UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSYTUT ZOOLOGII
ZAKŁAD CYTOLOGII

*prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko*
*Prodziekan ds. organizacji badań Wydziału Biologii*
*Kierownik Zakładu Cytologii*

Warszawa, 7 października 2018

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Charakterystyka właściwości biologicznych oraz potencjału regeneracyjnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z mysich indukowanych komórek macierzystych w modelu uszkodzenia mięśnia sercowego ”
autorstwa Pani mgr Marty Adamiak

Praca doktorska autorstwa Pani mgr Marty Adamiak została wykonana pod kierunkiem dr hab. Ewy Zuby-Surmy. Podczas jej realizacji Doktorantka dokonała analizy pęcherzyków uwalnianych przez indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS) oraz określiła ich wpływ zarówno na hodowane in vitro komórki śródbłonka jak i in vivo - na uszkodzony mięsień sercowy.

Pomimo że komórki iPS uzyskane zostały po raz pierwszy już 12 lat temu to wiedza na temat ich różnicowania i możliwości ciągle nie jest kompletna. Oprócz badań dotyczących opracowania wydajnych i „prawidłowych” metod ich uzyskiwania i różnicowania podejmowane są analizy dotyczące innych aspektów biologii tych komórek. Przykładem takich prac mogą być te, których wyniki stały się podstawą ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Badania komórek pluripotencjalnych niewątpliwie komplikuje fakt, że nie istnieją dwie identyczne linie komórek iPS czy zarodkowych komórek macierzystych (ES) i z tego powodu ich charakterystyka i potencjał mogą się różnić.

Badania podjęte przez mgr Adamiak były niewątpliwie nowatorskie i objęły precyzyjną analizę pęcherzyków uwalnianych przez komórki iPS oraz określenie możliwości ich zastosowania do poprawy funkcjonowania uszkodzonego mięśnia sercowego. Głównymi celami pracy były: opracowanie metody pozyskiwania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (tzw. iPS-EVs), określenie ich morfologii, zawartości mRNA, miRNA i białek, i zbadanie ich wpływu na śródbłonek oraz uszkodzony mięsień sercowy. Realizacja zaplanowanych badań doprowadziła do powstania pracy wielowątkowej i bardzo obszernej.

Postawione cele mgr Adamiak zrealizowała przeprowadzając szereg dobrze zaplanowanych analiz i doświadczeń. Realizując swoje badania Doktorantka wykorzystała szerokie spektrum technik uzyskiwania i hodowli in vitro komórek iPS oraz komórek środbłonka, biologii molekularnej, transktyptomiki, proteomiki, biologii komórki, różnorodnych metod detekcji antygenów czy składników tkanek w hodowli in vitro lub na skrawkach uzyskanych z mięśnia sercowego, analiza wielkości nanocząstek, zastosowanie mikroskopii sił atomowych. Dane uzyskane z wykorzystaniem tych różnorodnych metod poddane zostały niezbędnym



UW: Dwa stulecia Dobry początek
ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

analizom statystycznym. Tak szeroko zakrojone i wielowątkowe podejście umożliwiło ocenę uzyskanych pęcherzyków i ich wpływu na komórki śródbłonka i tkanki budujące serce.

Rozprawa doktorska pani mgr Adamiak poprzedzona jest obszernym Wstępem. Wprowadza on czytelnika w tematykę chorób układu sercowo-naczyniowego, opisuje i komórki iPS oraz przedstawia historię odkrycia i stan wiedzy na temat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Tematyka pracy doktorskiej została więc wyczerpująco i precyzyjnie przedstawiona. Schematy bardzo dobrze ilustrują Wstęp. Mam zastrzeżenie jedynie do Ryciny 1. Doktorantka, jak wiele innych osób starających się opisać początkowe stadia rozwoju zarodkowego ssaka, sugeruje że przedimplantacyjny zarodek rośnie. Otóż nie. Zygota, morula, a także „młoda" blastocysta mają mniej więcej taką samą średnicę. Bruzdkowanie prowadzi do stopniowego zmniejszania się komórek, nie wiąże się z ich wzrostem. Rozumiem, że schemat ma swoje ograniczenia, ale akurat takiego błędu łatwo uniknąć.

Informacje zawarte w części pracy poświęconej *Materiałom i Metodom* zaprezentowane zostały w jasny sposób. Precyzyjnie i obszernie (ten rozdział zawiera się na 50 stronach) opisane zostały wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. Nie udało mi się jednak znaleźć informacji (a może ją przegapiłam?) ile linii komórek iPS uzyskano i ile z nich wykorzystano w przeprowadzonych badaniach. Jak już wspomniałam każda linia ES czy iPS jest inna – analizy powinny więc obejmować więcej niż jedną linię.

