PROF. DR HAB. N. MED. WOJCIECH WOJAKOWSKI
III KATEDRA KARDIOLOGII
ŚLĄSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO
40-635 KATOWICE, ZIOŁOWA 47
TEL/FAX. (032) 252 3930

Katowice, 1 kwietnia 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Julii Borowczyk-Michałowskiej

„Poszukiwanie pluripotencjalnych komórek macierzystych w skórze ludzkiej"

Pierwsza zakończona sukcesem transplantacja szpiku kostnego potwierdziła zdolność komórek macierzystych i progenitorowych (KMP) do regeneracji układu krwiotwórczego. Od tego czasu trwają badania nad zastosowaniem tych komórek w leczeniu uszkodzeń innych narządów, w tym m.in. serca i skóry. Istotą naturalnej zdolności regeneracyjnej różnych narządów jest krążenie szpikowych KMP indukowane odpowiedzią na uraz. Nie mniej ważnym i komplementarnym elementem jest obecność populacji rezydentnych, posiadających zdolności naprawcze KMP w różnych narządach, w tym w skórze ludzkiej. Urazy skóry, głównie oparzenia są poważnym problemem klinicznym. W tym aspekcie bardzo istotne jest poszukiwanie nowych terapii przyspieszających jej gojenie, w tym opartych na indukowaną przez komórki macierzyste regenerację. Wykazanie obecności najbardziej prymitywnej populacji komórek – komórek pluripotencjalnych jest niezwykle ciekawym zagadnieniem badawczym, które może mieć istotne walory poznawcze i praktyczne.
Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Julii Borowczyk-Michałowskiej jest ambitnym projektem mającym na celu ocenę, czy w skórze ludzkiej występują KMP o cechach komórek pluripotencjalnych (m.in. posiadających antygen SSEA-4 i wykazujących ekspresję czynników transkrypcyjnych Oct-4, Nanog), a także, czy egzogenne KMP biorą udział w reakcji naprawczej skóry w modelu

Praca doktorska mgr Julii Borowczyk-Michałowskiej ma układ formalny typowy dla rozprawy doktorskiej. Obejmuje 129 stron (25 stron wstępu, 1 stronę omawiającą założenia i cele pracy, 20 stron omawiających metodykę, 38 stron zawierających wyniki, 14 stron dyskusji oraz 1 stronę zawierającą wnioski). W pracy Autorka powołuje się na 164 pozycji piśmiennictwa z czego większość pozycji pochodzi z ostatnich 5 lat. Na początku pracy Doktorantka zamieściła

wykaz i rozwinięcie stosowanych w pracy skrótów, co istotnie ułatwia jej czytanie. Rozprawa zawiera ponadto 3 tabele i 34 ryciny. Od strony edytorskiej praca jest niezwykle starannie opracowana.

We wstępie Doktorantka omówiła budowę skóry i przydatków, mechanizmy naprawcze skóry i rolę rezydentnych KMP unipotencjalnych w jej regeneracji. Autorka scharakteryzowała także populacje komórek pluripotencjalnych, w tym małych komórek o fenotypie zarodkowych komórek macierzystych (VSEL). Wstęp jest napisany w jasny i kompetentny sposób, a jego konstrukcja ułatwia czytającemu zrozumienie hipotezy badawczej będącej podstawą dysertacji. Sposób w jaki Autorka omawia wymienione zagadnienia świadczy o jego świetnej znajomości tematu. Myślę, że wysokiej wartości merytorycznej wstępu nie umniejszyłoby jego skrócenie, szczególnie we fragmentach nie odnoszących się bezpośrednio do regeneracji tego narządu (np. omawiających budowę warstw skóry).

Założenia i cel pracy zostały sformułowane w sposób jasny i spójny. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest wykazanie, czy w skórze ludzkiej występują komórki o fenotypie komórek pluripotencjalnych (wykazujące ekspresję EEAS-4), ocena ich lokalizacji i ekspresji wygranych genów oraz wykazanie w warunkach modelu zwierzęcego, że biorą udział w reakcji naprawczej po urazie skóry.

