Recenzja
pracy doktorskiej mgr Anny Łabędź-Masłowskiej pt. „Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego dla celów regeneracji tkanek"

Uprzejmie dziękuję Wysokiej Radzie Wydziału Biochemii, Biofozyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za powierzenie mi recenzowania tej dysertacji. Przedstawiona praca doktorska wydaje się sygnalizować poważny i aktualny problem badawczy jakim są badania tzw. mikropęcherzyków, pochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych. Należy się zgodzić, że mikropęcherzyki mogą stać się istotnym biologicznym narzędziem adiuwantowym w terapiach pro-regeneracyjnych. Przykładowo mogą one oddziaływać na narządy schowane za barierą tkankową (np. krew mózg) ze względu na swoją wielkość, również w naczyniach obwodowych małego kalibru, a także mogą służyć jako przygotowanie (prekondycjonowanie) układu naprawczego tkanek i narządów do następowej terapii komórkowo-strukturalnej. W pracy udokumentowano możliwy korzystny wpływ mikropęcherzyków w terapii ostrego niedokrwienia w mysim modelu pozawałowym oraz w mysim modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny, zwłaszcza w przypadku tego ostatniego posługiwanie się mikropęcherzykami może wyeliminować pojawiające się zjawiska zatorowo-zakrzepowe przy podawaniu dotętniczym do naczyń obwodowych, komórek macierzystych. Mikropęcherzyki mogą też być bardziej wydajnym układem sygnalizacyjnym dla skoordynowanego wysiłku pro-regeneracyjnego organizmu poprzez indukcję odpowiednich genów czy też czynników regulatorowydch. Na drodze może stanąć problem standaryzacji, albowiem optymalne procedury powtarzalnego składu indukowanych mikropęcherzyków nie są jeszcze dostępne, a wielość czynników mogących wpływać na ich zawartość (np. warunki tlenowe czy stan red-oks) – olbrzymia. Niemniej pracę (poza rozdziałem dotyczącym Materiału i Metod) czyta się z przyjemnością. W dysertacji można jednak napotkać dość dużą liczbę nieprecyzyjnych wyrażeń i odniesień. Nadużywane jest określenie „profil wieloantygenowy" MSC, podczas gdy tematyka badawcza nie dotyczy antygenów czy układu odpornościowego wobec nich występującego a raczej białek markerowych określających tożsamość badanych komórek mezenchymalnych, czy tez wydzielanych przez nie pęcherzyków (str. 11). Również w angielskim abstrakcie znajduję trochę niezręczności językowych, a w nich mowa o „several factors" for paracrine secretion, podczas gdy jest ich raczej „multiple factors" a nawet „plethora of factors".
We wstępie, który na ogół czyta się płynnie pojawiają się niektóre irytujące wyrażenia, typu „perfuzja krwi", otóż zwracam uwagę, że słowo perfuzja używa się stosownie wobec tkanki lub narządu np. perfuzja serca, perfuzja kończyny, natomiast perfuzja krwi jest mylącym odniesieniem do sformułowania „przepływ krwi" lub „dopływ krwi". Wolałbym również aby doktorantka używała wyrażeń bardziej ostrożnych jak leczenie „pro-regeneracyjne", nie zas regeneracyjne, zwłaszcza, że w całej dysrtacji nie ma silnych dowodów na osiagniętą regenerację narządową, która wina być udokumentowana

histologicznie, są za to dowody na poprawę funkcjonowania narządów. Tak samo wyrażenia „posuwające się procesy degeneracji" (zamiast „nasilające się") sa dosyć niefortunne. Wystrzegałbym się też używania słowa „dawcy" dla osób oddających komórki lub tkanki dla potrzeb badaczych na rzecz „osoby czy osobnicy". Słowo dawstwo jest zastrzeżone dla innych sytuacji, np. honorowy dwaca krwi. Unikałbym dookreślania typu „fenotyp wieloantygenowy" na rzecz „markerów komórkowych" czy fenotypu komórek, dotyczy to także poprzedniej części mojego komentarza. Str 24/25 – nie wiem czy istnieją definitywne dowody na „transróżnicowanie" komórek mezenchymalnych w kardiomiocyty, raczej na ich fuzję z komórkami docelowymi lub też adhezję i tzw. nanotunelowanie (czyli, przekazywanie swoich organelli komórkowych, o którym to sposobie nie ma we wstępie nawet wzmianki). Na str. 26 wahałbym się przed sformułowaniem, że metaloproteinazy (MMP-2 czy MMP-9) hamują patologiczną przebudowę serca (str. 26), ja bym raczej sugerował, że robią to ich tkankowe inhibitory (*czyli TIMP-y, jakkolwiek metaloproteinazy mogą między sobą oddziaływać na zasadzie sprzężeń zwrotnych - ale tego odniesienia raczej w pracy brakuje). Czego mi także brakuje we wprowadzeniu to definitywne stwierdzenie, że tetraspaniny nie różnicują jednoznacznie ektosomów od egzosomów, przeto określanie ich ekspresji nie jest wiążącą procedurą w tym zakresie. Ten problem wypływa znacznie później w pracy. Brakuje także definicji i wprowadzenia do kwestii formowania się naczyń, do których to procesów doktorantka nieustannie nawiązuje w dysertacji. Zatem jaka jest różnica wg doktorantki w substancjach regulujących proces angiogenezy (Tabela II w załącznikach) od białek regulujących powstawanie nowych naczyń (referencje w Tabeli III). Czy to oznacza, że tabela III odróżnia proces powstawania nowych naczyń (neonagiogeneza czy waskulogeneza) od naczyń powstających drogą angiogenezy? Rycina 6 winna być bardziej uszczegółowiona w opisie – wariaat „przenoszenie białek" jest zbyt ogólnikowy, zdaje się ,że chodziło tu akurat o „zwłaszcza białka enzymatyczne" i inne poza „receptorami błonowymi". Nie wiem też dlaczego na str. 37 doktorantka sugeruje , że główną drogą podawania KM sa preparaty domięśniowe? Skoro w skonstruowanej przez nią samą tabeli 5 – jest przewaga podań donaczyniowych. W celach pracy, uważam , że punkt 4 jest napisany niestylistycznie, natomiast jeśli chodzi „o poziom aktywacji" – to nie ma dookreślenia których substancji/procesów on dotyczy? Proponowałbym też raczej pisać o badaniach przedklinicznych niż o modelach przedklinicznych – wiadomo, że układy modelowe badań przedklinicznych mogą być różne, ale zawsze są one przeprowadzane w układach ze zwierzętami.
O ile Wstęp czyta się płynnie, to Materiał i Metody - źle. Razi stałe używanie wyrazów żargonowych typu „pelet" zamiast „osad", zamiast zawiesiny „jednolitej" winno się używać „homogennej lub jednorodnej", nieustannie doktorantka zapomina o tym, że używa roztworów a nie „mieszanin", probówki nie są „wirownicze", ale „wirówkowe", Tkanki nie sa „niestrawione" – co najwyżej są to resztki lub pozostałości tkankowe, komórki nie podaje się w gęstości, ale o danej koncentracji, względnie podaje się po prostu ich liczebność. Z innych wyrażeń doktorantka używa określenia „powierzchnia plastiku hodowlanego", komórki wg niej „zaokrąglają się" a nie przyjmują kształty kuliste, bądź sferyczne. Następnie „komórki wysiewano w stosunku ilościowym 1:2 (ale nie wiadomo czego ten stosunek dotyczy, a wszystkie przykłady

podałem, niestety, tylko z jednej strony. Czyli, masakra!! Nie ma też „speletowania komórek" czy „mikroskopu z kontrastem faz" , „probówki wirowano prędkością", „w celu wykonania kompensacji kolorów", „nakraplano pojedyncze krople", „triplikat" Po prostu doktorantka nie udzieliła tem rozdziałowi należytej uwagi, stwierdzam to z przykrością! W tabeli 8 nie jest też precyzyjnie opisana natura przeciwciała II-rzędowego, przedstawiony jest opis źródła, zamiast tego, że interesuje nas zwłaszcza fakt , że reaguje ono z przeciwciałem I-rzędowym. W tabeli 18 interesuje mnie zwłaszcza pozycja 8 (opis tabeli i skróty wymagają rozwinięcia), która w sposób jaskrawy rózni się od pozostałych wariantów?! Rozumiem, że jest to kontrola podawania MSC-EV już po 30 minutach, ale w jakim celu?, przy czym mierzony czas retencji powinien być sprawdzany dłużej niż 48 godzin – czy też sygnały barwienia po 48 godzinach zupełnie wymierają?, a zatem nasuwa się także pytanie o trwałość barwienia barwnikiem DIR. Rycina 10, metodologii obserwacji w ostrym zawale mięśnia sercowego. Rysuje się tu kilka zasadnych pytań, model perfuzji-reperfuzji jest istotnie i szeroko kwestionowany w literaturze, jako nie poddający się łatwej standaryzacji, po 2 dobach mysz ponownie jest otwierana (w naszych Komisjach Bioetycznych ds. Zwierząt kwestionuje się taką operację – uznając czas powrotu myszy do tzw. stanu stabilnego na minimum 3 doby...interesuje mnie również co można wychwycić echokardiograficznie w 2 dobie po zawale? W obliczu pełnej demonstracji stanu zapalnego, który winien naruszać procesy hemodynamiczne, przy czym przedstawiane wyniki nie mają olbrzymiego zakresu rozrzutu... co stanowi dla mnie pewne zskoczenie. Jeśli chodzi o demonstrację stanu ostrego niedokrwienia kończyny, opis (str 72) jest jakby niezgodny z ryciną 11. W opisie przecięcie dokonywane jest w połowie wysokości uda, a na rycinie w połowie długości tętnicy udowej + podkolanowej? Czy może się mylę? Chciałbym też zapytać o źródło wzoru optymalizującego podanie odpowiedniej koncentracji pęcherzyków? Czy przeprowadzano własny system optymalizacji poprzez miareczkowanie? W stosunku do ewentualnego mechanizmu polepszenia funkcjonowania kończyny?

Dział Wyniki (interesujący) otwiera się znowu od znajomych lapsusów językowych, na stronie 81 – „hodowle wykazują swoiste zanieczyszczenie" a komórki „wypasażowują się" itd., „swoisty" kontredans trwa. Co do treści merytorycznych autorka z przekonaniem dokumentuje tożsamość mysich komórek mezenchymalnych, zaznaczając, że odbywa się to poprzez przyrównanie (homologię) z odpowiednikami ludzkimi. Jednak w pierwszej zaraz rycinie (ryc 13) nie ma omawianych przez Nią cytogramu dotyczącego markera VEGFR2. Zwraca uwagę niski poziom SDF-1 na komórkach mezenchymalnych, co może tłumaczyć ulotne zasiedlanie się (tych komórek i pochodzących z nich mikropęcherzyków) w narządach poddanych ostremu niedokrwieniu. Pogarsza się żywotność przy kondycjonowaniu KM dla pozyskania MSC-EV, ale cykle komórkowe dla kondycjonowanych i standardowych warunków hodowli są porównywalne. Izolaty MSC-EV oceniane techniką AFM (ang. *Atomic force microscopy*) potwierdziły ich obecność i morfologię, zaś technika TRPS rozkład wielkości (heterogenny), uwzględniający zarówno ektosomy jak i egzosomy. Markery EV z grubsza potwierdzają mieszaninę mikropecherzyków, jednak nie sa zdefiniowane ich proporcje. Syntenina-1 wydaje się być charakterystyczna dla izolowanych

mikropęcherzyków, natomiast tetraspanina CD9 nie róznicuje egzosomów od ektosomów. Doktorantka podaje charakterystykę 100 białek z analizy proteomowej MSC-EV, nie podaje jednak w jakim stopniu uzyskała ona zgodność z dotąd raportowanymi. Potwierdzono zgodność występowania białek wspólnych dla MSC oraz MSC-EV, z pewną wybiórczością w stosunku do mikropęcherzyków, jak np. VEGF, z czego wyprowadzono wnioskowanie o właściwościach pro-angiogennych dla MSC-EV, wyższych niż te które przydają same komórki mezenchymalne. W globalnej analizie proteomu zidentyfikowano 818 białek wspólnych i 135 białek wzbogaconych dla frakcji MSC-EV. Scharakteryzowano 3 grupy białek funkcjonalnych, przy czym zamiast „składnika komórkowego" proponuję składnik, bądź „element strukturalny", a określenie „funkcja molekularna" w ogóle mi się nie podoba. Z analizowanych szlaków sygnałowych doktorantka zwłaszcza wyodrębnia te związane z angiogenezą, jednak jak zauważyłem wcześniej nie podaje ona definicji angiogenezy ani pokrewnych szlaków formowania się naczyń, przez co nie wiemy na ile on jest swoisty, a na ile wtórny. Można podsumować, że w przypadku MSC-EV główne ich komponenty zorientowane są na adhezję komórkową, gojenie się ran/uszkodzeń oraz rozwój nowych naczyń krwionośnych. Bardzo cennym elementem pracy jest wyodrębnienie genów interaktomowych, odpowiedzialnych za adhezję i pozostałe funkcje ugrupowane w procesy pro-regeneracyjne. Analiza transkryptomowa miRNA ukazuje 162 cząsteczki wspólne dla MSC i MSC-EV oraz 10 cząsteczek unikatowych dla MSC-EV, z czego cześć zaangażowana jest w procesy nieswoiste (rozrostowo-nowotworowe), a część pro-angiogennie i pro-regeneracyjnie wobec miokardium. To wnioskowanie powtarza się przy charakterystyce transkryptów zawartych w mikropęcherzykach. Dalsze zachowanie się biologiczne (i potencjalne funkcje) mikropecherzyków były charakteryzowane w oparciu o ich interakcję ze śródbłonkiem naczyń poddanych warunkom hipoksji i odczynu zapalnego. Na rycinie 28 doktorantka dokumentuje pozytywny efekt stanu zapalnego (reprezentowanego przez inkubację z 2 cytokinami pro-zapalnymi) na internalizację MSC-EV do komórek śródbłonka, jednak ocena żywotności komórek śródbłonka przedstawiona na ryc. 29 jak i wpływu MSC-EV na potencjał pro-angiogenny komórek śródbłonka (ryc. 30) jest już dużo bardziej kontrowersyjna, albowiem udowodniony jest raczej pozytywny wpływ mikropęcherzyków na te funkcje, podczas gdy stan zapalny pozostaje raczej w tle i nie powiększa tego efektu. Pozostaje pytanie – imitacja ostrego stanu zapalnego wydaje się być dużo bardziej skomplikowana niż ta skonstruowana dla potrzeb pracy, bądź też nie jest on elementem pozytywnym dla włączenia się procesów pro-regeneracyjnych. Dalsza dyskusja nt. oddziaływania stanu zapalnego (str. 118) jest bardzo spekulatywna i wskazuje na niejednorodny charakter ekspresji receptorów naczyniowych, co może owocować różnorakimi formami efektorowymi ze strony śródbłonka. Z drugiej strony tłumaczy to też pewne fiasko wprowadzanych terapii genowych z czynnikami pro-angiogennymi na teren pozawałowego miokardium. Wskazuje na to dowodnie rycina 31 dotycząca ekspresji wybranych antygenów aktywowanego zapalnie śródbłonka. Należy tu zwłaszcza odróżnić uproszczony model badawczy in vitro od warunków występujących in vivo (str. 119, truizm). Badania funkcjonalne sa niewątpliwie bardzo ważnym elementem przedstawionej dysertacji. Na stronie

120 pojawia się jak mantra problem trwałości zastosowanego barwienia mikropecherzyków, a w badaniach retencji zwraca uwagę fakt braku odsetkowych porównań retencji dla wymienionych narządów, a więc rozkładu intensywności sygnałów fluorescencyjnych. W tabeli 28 nie ma objaśnień poszczególnych punktów czasowych, wydaje mi się też zwłaszcza, że interakcja EV nie jest zbyt efektywna w niekontrolowanych warunkach stanu zapalnego, a po 48 h od reperfuzji nadal istnieje intensywny stan zapalny, co może nadal wpływać na słabą retencję in situ czynników biologicznych (dodajmy, przy niskiej ekspresji SDF-1). Jestem zaintrygowany (ryc. 35) wysokim poziomem MFI akurat w nerkach. Nie wiem też czy podawanie MSC-EV przez żyłę ogonową jest bardzo polegalne i powtarzalne, można zadac sobie pytanie czy podanie dotętnicze, zwłaszcza przy zablokowaniu właśnie tętnic, nie byłoby bardziej właściwe. Przy analizowaniu potencjału pro-regeneracyjnego MSC-EV, co prawda widzimy na rycinach 36 i 37 poprawę parametrów hemodynamicznych serca po zawale, jednak echokardiograf nie jest właściwym miernikiem regeneracji, tj. można zaryzykować twierdzenie (ryc 36), że obserwowana poprawa na rzecz MSC-EV, nawet lepsza niż w przypadku komórek MSC, jest bardziej spowodowana ożywieniem komórek hibernowanych w miejscu okołozawałowym?! Niż uruchomieniem właściwych procesów regeneracyjnych?! Wynika to z wczesnego zainicjowania (2 doba) podawania tych czynnikow, zaś stosowne meta-analizy dotyczące podawanych KM, świadczą, że proces zapalny jest wobec nich szczególnie detrymentalny, a wyniki pozytywne uzyskuje się raczej dopiero po wszczepieniach, po ok. dniach 7. Jeśli chodzi o ocenę potencjału pro-regeneracyjnego, żałuję, zę nie ma pomiarów funkcjonalnych kończyny po 21 dniach (bez dalszego wstrzykiwania MSC-EV). Jest to kluczowe dla dalszej optymalizacji procedury. Ponieważ rycina 42 wskazuje na wzrost ekspresji ufosforylowanej formy białka eNOS przy niższej ekspresji kaweoliny – 1 zasadnym wydaje się być pytanie odnośnie monitorowania stanu zapalnego śródbłonka w aspekcie wydzielanych rodników peroksyazotynowych. Pojawienie się ich mogłoby świadczyć o identyfikacji „punktu uchwytu" efektywności wzbudzanego stanu zapalnego.

W dyskusji należałoby powtórzyć kilka najważniejszych elementów uzyskanych wyników z krytycznym przyjrzeniem się właściwej roli MSC-EV. Jak słusznie zauważa doktorantka na str. 147 podanie komórtek MSC z nadekspresją miRNA-126 w miejsce uszkodzenia powoduje wzrost angiogenezy oraz poprawe parametrów hemodynamicznych serca na drodze sygnałowania ERK/Akt, co imituje dość dokładnie efekt podawanych MSC-EV. Zaletą mikropęcherzyków jest możliwość ich podawania we wczesnych etapach wykrytego procesu ostrego niedokrwienia, niejako pre-kondycjonując narządy do właściwej terapii strukturalnej z użyciem komórek macierzystych. Zaleta szerokiego kontaktu międzykomórkowego MSC-EV i wpływania na sygnalizację wewnątrzkomórkową (dla amelioracji odczynu) byłaby tu niezmiernie pożytecznym aktem dla optymalizacji protokołów pro-regeneracyjnych. Proces internalizacji MSC-EV w stosunku do nasilenia odczynu zapalnego, który mam wrażenie, na obecnym stadium tej pracy, nie był dobrze monitorowany jest jednym z elementów wymagających dalszych ustaleń, a poziom wydzielanych acz, co sugeruję, monitorowanych rodników, może walnie się do tego przyczynić. Ulotność zasiedlania się MSC-EV w narządach jest jednym z problemów miejscowej terapii pro-regeneracyjnej, ale może być pożądanym

procesem przygotowawczym komunikacji organizmu w trakcie ostrego stresu Z drugiej strony proces przygotowawczy samych MSC-EV może być regulowany w zależności od stanu mikrosrodowiska hodowlanego. Element hipoksji zdaje się tu odgrywać pierwszorzędną rolę. Niewatpliwie przedstawiona praca doktorska jest ważnym głosem w toczącej się ogólnoświatowej dyskusji, pomimo swoich niewątpliwych braków edytorskich. Pomijam fakt, że punkty 4 i 5 podsumowania napisane sa niestylistycznie i niegramatycznie. Jestem absolutnie ciekaw prowadzonej dyskusji przez doktorantkę w atmosferze publicznej obrony. Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Łabędź-Masłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Maciej Kurpisz

Poznań, dnia 19.12. 2018