Wyniki zawierają uporządkowany opis przeprowadzonych analiz i doświadczeń oraz uzyskanych rezultatów. Można je podzielić na dwie części. Pierwsza, bardzo obszerna, dotyczy wnikliwych analiz pęcherzyków uwalnianych przez komórki iPS. Druga opisuje badanie wpływu tych pęcherzyków na komórki śródbłonka (in vitro) i mięsień sercowy (in vivo). Niemal wszystkie schematy, wykresy, zdjęcia są bardzo dobrej jakości (te mniej doskonałe wspomnę w dalszej części recenzji), bardzo ułatwiają lekturę pracy i samodzielną analizę wyników.

Część pierwsza, jako analiza pęcherzyków (EVs) uzyskiwanych z niezróżnicowanych komórek iPS nie budzi moich większych wątpliwości. Realizując postawione cele Doktorantka scharakteryzowała najpierw komórki iPS. Potwierdziła ich pluripotencjalny charakter immunolokalizując markery takie jak OCT3/4, NANOG, SOX2, SSEA1 i wykrywając aktywność fosfatazy alkalicznej. Ponadto, stosując cytometrię przepływową określiła odsetek komórek syntetyzujących markery charakterystyczne dla komórek macierzystych. Przeprowadziła także analizę potworniaków uzyskanych z badanych komórek iPS. Nie podano jednak ile potworniaków i z ilu linii komórek iPS uzyskano i przeanalizowano. Ponadto, Autorka błędnie zinterpretowała obraz histologiczny pisząc, że na Rycinie 19B widoczny jest nabłonek pochodzenia endodermalnego i że jest to potworniak „jednolistkowy". Tymczasem wskazany nabłonek pochodzi z ektodermy – i tak zresztą jest identyfikowany w dalszej części pracy (Ryc. 41), a potworniak zawiera także tkankę łączną – a więc tkankę pochodzenia mezodermalnego. Aby ocenić czy potworniak jest „jedno-„ czy "dwulistkowy" (tu muszę nadmienić, że bardzo nie lubię tych określeń) należałoby dokładnie przeanalizować wiele skrawków danego guza. Jeżeli widzimy tkanki wywodzące się z endo-- i mezodermy to jestem pewna, że udałoby nam się znaleźć także tkanki wywodzące się z ektodermy - w rozwoju powstaje ona jako pierwsza. W tym fragmencie pracy mam jeszcze uwagę dotyczącą Ryciny 17A zawiera ona nieczytelny wykres – nie wiadomo co reprezentują osie X i Y.

Kolejny fragment części pierwszej Wyników przedstawia metody izolacji i analiz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Aby określić wielkość pęcherzyków wykorzystano między innymi mikroskopię sił atomowych i metodę śledzenia nanocząstek. Oceniono także ekspresję wybranych transkryptów i białek – porównano poziom badanych cząsteczek w komórkach iPS oraz w pęcherzykach. Najistotniejszym elementem tej części pracy jest globalna analiza ekspresji miRNA w komórkach iPS oraz uzyskanych z nich pęcherzyków. Analiza ta została bardzo dokładnie opisana i od razu przedyskutowana, co nieco zaburza charakter Wyników – fragment przedstawiony na stronie 116 powinien trafić raczej do dyskusji. Nie zmienia to faktu,



UW Dwa stulecia Dobry początek
ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

że przeprowadzona analiza pozwoliła zidentyfikować miRNA zlokalizowane w EVs i wykazać, że część z nich jest charakterystyczna także dla mięśnia sercowego. Jest to zgodne z innymi obserwacjami wskazującymi, że komórki pluripotencjalne mogą syntetyzować także cząsteczki typowe dla komórek różnicujących lub wręcz zróżnicowanych. Jednak poziom ekspresji tych cząsteczek jest zazwyczaj niski na tle ekspresji takich, które są charakterystyczne dla pluripotencji. Analizie transkryptomicznej towarzyszyła analiza proteomiczna. Oba badania pozwoliły na precyzyjne określenie stanu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z komórek iPS. W Wynikach zabrakło mi jednak bardziej obszernego zaprezentowania białek, które wykryto jedynie w pęcherzykach a w Dyskusji bardziej wyczerpującego odniesienia się to różnic jakościowych między komórkami iPS a pochodzącymi z nich EVs. Podsumowując pierwszą część Wyników chciałam podkreślić, że przeprowadzona analiza jest niezwykle precyzyjna i wyczerpująca – jej efekty świetnie opisują uzyskane pęcherzyki. Przedstawione wyniki mogłyby być, w moim odczuciu, treścią niezależnej rozprawy.

