD34⁻ - mierzono czas podwojenia populacji, mierzono także ich potencjał klonogeny oraz zdolność do samodzielnej migracji. Serotom pasażowanych komórek SCM CD105⁺CD34⁻ zbadano stosując półilościowy pomiar ludzkich cytokin i czynników wzrostowych stosując zestaw Human Antibody Array C5 (Ray C5 Ray Biotech). Po izolacji makrofagów mysich ze szpiku kostnego kości długiej, założono ich hodowlę in vitro i oceniono ich antygeny powierzchniowe – służyły jako kontrola dla makrofagów pochodzących od myszy po zabiegu.

Opis zabiegu wykonanego u myszy dla wywołania niedokrwienia kończyny tylnej w celu zbadania działania wpływu terapeutycznego podania wysortowanych i namnożonych in vitro ludzkich komórek MSC podano na schemacie nr 5. W ocenie zmian w mięśni trójgłowym łydki stosowano badanie histologiczne, histochemiczne, ocenę wpływu na liczbę naczyń krwionośnych, na obecność Interleukiny IL-6 oraz na fenotyp makrofagów. Metody statystyczne w analizie wyników zostały prawidłowo dostosowane i przeprowadzone, wyliczając średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe w przypadku normalnego rozkładu, w przypadku jego braku testy nieparametryczne, analizę wariancji. W obliczeniach statystycznych korzystano z programu STATISTICA 12. Dodatkowo, Doktorantka umieściła szczegółowe oceny statystyczne przy ilustracjach w opisie wyników badań.

Kolejny rozdział – **WYNIKI** zawarty na 19 stronach maszynopisu rozprawy, ilustrowany jest 12 rycinami. W hodowli komórek izolowanych z ludzkich serc od dnia 2 do 6 w odstępach 24 godzinnych notowano zmiany kształtu komórek i określano odsetek komórek o ekspresji antygeny CD34 i CD105. Obserwowano niższy odsetek komórek CD105⁺CD34⁻ w hodowli w pożywce z dodatkiem 2% FBS w porównaniu z hodowlą z dodatkiem 20% FBS. W obu porównywanych hodowlach obserwowano obniżenie liczby komórek CD105⁺CD34⁺. W sortowaniu uzyskano prawie 98% komórek CD105⁺CD34⁻. Analiza cytometryczna tej populacji wykazała, że ponad 96% posiada antygeny charakterystyczne dla komórek mezenchymalnych (CD105, CD29, CD73 i CD44), mniej niż 1% posiadał antygeny charakterystyczne dla komórek pochodzenia hematopoetycznego (CD45), komórek krwi, czy komórek śródbłonkowych. Analiza cech antygenowych fibroblastów ludzkiej linii kontrolnej GMO 7492, różniła się wyższym odsetkiem komórek wykazujących antygen CD29 oraz CD90 oraz wyższym odsetkiem komórek z antygenami komórek hematopoetycznych (Lin) oraz obecność antygeny CD146. Tylko komórki CD105⁺CD34⁻ różnicowały się in vitro w kierunku adipozytów, osteoblastów i chondrocytów (ryc. 8). Zdolność utrzymywania się proliferacji komórek CD105⁺CD34⁻ zmniejszała się w miarę ich pasażowania. Do dalszych badań wykorzystywane były komórki w pasażach od 1 do 3. Zahamowanie proliferacji nie wpływało na utrzymywanie się ekspresji antygenów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych (ryc. 9).

Badanie cytoszkieletu oraz połączeń międzykomórkowych wykazało liczne filamenty aktynowe, filamenty pośrednie zbudowane z winektyny tworzyły cytoszkielet. Obserwowano długie wypustki badanych komórek oraz zależną od gęstości hodowli komórek włókna alfaSMA⁺. W badaniach immunofluorescencyjnych wykazano obecność tzw. połączeń zwierających, zbudowanych z N-kadheryn (ryc. 10). Analiza klonogenności hodowli komórek CD105⁺CD34⁻ wykazała ich wyższą klonogenną zdolność jak komórek kontrolnych GMO7492 (30% vs. 7%, ryc. 11). Badanie migracji komórek CD105⁺CD34⁻ wykazało ich najwyższą zdolność do migracji pod wpływem dodania pożywki z kontrolnej hodowli mysiego glejaka i 20% FBS. (ryc. 12).

Badanie sekrotomu z 48-godzinnej hodowli komórek MSC CD105⁺CD34⁻ wykazało wydzielanie do pożywki głównie interleukiny IL-6 i IL-8, niewielką część GRO (Growth Related Oncogen) stanowiły

cząsteczki GROalfa. W pożywce obserwowano także obecność czynnika wzrostu hepatocytów i rozpuszczalne cząsteczki OPG (Osteoprotegerin). Obserwowane wartości były znacznie wyższe od uzyskanych z badania pożywki znad hodowli kontrolnych mysich fibroblastów, linii GMO7492 (ryc. 13C). Badany wpływ pożywki z hodowli komórek MSC CR105CD34 in vitro z dodatkiem LPS wykazał obecność specyficznego dla makrofagów antygenu F4/80 oraz wyższy odsetek makrofagów o fenotypie CD206⁺, CD86⁺ i CD206⁺ i CD206⁻ w porównaniu do kontrolnej pożywki (ryc.14).

W doświadczeniu terapeutycznym w przyjętej 5-cio stopniowej skali oceny sprawności obserwowano najszybszy powrót do sprawności u myszy po terapii komórkowej. Ocena mikroskopowa wycinków mięśnia trójgłowego łydki wykazała zmiany w porównaniu z grupami kontrolnymi w przekrojach miocytów oraz w obecności bogato komórkowych nacieków w mięśniach myszy „leczonych” (ryc. 15). W dniu 1 i 3 po wszczepieniu komórek SCM w miejscu ich podania wykazano obecność IL-6 oraz wzrost liczby makrofagów M2 od dnia 3, najwyższy poziom dnia 7 i spadek po 14 dniach (ryc. 18). Po 14 dniach Doktorantka obserwowała efekt proangiogeny - zwiększoną liczbę naczyń krwionośnych (ryc. 16).

DYSKUSJA zawarta została na 8 stronach maszynopisu rozprawy. Stanowi interesująco przedstawioną konfrontację uzyskanych wyników badań własnych Doktorantki nad uzyskaną i badaną populacją komórek MSC z ludzkiego mięśnia sercowego z podanymi we wstępie pracy przyjętymi międzynarodowymi kryteriami ich weryfikacji. Po przystosowaniu komórek uzyskanych z preparatów ludzkiego mięśnia sercowego do wzrostu in vitro, poznaniu zbioru ich cech morfologicznych, fenotypu antygenowego i funkcji, a także ich sortowaniu uzyskała populację komórek o fenotypie CD105⁺ CD34⁻. Doktorantka w swych doświadczeniach zaprogramowanych i przeprowadzonych prawidłowo wykazała wydzielanie przez nie prozapalnych i proangiogeny cytokin, a także polaryzowanie in vitro makrofagów do fenotypu M2 o podobnej funkcji. Zastosowany w modelu doświadczalnym ksenogeniczny przeszczep ludzkich komórek MSC powodował przyspieszenie procesu naprawy uszkodzonego niedokrwieniem mięśnia trójgłowego poprzez wytwarzanie naczyń - efekt proangiogeny i powodowanie polaryzacji makrofagów do fenotypu M2.

Interesującym punktem rozważanym w dyskusji jest sprawa różnic pomiędzy komórkami macierzystymi układu krwiotwórczego i komórkami pochodzenia mezenchymalnego, których cechy poznano głównie w badaniach ex vivo. Komórkami progenitorowymi dla nich są także komórki macierzyste o fenotypie CD34. Pod wpływem zmian w określonym środowisku tkankowym, czy narządowym, a także w warunkach ich pasażowania in vitro antygen CD34 znika. Wysortowane komórki MSC CD105⁺CD34⁻ wykazują wyższą aktywność. Natomiast antygen CD105 (endogлина) jest glikoproteiną towarzyszącą receptorowi TGFbeta wpływającą na różne procesy komórkowe (jak proliferacja, migracja, adhezja). Chroni komórki przed apoptozą wywołaną hipoksją.

Inny ciekawy aspekt przedstawiany w Dyskusji to sprawa podobieństwa komórek MSC do fibroblastów, których linię myszą i ludzką Doktorantka używała jako komórki kontrolne. Cechą odróżniającą jest brak lub niższy potencjał do różnicowania się do trzech charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych linii komórkowych. Podkreślona przez Doktorantkę jest cecha stabilności ekspresji antygenów powierzchniowych w badanych kolejnych pasażach tych komórek. O zdolności komórek MSC do różnicowania się w kierunku miofibroblastów i kardiomiocytów świadczy obecność w ich hodowli połączeń międzykomórkowych zbudowanych z N-kadheryn.

