



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej



Prof. dr hab. Magdalena Kucia

Warszawa, 12.11.2022

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pt:

Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy

Autor: mgr Marlena Tynecka

Dynamiczny rozwój badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC) na przełomie XX i XXI wieku wzbudził zainteresowanie naukowców i klinicystów potencjałem terapeutycznym MSC i potencjalnym wykorzystaniem tych komórek w medycynie regeneracyjnej. Poznanie właściwości biologicznych MSC dało nadzieję na ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej u chorych, u których konwencjonalne możliwości leczenia zostały wyczerpane. Aby zapewnić odpowiednią jakość MSC i jednolity charakter biologiczny MSC, *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* opracowało ujednolicone kryteria biologiczne, które powinny spełniać komórki nazywane „mezenchymalnymi komórkami macierzystymi”. MSCs można pozyskać z wielu tkanek i narządów dorosłego organizmu, jednakże, przed zastosowaniem klinicznym, ich właściwości powinny zostać udokumentowane spełnieniem podstawowych cech biologicznych rekomendowanych przez ISCT.

Prof. dr hab. Magdalena Kucia
Kierownik
ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa
e-mail: medycyna.regeneracyjna@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

MSC można pozyskać ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, krwi pępowinowej, pępowiny, miazgi zębowej, mięśni gładkich, szkieletowych i mięśnia sercowego, okostnej, błony maziowej, skóry właściwej, pericytów, łożyska, krwi obwodowej, więzadeł przyzębia i płynu owodniowego. Wśród nich najpopularniejszy jest szpik kostny, tkanka tłuszczowa, krew pępowinowa oraz galareta Whartona. Podczas izolacji MSC przez plastyczne przyleganie i hodowlę *in vitro* mogą w pewnych warunkach różnicować się w linii komórkowe mezodermalne, takie jak: osteocyty (komórki kostne), chondrocyty (komórki chrząstki) oraz adipocyty (komórki tłuszczowe).

Rośnie liczba prac demonstrujących na modelach zwierzęcych rolę MSC w leczeniu ostrych stanów zapalnych i włóknienia płuc. Pomimo, iż MSC są jednym z głównych narzędzi używanych obecnie w terapii komórkowej, mechanizm ich działania nie do końca został poznany. Wyniki uzyskane podczas badań przedklinicznych i klinicznych przeprowadzonych w ostatnich dziesięcioleciach wyraźnie wskazują, że MSC posiadają wysoką zdolność do immunomodulacji, regeneracji i gojenia uszkodzonych tkanek. MSC regulują wydzielanie parakrynnych czynników wzrostu, cytokin, czynników antyfibroskopowych i mediatorów angiogennych

Obecnie MSC uważa się za terapeutyczną alternatywę w leczeniu wielu zaburzeń, takich jak choroby odpornościowe, zwyrodnieniowe lub traumatyczne. Pomimo udowodnionego bezpieczeństwa, nadal istnieje wiele przeszkód, aby wprowadzić te rodzaje komórek jako leki w terapii komórkowej. Ich natura, zastosowanie i regulacja poprzez niszę lub mikrośrodowiska powinny być dogłębnie przebadane, ponieważ ich funkcjonalność może zmieniać się w zależności od bezpośredniej interakcji z innymi komórkami. Istotne jest zbadanie zachowania różnych populacji MSC w odniesieniu do konkretnych nisz, a nie uogólnienie jej terapeutycznego zastosowania.

Przedstawiona mi do oceny praca *Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy* obejmuje 114 stron maszynopisu. Układ rozprawy jest typowy i podzielony na wstęp zakończony podaniem celu pracy, hipotezy badawczej, zadań badawczych, prezentację wyników ujętych w dwóch opublikowanych artykułach naukowych, dyskusję zakończoną wnioskami końcowymi. W rozprawie autorka odwołuje się do 117 pozycji piśmiennictwa anglojęzycznego.

Na 9 stronach wstępu oraz w załączonej pracy przeglądowej *Stem Cell Reviews and Reports*, w której Doktorantka jest pierwszym autorem, mgr Tynecka wprowadza czytelnika w charakterystykę mezenchymalnych komórek macierzystych oraz opisuje właściwości immunosupresyjne MSC. W kolejnych punktach Doktorantka prezentuje mechanizmy immunomodulacyjne zależne od bezpośrednich oddziaływań komórkowych, czynników rozpuszczalnych z uwzględnieniem mikropęcherzyków błonowych/egzosomów, ponadto omawia mechanizmy regulacji astmatycznego zapalenia płuc za pośrednictwem MSC.