Następny etap pracy dotyczył analiz oddziaływania pęcherzyków z komórkami śródbłonka oraz ich wpływu na uszkodzony mięsień sercowy. Doktorantka wykazała, że pęcherzyki są w stanie oddziaływać z hodowanymi in vitro komórkami śródbłonka, nie wpływają na ich zdolność do migracji, ale mają działanie cytoprotekcyjne oraz zwiększają liczbę kapilar tworzonych w hodowli in vitro. Jest to bardzo ważny wynik świadczący o tym, że EVs mogłyby być wykorzystywane w przyszłości do sterowania opisanymi procesami. Końcowy fragment wyników dotyczy analizy wpływu EVs na uszkodzony mięsień sercowy. Badania te, wykonane we współpracy z naukowcami z ośrodka zagranicznego, wykazały że przeszczepienie pęcherzyków poprawia parametry funkcjonalne komory serca. Doktorantka zasugerowała też, że wpływa to pozytywnie na przebudowę mięśnia sercowego. Na podstawie Ryciny 43 trudno jednak postawić taki wniosek. Barwienie metodą Massona nie zostało przeprowadzone najlepiej, na jego podstawie trudno oszacować udział tkanki łącznej. Nie określono także ekspresji genów świadczących o prawidłowej przebudowie mięśnia. Różnice między kontrolą a np. mięśniem, do którego trafiły EVs nie są spektakularne. Widoczny był natomiast wpływ EVs na liczbę naczyń krwionośnych w uszkodzonym sercu – a więc ich zastosowanie może wpływać na funkcjonowanie tego narządu. Mechanizm tego wpływu nie był jednak tematem ocenianej rozprawy.

I w tym miejscu chciałabym zadać pytanie, które w zasadzie powinnam postawić na początku recenzji. Dlaczego Doktorantka zdecydowała się wykorzystać do badań nad wpływem EVs na śródbłonek i mięsień sercowy te pochodzące z niezróżnicowanych komórek iPS? Dlaczego nie analizowała pęcherzyków pochodzących z różnicujących komórek? Dlaczego zdaniem Doktorantki wpływ takich właśnie EVs na śródbłonek lub serce miałby być lepszy niż tych izolowanych np. z kardiomiocytów? O tego rodzaju badaniach Doktorantka wspomina w Dyskusji. Drugie pytanie dotyczy „wyjątkowości" wpływu EVs pochodzących z komórek iPS na regenerujący mięsień sercowy. W pracy zabrakło moim zdaniem istotnej „kontroli" - czyli porównania iPS-EVs z pęcherzykami uzyskanymi na przykład z fibroblastów czy mioblastów C2C12. Pozwoliłoby to stwierdzić czy działanie badanych pęcherzyków jest faktycznie unikatowe.

W zwięzłej i bardzo dobrze przygotowanej Dyskusji wyniki własne zostały przedstawione na tle badań zarówno „macierzystego" zespołu jak innych grup zajmujących się podobną problematyką badawczą. Autorka wykazał się znajomością tematu i z całą pewnością jest ekspertem w dziedzinie prowadzonych przez siebie badań. Przedstawiła także perspektywy dalszych badań wykorzystujących EVs.

Rozprawa została napisana poprawnym językiem. Nie istnieją dzieła idealne, także ta - jak wiele innych - zawiera nieliczne usterki. Głównie są to problemy stylistyczne i związane z użyciem żargonu. Przykładem błędów czy niezręczności są określenia takie jak „według mojej wiedzy" (str. 30), „co istotne z punktu widzenia funkcjonalnego" (str. 36), „probówka ultrawirownicza" (str. 48), „bezsurowiczej" (np. str. 96), „gęstość komórek" (str. 103), „przeważająca komponenta



UW Dwa stulecia Dobry początek
ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

obiektów" (str. 107), „komórki źródłowe" (str. 108), „ten wynik poniekąd zgodny jest" (str. 113), „komórki rodzicielskie" (str. 146) i temu podobne. Chciałam także dodać, że podobnie jak nie wyróżniamy tkanki mózgowej, nerkowej, czy wątrobowej, tak samo nie wyróżniamy tkanki sercowej. Jest to mięsień poprzecznie prążkowany, mięsień sercowy.

Podsumowując, pani mgr Marta Adamiak zrealizowała wszystkie postawione cele. Otrzymane wyniki dostarczają obszernej wiedzy na temat pęcherzyków pochodzących z komórek iPS oraz możliwości ich wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Wnioski końcowe znajdują poparcie w przedstawionych wynikach. Z cała pewnością można uznać przeprowadzone analizy za nowatorskie i dobrze udokumentowane. Część uzyskanych wyników została już opublikowana, inne zapewne staną się podstawą do dalszych badań i publikacji. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Marty Adamiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



UW Dwa stulecia Dobry początek
ul. Ilji Miecznikowa 1, pokój 216C, 02-096 Warszawa
tel. 22 55 42 216, fax: 22 55 42 202
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl