UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Zoologii Zakład Cytologii
prof. dr hab. Maria Anna Ciemerych-Litwinienko

Warszawa, 31 grudnia 2018

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej: „Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego do celów regeneracji tkanek " autorstwa Pani mgr Anny Łabędź-Masłowskiej

Praca doktorska autorstwa Pani mgr Anny Łabędź-Masłowskiej powstała w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, a jej promotorem była dr hab. Ewa Zuba-Surma. To kolejny projekt tej grupy poświęcony mikropęcherzykom uwalnianym przez komórki oraz ich wpływowi na funkcję śródbłonka naczyń serca i uszkodzonych tkanek.

W badaniach opisanych w pracy doktorskiej analizowane były komórki izolowane ze szpiku kostnego, określane jako MSC (od ang. Mesenchymal Stem lub Stromal Cells). Dostępna wiedza na temat tych komórek jest obszerna, a ponadto obecnie testowane są one w wielu badaniach klinicznych mających na celu między innymi poprawę regeneracji różnych. Prowadzone prace mają na celu także ocenę możliwości wykorzystania w terapii pęcherzyków uwalnianych przez komórki, takie jak komórki macierzyste. Badania podjęte przez mgr Łabędź-Masłowską dotyczyły właśnie tej tematyki. Ich celem było uzyskanie, oczyszczenie oraz określenie morfologii, zawartości mRNA, miRNA, białek, zbadanie wpływu na śródbłonek czy uszkodzone tkanki, pęcherzyków uwalnianych przez mysie MSC. Realizacja zamierzeń pracy doprowadziła do powstania wielowątkowej rozprawy doktorskiej.

Postawione cele mgr Łabędź-Masłowska zrealizowała przeprowadzając szereg dobrze zaplanowanych badań, w których wykorzystała liczne techniki współczesnej biologii komórki, biologii molekularnej a także te konieczne do przeprowadzenia eksperymentów na zwierzętach doświadczalnych. Do szerokiego spektrum zastosowanych metod zaliczają się m.in. hodowle komórkowe, techniki różnicowania MSC in vitro, izolacji i analiz pęcherzyków z MSC, qPCR, cytometria przepływowa, Western blotting, różnego rodzaju mikroskopia, techniki histologiczne i wiele innych. Uzyskany materiał poddano także analizie transkryptomicznej i proteomicznej. Otrzymane dane poddane zostały analizom statystycznym.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

Wstęp do rozprawy doktorskiej wprowadza czytelnika w tematykę chorób układu sercowo-naczyniowego, opisuje różnego rodzaju komórki macierzyste, w tym MSC, i ich działanie podczas regeneracji niedotlenionych tkanek, oraz przedstawia aktualny stan wiedzy na temat pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Jest on ilustrowany dobrymi ilustracjami o spójnej stylistyce, zawiera też tabele w klarowny sposób podsumowujące prezentowaną wiedzę. Ten fragment zawiera wszystkie istotne dla zrozumienia pracy wiadomości i świadczy o rozległej wiedzy Doktorantki. ***Materiały i Metody*** klarownie i obszernie prezentują wykorzystane odczynniki i zastosowane techniki. Nie udało mi się jednak znaleźć informacji (a może ją przegapiłam?) z ilu myszy izolowano MSC czy komórki śródbłonka, ile myszy wykorzystano w badaniach uszkodzenia mięśnia sercowego i niedokrwienia kończyn? W tabelach 18, 19, 20, 21 podano ile grup zwierząt analizowano, nie jest jasne jak liczne były te grupy. Pewnych danych dostarcza tabela 22, w której wymieniono 9 myszy. Taka informacja powinna znaleźć się we wszystkich zestawieniach wyników, tak aby było jasne, że badane grupy miały odpowiednią liczebność.

Wyniki zawierają uporządkowany opis przeprowadzonych analiz i doświadczeń oraz uzyskanych rezultatów. Opisując uzyskane dane Doktorantka stosuje podział dosyć oczywisty – najpierw przedstawione są analizy pęcherzyków uwalnianych przez MSC, następnie prezentowany jest opis wpływu tych pęcherzyków na komórki śródbłonka (in vitro) oraz uszkodzony mięsień sercowy lub kończynę myszy (in vivo). Wyniki ilustrowane są bardzo dobrej jakości rycinami i tabelami co rzecz jasna ułatwia lekturę tej obszernej pracy i samodzielną analizę danych.