Podział na rozdziały jest przeprowadzony w sposób przejrzysty, umożliwiając zrozumienie i uzasadnienie podjęcia badań będących przedmiotem prezentowanej rozprawy. Uwzględniając, iż analizy przedłożonej rozprawy dotyczyły oceny bezpieczeństwa podawania i mechanizmów działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym

modelu astmy, która jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób na świecie, dotykającą około 10% ludzkiej populacji, brakuje przybliżenia przykładów badań przedklinicznych oraz klinicznych, obrazujących próby włączenia terapii komórkowych w leczenie astmy oskrzelowej.

Chorobę charakteryzuje przewlekły stan zapalny błony śluzowej oskrzeli, prowadzący do ograniczenia przepływu powietrza w drogach oddechowych i powodujący nadreaktywność oskrzeli w reakcji na pospolite bodźce środowiskowe. Przyczyny, uruchomione mechanizmy regulatorowe oraz skutki istniejącego zapalenia w astmie tworzą złożoną sieć wzajemnych oddziaływań i obejmują kaskadę zdarzeń, w którą zaangażowanych jest wiele rodzajów komórek, wydzielanych przez nie czynników oraz mediatorów współdziałających ze sobą i prowadzących do charakterystycznej przebudowy ściany oskrzeli.

Cele pracy zostały jasno i logicznie sformułowane. Doktoranta za główny cel postawiła sobie ocenę bezpieczeństwa stosowania mezenchymalnych komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej w astmie z wykorzystaniem modelu zwierzęcego po wcześniejszej weryfikacji fenotypu, zdolności do różnicowania oraz właściwości immunosupresyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Ponadto Doktorantka poddała ocenie eksperymentalnej potencjalne mechanizmy immunosupresyjnego efektu MSC w modelu astmy indukowanej ekstraktem roztocza kurzu domowego.

Przedstawiony opis materiałów użytych do badań jest drobiazgowy i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Dobór metod badawczych obejmujący techniki cytometrii przepływową, hodowli komórkowych *in vitro*, immunohistochemii oraz mikroskopii konfokalnej, sekwencjonowania nowej generacji oraz odpowiednich modeli zwierzęcych jest adekwatny do obranej tematyki dysertacji i pozwala na eksperymentalną weryfikację obranych celów pracy. Na stronie 45 Doktorantka opisuje model indukcji zapalenia dróg oddechowych o fenotypie eozynofilowym oraz neutrofilowym poprzez podanie myszom szczepu C57BL/6 przez nosowo ekstrakt roztocza kurzu domowego, odpowiednio w dawce 10 ug przez okres 5 dni, po których następowały 2 dni przerwy, po czym w kolejnym tygodniu proces indukcji zapalenia został powtórzony. Nie jest jasne czy zwierzęta otrzymywały dawkę 10 ug dziennie czy łącznie podano myszom 10 ug ekstraktu w trakcie 5 iniekcji jednego cyklu indukcji.

Doktorantka podjęła się ambitnego tematu, którego realizację przeprowadziła z dużą starannością. W pierwszej fazie badań oceniła fenotyp oraz zdolność do różnicowania się MSC pozyskiwanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej. W celu oceny bezpieczeństwa terapii komórkowej w wybranym modelu zwierzęcym astmy, Doktorantka poddała ocenie *in vivo* krótkoterminowy oraz długoterminowy wpływ działania przez nosowego podania MSC myszom z niezmienną zapaleniem tkankę płucną. Wykazała, iż podanie mezenchymalnych komórek macierzystych do niezmiennego zapalenia tkanki płucnej myszy indukuje stan zapalny o niskim nasileniu, któremu towarzyszy usuwanie komórek apoptotycznych przez komórki fagocytarne biorcy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki w eksperymentach na zdrowych płucach myszy po podaniu MSC pokazały wzrost odsetka limfocytów T pomocniczych wytwarzających IFN γ , spadek ekspresji okludyny oraz klaudyny 3 zaangażowanych w utrzymanie integralności bariery nabłonkowej oraz zmiany w profilu transkrypcyjnym czynników regulujących równowagę redoks, aktywację szlaków przekazu sygnału w warunkach hipoksji oraz aktywacji potencjału fagocytarnego makrofagów.