Metodyka pracy została opisana w sposób jasny i wyczerpujący. Opis metodyki w pełni pozwala na powtórzenie eksperymentu. Zarówno na pobranie i badanie tkanek ludzkich jak i na doświadczenia na zwierzętach uzyskano odpowiednie zgodny Komisji Bioetyki. W badaniu obecności komórek SSEA-4 w ludzkiej skórze używano wycinków skóry pochodzących z operacji plastycznych, natomiast w modelu gojenia ran także komórek VSEL izolowanych ze szpiku kostnego myszy.

W badaniu regeneracji skóry użyto mysi model gojenia ran i zastosowano komórki VSEL, fibroblasty i keratynocyty, a także biodegradowalny nośnik kolagenowy Integra Dermal Regeneration Template (DRT). Metodyka jest zaplanowana we właściwy sposób. Eksperyment zaplanowano z uwzględnieniem właściwej liczbą zwierząt, kontroli pozytywnych i negatywnych, odpowiedniej liczby powtórzeń eksperymentu oraz komplementarnych metod analitycznych. Oznaczenia cytometryczne zostały wykonane zgodnie z opublikowaną i walidowaną metodyką bramkowania.

Pozwolę sobie zasugerować, żeby przygotowując rozprawę do publikacji w opisie eksperymentu umieścić informację dotyczące biokompatybilności kleju (super glue) używanego do zabezpieczenia opatrunku Tegaderm. Teoretycznie może mieć wpływ na reakcje zapalną wokół blizny i żywotność komórek.

Wyniki zostały opisane w sposób jasny i wyczerpujący. Ryciny są niezwykle starannie wykonane i zawierają wszystkie konieczne informacje. Do analizy wyników użyto właściwych metod statystycznych.

W wyniku wykonanych eksperymentów wykazano:

- obecność w skórze właściwej nie-hematopetycznych komórek SSEA-4 w ludzkiej skórze. Liczba ta była zróżnicowana w zależności od miejsca pobrania próbki skóry (najwięcej w skórze pobranej z brzucha i piersi)

- najprawdopodobniej komórki SSEA-4+ z naskórka pochodzą z ujścia przewodów gruczołów potowych

- niewielka (do 4 na $100x10^3$) liczba komórek SSEA-4 wykazuje koekspresje CD133, ale nie wykazuje ekspresji czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla PSC, czyli nie potwierdzono jednoznacznie hipotezy zakładającej obecność komórek pluripotencjalnych w skórze ludzkiej. Hipoteza ta wymaga dalszej weryfikacji

- nie potwierdzono udziału GFP+ VSEL izolowanych ze szpiku kostnego w reakcji gojenia rany skóry w 2 modelach

Pierwsza obserwacja jest bardzo ciekawa – być może fakt występowania znacznie większej liczby komórek SSEA4 w skórze pobranej z brzucha i piersi może mieć związek – jak pisze Doktorantka z liczbą gruczołów potowych – ale także z nagromadzeniem w tych miejscach bogato unaczynionej tkanki tłuszczowej, która jest bogatym rezerwuarem komórek macierzystych, np. MSC o odmiennych od komórek izolowanych ze szpiku właściwościach (np. mniejszej podatności na procesy starzenia i odporności na stres oksydacyjny). Być może istotna jest również obecność receptorów dla hormonów płciowych w tych tkankach.

Bardzo interesującą i oryginalną konkluzją jest obserwacja, że SSEA-4 może być markerem komórek gruczołów potowych

W dyskusji omówiono wyniki w kontekście aktualnego piśmiennictwa. Doktorantka wykazała się świetną znajomością tematu, a sposób prowadzenia dyskusji jest systematyczny, co ułatwia jej czytanie.
Autorka sformułowała 5 wniosków, które odpowiadają na pytanie postawione w założeniach i celach pracy. Zaproponowanie wnioski są spójne z wynikami analiz i prawidłowo sformułowane.

W mojej opinii badanie będące podstawą przewodu doktorskiego zostało bardzo dobrze zaplanowane i przeprowadzone. Wartość poznawcza i praktyczna jest bardzo duża. Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa spełnia wymogi określone w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych (Dz. U. 65/2003, poz. 595), w związku z czym pozwalam sobie wystąpić do Wysokiej Rady z wnioskiem o dopuszczenie mgr Julii Borowczyk-Michałowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.

Łączę wyrazy szacunku,