Część pierwsza ***Wyników*** to opis analizy MSC oraz uzyskanych z nich pęcherzyków (EVs). Realizując postawione cele Doktorantka scharakteryzowała MSC bazując na już dostępnych danych na temat antygenów charakterystycznych dla tych właśnie komórek. Oceniła także zdolność różnicowania MSC w chondroblasty, osteoblasty czy adipoblasty. Barwienie błękitem alcjanu mające świadczyć o obecności chondroblastów nie jest jednak zbyt przekonujące. Zarówno tło jak i komórki są niebieskie. Trudno więc ocenić czy detekcja jest specyficzna. Nie mniej jednak pozostałe analizy dokumentują, że badane komórki mają zdolność do różnicowania w osteoblasty czy adipoblasty. Kolejny fragment doktoratu przedstawia analizę pęcherzyków izolowanych z MSC. Badania te wykazały, że uzyskiwano pęcherzyki o podobnej wielkości, ok 190 nm. Dalsza charakterystyka wykazała, że pęcherzyki syntetyzują antygeny charakterystyczne dla EVs (CD9 czy syntenina-1). Nie do końca rozumiem jednak wykorzystanie beta-aktyny jako kontroli w przedstawionych analizach Western blotting (str. 89). Doktorantka wspomina, że jej zastosowanie nie jest idealne dla standaryzacji próbek. Czy nie skuteczniejsze byłoby wybarwienie membrany, na której znajdują się białka, roztworem czerwieni (Ponceau S)? Kolejne analizy dotyczyły określenia globalnej ekspresji białek w izolowanych z MSC pęcherzykach. Pierwsza, bardziej zgrubna, wykazała, że uzyskane preparaty zawierają białka często identyfikowane w egzosomach (np.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

tetraspaniny). Dalsze analizy wykazały w jakie białka wzbogacone są pęcherzyki. Wykorzystując aplikacje Gene Ontology oraz STRING stwierdzono, że białka te zaangażowane są w adhezję i komunikację międzykomórkową, przekazywanie sygnałów, odpowiedź na stres czy procesy związane z gojeniem się ran. Co ciekawe białka związane z przekazywaniem sygnałów to te zaangażowane w szlaki zależne od EGF, VEGF, czy PGF, a więc mogące mieć związek także z regulacją angiogenezy. Jednocześnie wykazano, że MSC i uzyskane z nich pęcherzyki nie różnią się znacząco pod względem syntetyzowanych miRNA. Zidentyfikowano 162 miRNA obecne zarówno w MSC jak i MSC-EVs oraz takie, które są reprezentowane niemal wyłącznie albo w pęcherzykach albo w MSC. Doktorantka skupiła się na wyłowieniu tych miRNA, które mogłyby sprzyjać angiogenezie czy regeneracji tkanek. Kolejna analiza była bardziej „celowana" i dotyczyła określenia poziomu ekspresji transkryptów kodujących białka zaangażowane w regulację apoptozy, angiogenezy, czy kardiomiogenezy. Wszystkie badane mRNA były obecne zarówno w MSC jak i MSC-EVs. Tak więc, stwierdzono że pęcherzyki mogą być „nosicielami" czynników sprzyjających angiogenezie i regeneracji tkanek.

Następny etap badań poświęcony był analizom oddziaływania EVs z komórkami śródbłonka oraz ich wpływowi na uszkodzony mięsień sercowy. Doktorantka wykazała, że pęcherzyki są internalizowane przez hodowane in vitro komórki śródbłonka, zarówno w warunkach kontrolnych jak i w hipoksji, charakterystycznej dla uszkodzonego mięśnia sercowego, oraz w obecności cytokin prozapalnych Il-1b czy TNF-a. Te ostatnie czynniki zwiększały fuzję pęcherzyków z komórkami śródbłonka. Wybrany przez Doktorantkę sposób określania poziomu średniej fluorescencji komórek był jednak bardzo zgrubny, być może wykorzystanie mikroskopu konfokalnego pozwoliłoby na uzyskanie bardziej przekonującej dokumentacji. Kolejne analizy wykazały, że EVs nie obniżają żywotności śródbłonka, a wręcz mają działanie cytoprotekcyjne. Podanie EVs miało także pozytywny wpływ na liczbę kapilar tworzonych w hodowli in vitro. Wynik ten jest analogiczny do uzyskanego w innych badaniach prowadzonych przez zespół dr hab. Zuby-Surmy, które dotyczyły pęcherzyków uzyskiwanych z komórek iPS. Wykazano także, że hodowla w środowisku symulującym stan zapalny, w obecności EVs, powoduje wzrost ekspresji markerów aktywowanego śródbłonka.