Następnie Doktorantka poddała analizie ekspresję wspólnych genach, charakterystycznych dla obu modeli astmy – krótko- oraz długoterminowego. Po pierwsze, wykazała niewielką liczbę interakcji między analizowanymi genami, które głównie odzwierciedlają zmiany w regulacji odpowiedzi immunologicznej, a mianowicie funkcji komórek dendrytycznych, komórek T i komórek B (*Cd7*, *Cd37*, *Cd72*, *Cd79a*, *Spib* i *Il-21r*, *Cxcr5*, *Ccl5*, *Zbp1*). Ponadto zanotowała sieć interakcji dla biogenezy rybosomów oraz regulacji cyklu komórkowego (*Rrs1*, *Gpatch4*, *Trp35*, *Ncl*, *Rasl11a*, *Rbm38*, *Hist1h1b*), białek szoku (*Cirbp*, *Hspb6*) oraz rytmu okołodobowego (*Dbp*, *Arntl*, *Npas2*, *Nfil3*). Ponadto zanotowała stosunkowo istotną zmianę w ekspresji *Trp53*, która jest uznawana za ważny czynnik przyczyniający się do martwicy wywołanej stresem oksydacyjnym. Dodatkowo zaobserwowała istotną zmianę względnej ekspresji *Gpr132*, który jest charakterystyczna dla procesu infiltracji makrofagów. Warta podkreślenia jest zanotowana tendencja do spadku poziomu ekspresji analizowanych genów wraz z upływem czasu po podaniu MSC, co może wskazywać na stopniowy *remodelling* i przywrócenie homeostazy płuc.

Analiza klastrów genowych związanych w zapaleniem dróg oddechowych w modelu indukowanym HDM wykazała wzrost ekspresji genów związanych z odpowiedzią zależną od limfocytów T subpopulacji Th1, Th2, Th17, proliferacją limfocytów, ich migracją, rekrutacją bazofilów oraz eozynofiliów; aktywacją mediatorów lipidowych oraz produkcją mucyn. W obu zastosowanych modelach astmy Doktorantka zanotowała po podaniu MSC przy wykorzystaniu narzędzi MetaCore modelowania funkcjonalnego, obniżenie prezentacji antygeny w kontekście MHCII, ograniczenie chemotaksji zależnej od białek G, spadek przekazu sygnału związanego z aktywnością receptorów limfocytów B.

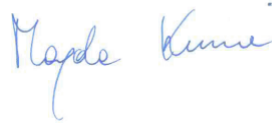
W dyskusji dysertacji Doktorantka dojrzałe omawia uzyskane przez siebie wyniki zestawiając je z obserwacjami innych autorów. Uzyskane wyniki potwierdzają, iż procesy zapalenie o niskim stopniu złośliwości są indukowane w późnych fazach po podaniu MSC. W konsekwencji, komórki T wytwarzające IFN mogą aktywować wrodzone komórki odpornościowe do eferocytozy, prowadząc następnie do przywrócenia homeostazy tkanki płucnej. Zatem, jak opisuje Doktorantka w tej części dysertacji, prezentowane wyniki częściowo potwierdzają koncepcje „*umierających komórek macierzystych*” i „*uderz i zgiń*”. Brakuje szerszego omówienia obu hipotez w kontekście otrzymanych wyników. Ponadto, biorąc pod uwagę, iż w modelu krótkoterminowym Doktorantka zaobserwowała obniżenie ekspresji genów związanych z bioaktywnym lipidem sfingozyno 1- fosforan 3, brakuje omówienia potencjalnego znaczenia tego wyniku. Sfingolipidy, przez lata uznawane jedynie za budulec błon komórkowych, są dziś cząsteczkami o poznany wpływ na procesy wzrostu, różnicowania, migracji, życia i śmierci komórek, co w kontekście terapii komórkowych i immunomodulacji ma ogromne znaczenie.

Podsumowując, złożona rozprawa doktorska Pani mgr Marleny Tyneckiej pt. „*Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy*” w pełni zasługuje na pozytywną ocenę ze względu na wybór tematu, przeprowadzenie wnikliwej analizy dostępnego materiału badawczego, jasnego przedstawienia wyników oraz dojrzałej dyskusji uzyskanych wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574) i wnoszę o

dopuszczenie Pani mgr Marleny Tyneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając osiągnięcie naukowe doktorantki obejmujące kierownictwo grantu Preludium finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, zwycięstwo zespołowe z konkursie RundaT Fundacji Technotalenty oraz odbyte staże w ośrodkach akademickich w USA oraz Szwajcarii, szereg publikacji, których jest współautorem, wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Odziałem Stomatologii i Odziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o przyznanie wyróżnienia.

Z poważaniem,

A handwritten signature in blue ink that reads "Magda Kucia". The signature is written in a cursive, flowing style.

Prof. dr hab. Magdalena Kucia
Kierownik Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny