KATEDRA FIZJOPATOLOGII

ZAKŁAD PATOLOGII OGÓLNEJ

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY w Szczecinie

70-111 Szczecin tel. (091) 466-15-46

Al. Powstańców Wlkp. 72 tel./fax (091) 466-15-48

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Karnas pt. "Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych na potencjał hematopoetyczny krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej"

Praca jest obszerną dysertacją, liczącą 189 stron, w rozdziale piśmiennictwo zawiera 529 pozycji, 22 tabele, 44 ryciny. Praca napisana jest dobrą polszczyzną, poprzedzona spisem treści, zawiera streszczenie w językach polskim i angielskim oraz wykaz ważniejszych skrótów używanych w pracy. Rozprawa, jej układ treści, układ rozdziałów oraz opracowanie graficzne są przejrzyste, bardzo starannie zredagowane zgodnie z ogólnie przyjętymi wymogami prac doktorskich. Cytowane piśmiennictwo jest adekwatne do treści, a ponad 25%, z ogólnej liczby ujętych referencji, opublikowana została w ciągu ostatnich pięciu lat.

We wstępie liczącym 37 stron mgr Elżbieta Karnas komunikatywnie i jasno przedstawiła zarys biologii i fizjologii krwiotwórczych komórek macierzystych. Szeroko scharakteryzowała krew pępowinową jako uznane źródło komórek macierzystych do przeszczepień. Zdefiniowała i opisała ponadto pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zwracając szczególną uwagę na ich funkcję parakrynną w wymianie informacji pomiędzy komórkami. Uwagę zwraca jednak brak jakiejkolwiek wzmianki na temat stosowanej coraz szerzej, także w Polsce, strategii transplantacyjnej z wykorzystaniem tzw. dawców haploidentycznych, co dość skutecznie zminimalizowało problem braku potencjalnych dawców komórek. Niezależnie od tej uwagi, wstęp stanowi interesujący i szeroko ujęty przegląd informacji obejmujący aktualny stan wiedzy na temat krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej, w odniesieniu także do czynności parakrynnej.

Jako główny cel Doktorantka postawiła sobie ocenę wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskanych z ustalonej linii ludzkich indukowanych komórek

pluripotencjalnych (hiPS-EVs) na właściwości biologiczne i potencjał krwiotwórczy komórek macierzystych krwi pępowinowej.

Schorzenia hematoonkologiczne, a także szeroko pojęte choroby układu krwiotwórczego są wciąż dużym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Pomimo postępu jaki dokonał się, zwłaszcza w ostatnich 15 latach, zarówno w dynamicznym pogłębianiu wiedzy jak i wprowadzaniu do praktyki klinicznej nowoczesnych leków i schematów terapeutycznych, u wielu pacjentów napotyka się problemy z uzyskaniem trwałego wyleczenia lub długotrwałej remisji. W wielu przypadkach standardem leczenia i jedyną szansą jest przeszczepienie komórek krwiotwórczych po zastosowaniu megadawkowej chemioterapii. Odległe skutki współcześnie dostępnego leczenia w niektórych jednostkach chorobowych wciąż nie są jednak optymalne. Istotnym punktem i warunkiem powodzenia przeszczepienia jest dostęp do zgodnych antygenowo komórek krwiotwórczych od dawcy. Krew pępowinowa stanowi alternatywne źródło komórek wykorzystywanych także u dorosłych biorców, u których nie można znaleźć zgodnego rodzinnego lub niespokrewnionego dawcy szpiku. Pomimo swoich niewątpliwych zalet krew pępowinowa ma jednak istotne ograniczenia, m.in. w postaci względnie niewielkiej liczby komórek oraz w konsekwencji wydłużonego czasu rekonstytucji czynności krwiotwórczej szpiku u biorcy. W świetle tego zadanie, jakiego podjęła się Doktorantka, ukazuje się jako niezwykle aktualne i pożądane zarówno dla naukowca jak i klinicysty. Badania, które przyczyniają się do pokonania lub zminimalizowania tych problemów mogą mieć bowiem ważne przełożenie na praktykę kliniczną. Pragnę w tym miejscu podkreślić, że rozpoznawalny w świecie wkład w obszarze roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w szeroko pojętym obszarze medycyny regeneracyjnej wniosły badania naukowe prowadzone przez zespół p. prof. Ewy Zuby-Surmy z Zakładu Biologii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Badania eksperymentalne Doktorantka przeprowadziła w warunkach *in vitro* oraz *in vivo,* w dobrze zdefiniowanych modelach badawczych, w tym także zwierzęcym, z użyciem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskiwanych z hiPS oraz komórek krwiotwórczych ludzkiej krwi pępowinowej. Szczególną uwagę zwraca szeroka, bogata i wyczerpująca analiza funkcjonalna, morfologiczna, immunohisto- i cytochemiczna oraz molekularna komórek i tkanek na wszystkich kluczowych etapach przeprowadzonych badań. Uwagę zwraca spójność i logika przeprowadzonych kolejnych doświadczeń oraz ogromny wkład pracy włożony w

realizację projektu. W tekście nie doszukałem się jednak informacji na temat uzyskania zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań. W całokształcie, wybrane przez Doktorantkę metody spełniają kryteria adekwatnie dobranych, nowoczesnych narzędzi badawczych do realizacji postawionych sobie celów.

Wyniki przedstawiono w postaci tabel, rycin oraz dokładnie omówiono w tekście. Należy raz jeszcze podkreślić niezwykle szeroką i interesującą gamę zastosowanych technik badawczych w celu uzyskania wiarygodnych wyników, które następnie w dyskusji porównano w sposób krytyczny z tymi, które do tej pory uzyskali inni badacze.

Na podstawie bardzo dobrze zaprojektowanych i niezwykle starannie wykonanych badań Doktorantka wykazała szczególną przydatność zastosowania hiPS-EVs, które oddziaływując z komórkami krwiotwórczymi krwi pępowinowej, wpływają na ich właściwości funkcjonalne korzystne w efektywnej rekonstytucji krwiotworzenia po przeszczepieniu.

Reasumując, jest to bardzo dobrze wykonana, nowoczesna praca badawcza dająca ważne, praktyczne obserwacje dla naukowców i klinicystów zajmujących się leczeniem pacjentów z ciężkimi schorzeniami hematologicznymi wymagającymi transplantacji komórek hematopoetycznych. Wykonana jest z użyciem dobrze wystandaryzowanych metod badawczych, gwarantujących rzetelność przedstawionych wniosków. W związku z powyższym Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie przedkładam wniosek o dopuszczenie mgr Elżbiety Karnas do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na nowatorski charakter badań, wysoką wartość poznawczą oraz staranność kompleksowość opracowania materiału, pragnę zwrócić się z prośbą o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

Bogusław Machaliński