Ostatnia część pracy dotyczyła analizy wpływu EVs na uszkodzony mięsień sercowy oraz uszkodzoną przez niedokrwienie kończynę myszy. Badania te, wykonane we współpracy z naukowcami z ośrodka zagranicznego, wykazały że pęcherzyki podane dożylnie lokalizowały się w wątrobie, nerkach, płucach i śledzionie myszy, jedynie niewielkie ilości były wykrywane w sercu. EVs trafiały także do kończyn myszy, u których przeprowadzono zabieg prowadzący do ich niedokrwiennego uszkodzenia. Dożylne podanie EVs prowadziło do wzrostu perfuzji uszkodzonej kończyny, nie towarzyszyły temu jednak zmiany w ekspresji VEGF, w czasie w którym przeprowadzono badanie (21 dni po uszkodzeniu).

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl

Doktorantka, słusznie zauważa, że wybrano niewłaściwy moment badania poziomu tego czynnika wzrostu. Analiza powinna być przeprowadzona wcześniej. W tkankach obserwowano także wzrost poziomu NO. Ocenę wpływu EVs na funkcjonowanie uszkodzonego mięśnia sercowego przeprowadzono podając je bezpośrednio do miejsca uszkodzenia. Wykazano ich pozytywny wpływ na parametry funkcjonalne komory serca. Zaobserwowano także wzrost grubości ściany uszkodzonej komory. Doktorantka zasugerowała, że EVs mają wpływ na ograniczenie powstawania blizny pozawałowej. Nie pokazała jednak żadnych danych wskazujących na taki stan rzeczy. Preparaty histologiczne przedstawione na Rycinie 37 nie pozwalają na wyciągnięcie takiego wniosku.

W ***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 analiz wykorzystujących EVs. Za wadę mogę uznać jedynie zbyt obszerne (i niepotrzebne) powtarzanie wyników własnych, kosztem dyskusji na ich temat.

Praca doktorska została napisana poprawnym językiem. Zawiera jedynie nieliczne usterki. Autorka, jak wielu innych autorów doktoratów i nie tylko, nie ustrzegła się żargonu czy niezręcznych tłumaczeń z języka angielskiego. Przykładem niezręczności są określenia takie jak „w porównaniu do procentu przeżycia" (str. 36), „kolekcjonowanie pożywek" (str. 48), „w kolejnym kroku, zwierzętom otwierano ..." (str. 65) „myszy w eksperymencie" (str. 75), „wypasażowują się" (str. 81), „komórek MSC wyizolowanych poprzez adhezję" (str. 81), „bezsurowicza" (np. 85), EVs „podane dożylnie w mysim modelu" (str. 124). Ponadto, chciałam zwrócić uwagę, że skrót MSC zawiera już wyraz komórka. W określeniu „komórka MSC" jest więc o jedna komórka za dużo. Nie wiem też co kryje się pod określeniem „tkanki mięśniowe" (np. str. 137).

Podsumowując, pani mgr Anna Łabędź-Masłowska zrealizowała wszystkie postawione cele pracy doktorskiej. Otrzymane wyniki dostarczają obszernej i co istotne nowej wiedzy na temat pęcherzyków pochodzących z MSC oraz możliwości ich wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Wnioski końcowe znajdują poparcie w przedstawionych wynikach. Z cała pewnością można uznać pracę za nowatorską a wyniki za bardzo dobrze udokumentowane. Część z nich została już opublikowana. 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 Anny Łabędź-Masłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. A. Ciemerych

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 42 216
e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl