

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 ALEKSANDRY ZOŁOCIŃSKIEJ PT.
„BADANIE ZDOLNOŚCI MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH
IZOLOWANYCH Z TKANKI TŁUSZCZOWEJ (ASC) DO STYMULOWANIA
REGENERACJI USZKODZONYCH NERWÓW OBWODOWYCH SZCZURA Z
WYKORZYSTANIEM RUSZTOWAŃ TKANKOWYCH.”**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Aleksandry Zołocińskiej została przygotowana w postaci monografii w języku polskim. Wpisuje się ona w aktualny i ważny kierunek badań dotyczących zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w medycynie odtwórczej i regeneracyjnej, w szczególności we wspomaganiu gojenia się i naprawie uszkodzonych tkanek i narządów. Wprawdzie temat jest bardzo popularny i poświęcono mu wiele publikacji, jednak w dalszym ciągu nasza wiedza w tej dziedzinie pozostaje niepełna. Dotyczy to szczególnie regeneracji nerwów. Dlatego też uważam, że wybór tematyki pracy doktorskiej mgr Zołocińskiej jest bardzo dobry. Dodatkową gwarancję trafnego wyboru tematyki i jakości badań przeprowadzonych przez Doktorantkę stanowi fakt, że praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Zygmunta Pojdy, którego Zespół ma wieloletnie doświadczenie i ogromne sukcesy w dziedzinie badań nad komórkami macierzystymi.

Monografia mgr Aleksandry Zołocińskiej ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawiera wstęp, cele pracy, materiały i metodykę, wyniki, dyskusję, wnioski oraz bibliografię. Do pełnego schematu zabrakło mi streszczenia pracy. Osobiście nie uważam tego za wielce rażące uchybienie, niemniej jednak niektórzy mogliby to uznać za odstępstwo od obowiązujących zasad.

We wstępie Doktorantka przedstawia podstawowe informacje na temat źródeł i potencjału terapeutycznego mezenchymalnych komórek macierzystych oraz ich wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. W związku z tematyką pracy, Doktorantka odniosła się również do uszkodzeń oraz metod naprawy nerwów obwodowych. Wstęp jest bardzo dobrze napisany i zawiera wszystkie najważniejsze i, co istotne, nowe informacje dotyczące MSC. Między innymi, za szczególnie ważne uważam odniesienie się Doktorantki to toczącej się dyskusji na temat rzeczywistej „macierzystości” MSC i ich fenotypu. Spodobało mi się również, że Doktorantka zaznaczyła wagę parakrynnego i immunomodulacyjnego działania MSC zarówno na cały organizm jak i uszkodzone tkanki. Jedyna krytyczna uwaga dotyczy braku podziału tekstu na krótsze paragrafy. Jest to często popełniany błąd stylistyczny, który sprawia, że czytanie tekstu nie należy do najłatwiejszych. Uwaga ta odnosi się też do dyskusji.

Podsumowując, wstęp jest bardzo dobrym wprowadzeniem do tematyki badań Doktorantki i stanowi dobre uzasadnienie celów jej pracy.

Główne cele badawcze Doktorantka zawarła w pięciu osobnych punktach:

1. Porównanie *in vitro* przydatności mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej różnych lokalizacji anatomicznych szczura do naprawy uszkodzeń w układzie nerwowym
2. Ocena wpływu wybranych czynników wzrostu na proneurogenne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC)
3. Ocena *in vitro* zdolności ASC do regeneracji uszkodzeń mechanicznych komórek linii N2a wywodzącej się z mysiej neuroblastomy
4. Badanie oddziaływań pomiędzy kopolimerem poli-(L-laktydu) z poli-(ε-kaprolaktonem) z dodatkiem polianiliny (P(LLA-CL)/PANI) a ASC
5. Ocena przydatności rusztowania tkankowego wykonanego z P(LLA-CL)/PANI zasiedlanego ASC do naprawy uszkodzeń nerwów obwodowych w modelu *in vivo*.

Cele te zostały sformułowane prawidłowo, a sens ich realizacji znajduje potwierdzenie w aktualnym stanie wiedzy.

Kolejna część pracy „Materiały i metodyka pracy” zawiera opis metod zastosowanych do realizacji postawionych celów badawczych. Doktorantka szczegółowo opisuje metodykę pobierania tkanki tłuszczowej i izolację ASC oraz ocenę ich liczby i żywotności. Odnosi się również do metod ich hodowli i pasażowania oraz przechowywania w stanie zamrożenia. W podobny sposób Doktorantka opisuje również postępowanie z komórkami komórek linii N2a.

W dalszej części Doktorantka opisuje metody stosowane do oceny fenotypu komórek metodą cytometrii przepływowej oraz metody i sposoby oceny różnicowania komórek w kierunku osteogenezy, adipogenezy i chondrogenyzy. W dalszej części opisuje ona metody oceny potencjału klonogennego, oceny aktywności metabolicznej i różnicowania ASC w kierunku neuralnym. Osobne rozdziały zostały poświęcone metodzie izolacji RNA i ilościowej ocenie ekspresji mRNA metodą qRT-PCR. Dalej Doktorantka opisuje metody stymulacji ASC czynnikami wzrostu i pozyskiwania nadszyczów z ich hodowli oraz zastosowania modelu komórek N2a do oceny uszkodzenia układu nerwowego *in vitro*.

W kolejnych podrozdziałach znajdujemy opis zastosowanej w badaniach nanowłókniny i tubularnych rusztowań tkankowych z dodatkiem kolagenu oraz zasiedlania tych materiałów przez ASC oraz opis metodyki oceny ich liczby, żywotności, różnicowania i apoptozy. Zaś w ostatnich podrozdziałach Doktorantka opisuje model uszkodzenia nerwu kulszowego na modelu szczurzym, test behawioralny otwartego pola oraz ocenę histologiczną i immunohistochemiczną mięśni dwubrzuścowych. Całość wieńczy opis zastosowanych metod statystycznych.

Muszę przyznać, że jestem pod ogromnym wrażeniem zakresu badań i warsztatu badawczego jaki posiadała Doktorantka. Zastosowane przez Doktorantkę metody były prawidłowe i adekwatne do postawionych zadań badawczych. Nie mam również zastrzeżeń do metodologii badań statystycznych. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wytknąć Doktorantce niedostatki w opisie oceny fenotypu komórek metodą cytometrii przepływowej. Metoda ta jest trudna i wymaga od badacza dużego doświadczenia, a jednym z kluczowych elementów jest wybór właściwej metody bramkowania. Aby czytelnik pracy mógł ocenić prawidłowość przeprowadzonej analizy należałoby zamieścić stosowne wykresy przedstawiające krok, po kroku jak były ustawiane bramki i którą populację brano pod uwagę w analizie wyników. Bez takiej analizy (zamieszczanej z zasady jako „supplementary data”) trudno dzisiaj oczekiwać opublikowania pracy w wysokoimpaktowym czasopiśmie.

Kolejna uwaga dotyczy metody qRT-PCR. W jej opisie zabrakło bowiem kluczowej informacji o sposobie obliczania względnej ekspresji mRNA. Na wykresach w rozdziale „Wyniki” pojawia się enigmatyczna dla czytelnika wartość RQ. Według mojej wiedzy wartość RQ (Relative Quantification) opisuje zmianę ekspresji względem kalibratora, którym z reguły jest jakaś kontrola (kontrola taka zawsze ma $RQ=1$). Niestety, Doktorantka w popisie metody nie udzieliła takiej informacji i nie zdefiniowała do jakiej kontroli odnoszą się określone wyniki. O ile można przypuszczać, że w niektórych eksperymentach kontrolą były komórki nietraktowane cytokiną (Ryc 13-16), to w doświadczeniach zilustrowanych na Ryc 12 i 17 jest to całkowicie niejasne.

Poza wymienionymi powyżej uwagami uważam, że pozostałe opisy metod badawczych są wystarczająco szczegółowe i spełniają warunki dobrego opisu metodologii badań. Na uwagę zasługuje fakt, że opisy niektórych metod zostały zilustrowane schematami i fotografiami, co dodatkowo ułatwia czytelnikowi zrozumienie procedur doświadczalnych.

W następnej części pracy mgr Zołocińska przedstawiła opis uzyskanych wyników. Poza uwagami zgłoszonymi powyżej i wynikającymi z niedostatków opisu metodologii analizy cytofotometrycznej i qRT-PCR, nie mam zastrzeżeń do sposobu ich prezentacji. Wyniki zostały starannie opracowane i przedstawione w jasny i przejrzysty sposób na wykresach, tabelach i mikrofotografiach. Moja jedyna uwaga dotyczy braku umieszczenia w opisach do tabel i rycin informacji na temat zastosowanej metody statystycznej.

W pierwszej części pracy Doktorantka przedstawiła wyniki charakterystyki ASC uzyskiwanych z tkanki tłuszczowej szczura z różnych lokalizacji. Przedstawiła również wyniki dowodzące, że komórki te posiadają potencjał różnicowania w kierunku adipogenezy, chondrogenyzy i osteogenezy. Badania te i ich wyniki są powtórzeniem wcześniejszych osiągnięć uzyskanych przez Panią dr Katarzynę Siennicką, koleżankę z Zespołu Pana Prof. Pojdy, której doktorat również miałem zaszczyt recenzować. Z tego względu oraz biorąc pod uwagę, że zasadnicza problematyka doktoratu Pani mgr Zołocińskiej dotyczyła zdolności ASC do różnicowania w kierunku neuralnym i do stymulowania regeneracji nerwów uważam, że ta część rozprawy mogłaby być całkowicie pominięta bez najmniejszej szkody dla ogólnej i merytorycznej wartości pracy.

W drugiej części pracy Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące różnicowania ASC w kierunku neuralnym, oceny ich zdolności do naprawy uszkodzeń komórek N2a *in vitro*, zasiedlania użytych w pracy rusztowań oraz naprawy uszkodzonego nerwu kulszowego.

Uzyskane wyniki wskazały, że ASC mogą różnicować w kierunku neuralnym niezależnie od miejsca pobrania tkanki tłuszczowej i proces ten może być stymulowany przez NGF. Doktorantka wykazała również, że ASC oraz nadsąca z ich hodowli nie mają istotnego wpływu na wzrost komórek N2a, ASC wpływają natomiast na tempo zarastania rasy w hodowli N2a. Doktorantka analizowała również wzrost i różnicowanie ASC na różnych materiałach nanowłóknistych i wykazała, że materiały charakteryzują się akceptowalną biogodnością dla badanych komórek.

W mojej opinii najciekawszą część pracy stanowiły badania nad regeneracją nerwu kulszowego u szczurów. Doktorantka wykazała, że zastosowanie leczenia za pomocą trójwymiarowych tubularnych rusztowań tkankowych z wielofunkcyjnych kompozytowych materiałów nanowłóknistych (WKBN) zasiedlonych ASC przyspieszyło regenerację nerwu w stopniu co najmniej porównywalnym do autoprzesczepu. Wprawdzie nie zaobserwowano istotnej różnicy w zapobieganiu atrofii mięśnia, ale terapia zasiedlonym ASC skafoldem

skutkowała większą liczbą włókien nerwowych i, co bardzo ciekawe, normalizacją zachowań zwierząt ocenianych w badaniach behawioralnych.

Uzyskane wyniki Doktorantka wyczerpująco przedyskutowała w świetle wyników przedstawionych w piśmiennictwie światowym. Dyskusję oceniam bardzo dobrze, chociaż Autorka nie ustrzegła się błędu powtarzania zbyt szczegółowego opisu własnych wyników. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej analizy wyników oraz korzystania z piśmiennictwa. Jak już wspomniałem wcześniej, podział tekstu na więcej paragrafów zdecydowanie ułatwiłby jego czytanie.

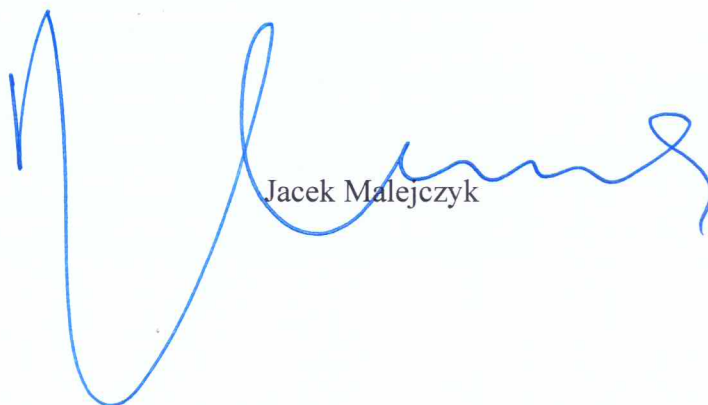
Na podstawie przedstawionych badań oraz ich analizy Doktorantka wyciągnęła 5 wniosków odpowiadających postawionym celom pracy:

1. Niezależnie od lokalizacji tkanki tłuszczowej, izolowane z niej ASC wykazują zbliżone cech fenotypowe i czynnościowe, a także zdolność do różnicowania w kierunku neuralnym
2. Spośród badanych czynników wzrostu NGF w największym stopniu wpływa na różnicowanie ASC w kierunku neuralnym, natomiast żaden z badanych czynników nie ma wpływu na ich potencjał do zwiększania proliferacji komórek N2a
3. 3. ASC znamienne skracać czas naprawy uszkodzeń mechanicznych komórek linii N2a
4. Nanowłóknina wykonana z kopolimeru poli-(L-laktydu) z poli-(ε-kaprolaktonem) z polianiliną (P(LLA-CL)/PANI) z dodatkiem kolagenu wpływa pozytywnie na proneurogenne właściwości ASC *in vitro* poprzez wzrost ekspresji genów związanych z różnicowaniem w kierunku neurogenezy.
5. Tubularne rusztowanie tkankowe z P(LLA-CL)/PANI z dodatkiem kolagenu zasiedlone ASC wspomaga naprawę uszkodzeń mechanicznych nerwów obwodowych w modelu *in vivo* poprzez stymulację wzrostu włókien nerwowych.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski są prawidłowe i są dobrym podsumowaniem uzyskanych wyników, chociaż wydaje mi się, że ostatni z nich brzmi może nazbyt optymistycznie.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka zaimponowała mi bogatym warształem badawczym i wiedzą w temacie prowadzonych badań i nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniający ją do ubiegania się o stopień doktora. Moje krytyczne uwagi zawarte w niniejszej recenzji mają charakter bardziej formalny i nie mają wpływu na moją ogólną bardzo wysoką ocenę rozprawy. Mając to na uwadze uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Aleksandry Zołocińskiej jest oryginalnym osiągnięciem Autorki oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie mgr Aleksandry Zołocińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 17/03/2021



Jacek Malejczyk