Ciekawy aspekt omawiany w Dyskusji to wpływ gęstości komórek w hodowli na ekspresję genów związanych z aktywnością proliferacyjną komórek. W przypadku małej gęstości wyższa jest ekspresja genów związanych z ich proliferacją. Natomiast w przypadku dużej gęstości, występuje aktywacja genów związanych z działaniem immunosupresyjnym, przemieszczaniem się komórek, komunikacją oraz angiogenezą. Doktorantka słusznie podkreśla znaczenie wydzielania przez stosowane komórki MSC zbioru cytokin i czynników wzrostowych, które wpływają na mikrośrodowisko, regulują działanie komórek układu odpornościowego, w konsekwencji stymulując naprawę uszkodzonej tkanki.

Inne problemy interesująco przedstawione przez Doktorantkę w Dyskusji to sprawa immunologicznego uprzywilejowania komórek MSC, czyli ich niskiej immunogenności w układzie ksenogenicznym, ich interakcji z komórkami układu odpornościowego gospodarza, w tym sprawa polaryzacji makrofagów do przeciwwzapalnego i proangiogenego fenotypu M2. Reasumując opracowanie przez Doktorantkę informacji i danych z piśmiennictwa (prace cytowane w tekście i zebrane bez ich numerowania w wykazie piśmiennictwa (około 100 pozycji zebranych do roku 2017) świadczą o dobrym opanowaniu przedmiotu z bogatego zbioru cytowanych prac.

Ocenianą dysertację zamyka część **WNIOSKI**. W 7 punktach Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki swoich badań. Do ich zaprogramowania i przeprowadzenia nie zgłaszam uwag merytorycznych, czy krytycznych. Doktorantka wykazała dobre przygotowanie teoretyczne do sformułowania uzasadnienia wyboru dziedziny podjętych badań, programu ich wykonania w przeprowadzonych doświadczeniach. Do strategii ich przeprowadzenia, oceny wyników, w tym zastosowanego programu oceny statystycznej wyników nie mam zastrzeżeń. Jako były eksperymentator żałuję, że Doktorantka nie potwierdziła uzyskanego ciekawego wyniku doświadczenia terapeutycznego „terapii komórkowej” leczenia zmian niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia trójgłowego kończyny tylnej myszy. Jako recenzent zwracam uwagę na stosowane - prawie zawsze błędnie - określenie liczba i ilość oraz błędy literowe, które zaznaczyłem w recenzowanym egzemplarzu dysertacji. Opisując nacieki komórkowe podaje się zwykle skład jakościowy komórek, a nie tylko jego wielkość. W preparatach histologicznych przekroju mięśnia poza opisanymi przez Doktorantkę zmianami uderza różnica w wielkości włókienek mięśniowych i ich barwliwości w stosunku do kontrolnego preparatu.

Badania realizowane w ocenianej pracy doktorskiej były częściowo finansowane przez Unię Europejską z Funduszu Rozwojowego w ramach projektu POIG.01.03.01-00-169/9 oraz z budżetu Państwa w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka. Część pracy była opublikowana w jednej publikacji (Doktorantka drugą autorką) oraz w 4 krajowych prezentacjach, w których Doktorantka była pierwszą autorką, przedstawiającą wyniki zawarte w ocenianej rozprawie.

Podsumowując, oceniona przeze mnie pozytywnie rozprawa doktorska mgr Sybilli Matuszczak „*Charakterystyka mezenchymalnych komórek zrębu izolowanych z ludzkiego serca*”, wykonana pod opieką naukową prof. dra Stanisława Szali, spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora określone w Dzienniku Ustaw RP z dnia 21.06.2016 roku. Dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Sybilli Matuszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Przedkładam także wniosek o wyróżnienie tej pracy ze względu na jej podane walory naukowe, także za szerokie i prawidłowe wykorzystanie bogatego zbioru materiałów i współczesnych metod badań w terapii komórkowej ich 4 prezentacjach, których

Doktorantka jest pierwszym autorem i w drugim autorem 1 publikacji (inny model terapeutyczny). PLoS One 2016, IF=3.54.



Wrocław, 08.07.2017.

Prof. dr hab. n. med. Czesław Radzikowski