INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail instytut@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Dr hab. Barbara Gawrońska-Kozak
Profesor nadzwyczajny
Zakład Biologicznych Funkcji Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
e-mail: b.kozak@pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 4 kwietnia 2016

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pani mgr inż. Julii Borowczyk-Michałowskiej**

Pt. "**Poszukiwanie pluripotencjalnych komórek macierzystych w skórze ludzkiej**"

Wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Justyny Drukały (promotor)

w Zakładzie Biologii Komórki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Skóra jako największy organ ciała wypełnia wiele kluczowych funkcji związanych przede wszystkim z jej rolą jako bariery ochronnej odgradzającej narządy wewnętrzne od środowiska zewnętrznego. Jednakże funkcja skóry nie ogranicza się do bariery mechanicznej, czy nawet organu odpowiedzialnego za termoregulację oraz zabezpieczającego przed utratą wody. Badania ostatnich lat wskazują, że skóra jest również wyspecjalizowanym systemem immunologicznym oraz organem neuro-endokrynnym (Slominski et al., 2012). Wszystkie te zadania nie byłyby możliwe do wypełnienia bez najistotniejszej cechy skóry, ktorą jest jej zdolność do ciagłej samoodnowy. Jakkolwiek samoodnowa jest charakterystyczna tylko dla naskórka (zewnetrzej warstwy skóry) zaś nie dotyczy skóry właściwej i warstwy podskórnej, interakcje pomiedzy komórkami naskórka, skóry właściwej i adipocytami warstwy śródskórnej i podskórnej regulują potencjał samoodnowy. Podstawowym warunkiem/aspektem odnawialności skóry jest obecność komórek macierzystych. Pomimo tego, że od wielu lat komórki macierzyste naskórka

stanowią obiekt intensywnych badań naukowych dotychczas nie wykryto wspólnego markera dla tych komórek. Ponadto najnowsze badania, włączając wyniki zawarte w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej, wskazują na wiele, wciąż nie odkrytych aspektów fizjologii skóry, w tym możliwość identyfikacji komórek macierzystych naskórka w zależności od ich lokalizacji/niszy przebywania.

Fizjologiczna zdolność naskórka do samoodnowy nie zawsze jest możliwa w stanach patologicznych takich jak urazy, zranienia, poparzenia, odleżyny czy niegojące sie rany, u podstaw których leżą choroby metaboliczne. Najbardziej powszechnym sposobem gojenia ran skórnych u ssaków jest forma naprawcza, ktorej towarzyszy wytworzenie blizny. Jakkolwiek szybki process naprawczy jest korzystny dla organizmu gdyż przywraca utraconą ciągłość tkanek skórnych, w przypadku rozległych urazów wytworzona tkanka bliznowata pozbawiona gruczołów, jest nieelastyczna i może upośledzać funkcjonowanie nie tylko skóry ale całego organu. Zdolność do regeneracji skóry (gojenie bezbliznowe) u ssaków jest możliwa jedynie w trakcie życia płodowego. Liczne, szeroko zakrojone badania podejmują próby wyjaśnienia mechanizmów regulujacych te procesy, stosowania terapii stymulujacych process regeneracji oraz wykorzystania substytutów skóry umożliwiających szybsze gojenie i naprawę ubytków. Ponieważ procesy regeneracji uwarunkowane są obecnością/dostępnością komórek macierzystych, ich identyfikacja, izolacja i charakterystyka jest warunkiem podstawowowym do zastosowania z użyciem nowoczesnych technik inżynierii komórkowej w terapii substytucyjnej ubytków skóry.

W przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej Doktorantka przeprowadziła badania dotyczące izolacji, charakterystyki fenotypowej oraz hodowli komórek macierzystych skóry człowieka ze szczególnym zwróceniem uwagi na komórki naskórka. Ponadto Doktorantka podjęła się również wyjaśnienia potencjalnego udziału komórek macierzystych w procesie gojenia urazów skórnych.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona praca doktorska liczy 127 stron i zachowuje typowy dla rozpraw doktorskich układ. Rozprawa rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim oraz angielskim. Wykaz stosowanych skrótów został podany na dwóch stronach. Wstęp liczy 26 stron i zawiera 4 ryciny. Cel pracy stanowi 1 stronę a bezpośrednio po nim następujący rozdział Materiały i metody obejmuje 21 stron w tym -7 tabel i 5 rycin. Rozdział Wyniki liczy 38 stron, na których umieszczono 25 rycin i 2 tabele. Dyskusja obejmuje 13 stron, po której następuje rozdział

Najważniejsze Wyniki stanowiące 1 stronę. Bibliografia obejmuje 11 stron z 165 pozycjami piśmiennictwa. Do rozprawy został dołączony Dorobek naukowy Doktorantki, na który składają się: 7 prac oryginalnych, 1 praca przeglądowa, 1 rozdział w monografii i 27 doniesień konferencyjnych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszelkie wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, jest informatywne i przedstawia w formie skrótowej cele i najważniejsze wyniki pracy wraz z podsumowaniem.

Wstęp pracy w sposób usystematyzowany i wyczerpujący wprowadza w zagadnienie rozprawy. W logicznie ułożonych podrozdziałach Wstępu Doktorantka omawia budowę skóry ze szczególnym zwróceniem uwagi na budowę i funkcjonowanie naskórka w stanach homeostazy. Następne podrozdziały skupiają się na charakterystyce komórek macierzystych naskórka: komórkach macierzystych przedziałów międzymieszkowych, mieszków włosowych i gruczołów łojowych. Szczególną uwagę Doktorantka poświęca opisowi gruczołów potowych, ich budowie, rodzajom i morfogenezie. W tym podrozdziale wprowadza nas w dotychczasowy, acz niezbyt obszerny stan wiedzy dotyczący komórek macierzystych gruczołów potowych, co stanowi podstawę do postawionych sobie przez Doktorantkę celów pracy, uzyskanych w trakcie badań wyników a także do dyskusji. Następny podrozdział dotyczy gojenia ran skórnych i udziału w tych procesach komórek macierzystych, zarówno tych wystepujacych lokalnie w skórze jak i tych rekrutowanych z krwi obwodowej do miejsca zranienia. Dwa końcowe podrozdziały Wstępu dotyczą pluripotencji komórek macierzystych. Doktorantka omawia embrionalne komórki macierzyste opisując panel markerów używany w celu ich identyfikacji. Szczególna uwaga została poświęcona tkankowo-specyficznym komórkom macierzystym VSEL po raz pierwszy opisanym w roku 2006 przez prof. Mariusza Ratajczaka. Doktorantka scharakteryzowała komórki VSEL zarówno u myszy jak i u człowieka zwracając szczególną uwagę na panel markerów je chrakteryzujących, rozbudowując szczególnie podstawy dotyczące markera SSEA-4 będącego przedmiotem badań zaprezentowanych w rozprawie.

Podsumowując, Wstęp jest przygotowany bardzo starannie i wyczerpująco. Na szczególną uwagę zasługują informatywne ryciny obrazujące i systematyzujące wiedzę dotyczącą naskórka i gruczołów -obecnych w tej warstwie skóry. Przedstawione tło naukowe w obszarze badań nad

komórkami macierzystymi naskórka w sposób logiczny wprowadza w cele badawcze jakie doktorantka postawiła sobie w pracy. Ponadto na uwagę zasługuje umiejętność wykazania udziału zespołu badawczego w którym Doktorantka podjęła się wykonania pracy doktorskiej w badania dotyczące komórek macierzystych VSEL co wskazuje na logiczną i systematyczną kontynuację prowadzonych badań.

Cele Pracy zostały poprzedzone krótkim uzasadnieniem i ujęte w cztery główne cele jednostkowe.

Uwagi:

1. Właściwym byłoby rozbudowanie tej części rozprawy stawiając bardziej szczegółowe cele/zadania badawcze odpowiadające poszczególnym etapom analiz, biorąc pod uwagę złożoność badań i ilość uzyskanych wyników.

2. Zaprezentowane cele nie wpełni odpowiadają uzyskanym wynikom.

3.Pozostaje wrażenie, że wynik negatywny uzyskany w trakcie doświdczeń *in vivo* nie został ujęty w celach pracy.

Wyniki negatywne podobnie jak wyniki pozytywne doświadczeń naukowych posiadają tę samą wartość. Biorąc pod uwagę złożoność natury w zdecydowanej większości przypadków możemy spodziewać się, że nasze początkowe założenia/cele przyniosą wynik negatywny i tylko taki zmusza nas do ciągłych poszukiwań. Można to skonkludować, że wynik negatywny doświadczenia jest jak najbardziej pozytywnym dla dalszego rozwoju naukowego i rozwoju badań, które prowadzimy.

Materiały i Metody jest rozdziałem opisujacym w wyczerpujący sposób stosowane w pracy analizy badawcze. Ujęte w Metodyce rysunki, tabele oraz zdjęcia ułatwiają zrozumienie zastosowanych procedur oraz zapewniają przejżystość informacji. Na uwagę zasługuje obszerny panel badawczy obejmujący zarówno tkanki zwierzęce i ludzkie oraz zastosowanie wielu różnorodnych, nowoczesnych metod -analitycznych. Wsakazuje to na ogromne zaangażowanie kadry naukowej, wysokie standardy badawcze i znakomitą infrastrukturę badawczą Zakładu, w którym Doktorantka wykonała badania. Zaprezentowana w pracy metodyka badań począwszy od badań *in vivo*, poprzez izolację, charakterystykę fenotypową oraz sortowanie komórek skóry *ex vivo*, bardzo wymagającą hodowlę komórkową komórek nabłonkowych *in vitro* oraz analizy histologiczne zarówno tkanek mysich jak i ludzkich, pokazują bogactwo umiejętności które Doktorantka nabyła w trakcie wykonywania badań objętych pracą Doktorską.

Wyniki stanowią najbardziej obszerną część pracy, szczegółowo opisującą i prezentującą rezultaty bardzo bogatego programu badawczego. Na podkreślenie zasługują wysokiej jakości szata graficzna i dokumentacja fotograficzna.

W wyniku przeprowadzonych badań początkowo ukierunkowanych na identyfikację komórek o typie VSEL w skórze ludzkiej, Doktorantka zidentyfikowała i scharakteryzowała nieopisaną wcześniej populację komórek naskórka. Analiza ekspresji embrionalnego antygenu powierzchniowego SSEA-4, β1- i α6-integryny oraz antygenu CEA pozwoliła udekumentować, że komórki te rezydują w przewodach wyprowadzających gruczołów potowych a antygen SSEA-4 może stanowić marker dla tych komórek. Na szczególną uwagę zasługuje logika podjętych przez Doktorantkę badań w obrębie izolacji i charakterystyki komórek gruczołów potowych. Ponadto nowoczesność zastosowanych metodologii (*in vivo, ex vivo, in vitro*: hodowle tkankowe i komórkowe) oraz oryginalność i systematyczność pozwoliły na bardzo wnikliwą analizę tych komórek. Bardzo interesujacym, a zarazem przekonywującym podejściem metodycznym weryfikującym obecność oraz wykazującym cechy charakterystyczne komórek była izolacja i hodowla pierwotna komórek gruczołów potowych.

Uwagi:

1. Str. 63 zdanie „W tym celu wyizolowane enzymatycznie....” wymaga przebudowy/korekty gdyż w obecnie formie mówi o eliminacji a nie o wyselekcjonowaniu komórek SSEA-4 pozytywnych, które są przecież tematem analizy.

2. Str. 63 „Badane komórki pochodziły z wycinków skóry..... W opisie wyników uwzględniono.....” ponieważ brakuje zestawu informacji dotyczącej wieku, płci, miejsca pobrania tkanek ludzkich w tym miejscu wskazanym byłoby podać odniesienie np. do tabeli nr 2 (str79). Podobne odniesienie powinno być uwzgłednione na str. 64 „Badane komórki pochodziły z wycinków skóry.....”.

3. Jak wytłumaczyć brak obecności fibroblastów GFP pozytywnych podawanych z komórkami VSEL a wykazaną ich obecność jeżeli podawano same fibroblasty GFP pozytywne aplikowane na rany skórne myszy (Rys. 17 C i 17E)?

4. Biorąc pod uwagę wykazaną obecność GFP pozytywych komórek po podaniu keratynocytów i fibroblastów w obu warstwach skóry: naskórku i skórze właściwej

dlaczego nie zdecydowano się na kombinację podania trzech typów komórek VSEL/keratynocyty/fibroblasty?

5. Proszę o uściślenie/wyjaśnienie rozbieżności pomiędzy opisem Rys. 19 informującym iż „na Integrę DRT podawano komórki VSEL lub keratynocyty" gdyż w tekście Metodyki (str 53) i Wyników (str. 74-75) jest informacja o podaniu komórek pod warstwę Integry.

6. W trakcie procesu gojenia urazów skóry komórki naskórka wędrują pod strupem przykrywając ranę. W tym przypadku komórki podane pod silikonową warstwę wędrują po powierzchni pokrywając silikon. Wymagany byłby komentarz dotyczący tego zjawiska.

Dyskusja poświęcona jest analizie wyników i odniesieniu uzyskanych rezultatów do danych -literarurowych. W mojej opinii Doktorantka wywiązała sie z tego zadania. Jednakże ciekawa byłaby dyskusja dotycząca losu komorek VSEL, które zostały podane do rany a ich obecność nie została zarejestrowana w trakcie analiz tkanek pourazowych. Przedstawiona rozprawa stanowi zamkniętą całość a zarazem otwiera nowe drogi badawcze. Doktorantka w dyskusji wspomniała o potrzebie dodatkowych analiz współlokalizacji antygenu SSEA-4 oraz integryn, a także określenia potencjału różnicowalności komorek SSEA-4 pozytywnych naskórka. Dodatkowo wartościowym byłoby wykonanie barwień w kierunku ekspresji czynników transkrypcyjnych: Nanog czy Oct4 co uzupełniłoby i zweryfikowało dane uzyskane w toku analiz z zastosowaniem cytometri przepływowej.

Najważniejsze Wyniki zostały jasno przedstawione. Korekty jednakże wymaga zastosowanie słownictwa regeneracja/gojenie urazów. Tak jak wspomniano już we wstępie recenzji zjawisko regeneracji skóry czyli odtworzenia tkanek pourazowych z ich architekturą i fizjologią identyczną z tkankami niezranionymi dotyczy tylko skóry płodów ssaków. W każdym innym przypadku mówimy o gojeniu naprawczym. Termin regeneracja może być stosowany w przypadku urazów obejmujących wyłącznie naskórek lecz nie skórę właściwą. Dlatego też korekty wymagają niektóre stwierdzenia, jak np:

Dyskusja - str. 112 linia 11-12;

Najważniejsze Wyniki - str. 116 wynik 3 zamiast „regeneracji" powinno być „gojenia urazów".

Reasumując, rozprawę doktorską autorstwa Pani mgr Julii Borowczyk-Michałowskiej oceniam wysoko zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Na szczególne podkreślenie zasługuje celowość zastosowania nowatorskich metodologii, systematyczna i logiczna analiza i interpretacja uzyskanych wyników oraz konstruktywne wnioski. Uzyskane wyniki

stanowią wartościowy dorobek uzyskany przez Doktorantkę. Pytania i wątpliwości oraz sugestie, które postawiłam w niniejszej recenzji w żadnym stopniu nie wpływaja na pozytywną ocenę całej pracy, a mogą zostać, jak sądzę, zweryfikowane w kolejnych badaniach Doktorantki.

Przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Gawrońska-Kozak