UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 2022-12-06 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Aliny Mieczkowskiej
pod tytułem: **„Transkryptomiczna ocena odpowiedzi na stymulację czynnikami proregeneracyjnymi komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej"**

Mezenchymalne komórki zrębowe (ang. Mesechymal Stromal Cells, MSCs) to multipotencjalne komórki wywodzące się z mezodermy, występujące niemalże we wszystkich unaczynionych tkankach ludzkiego organizmu. Tkanka tłuszczowa jest jedną z najbardziej dostępnych, a zarazem najbogatszych w komórki MSCs tkanek, co czyni ją doskonałym źródłem tych komórek do celów medycyny regeneracyjnej. W bazie ClinicalTrial.gov do dnia dzisiejszego zarejestrowano 12 170 badań klinicznych z użyciem komórek MSCs izolowanych z różnych źródeł. Wskazuje to na ogromny potencjał tych komórek w terapii rożnego rodzaju schorzeń. Z drugiej strony, do tej pory nie opracowano, ujednoliconych, wystandaryzowanych kryteriów identyfikacji mezenchymalnych komórek zrębowych. Brakuje również danych na temat wpływu długotrwałej hodowli *in vitro* na właściwości komórek MSCs, w tym zdolność do utrzymania fenotypu i multipotencjalności. Ponadto, pomimo znaczącego rozwoju w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, w tym wprowadzenia nowych metod leczenia z wykorzystaniem produktów leczniczych somatycznej terapii komórkowej oraz produktów inżynierii tkankowej, opracowanie skutecznych metod indukcji regeneracji tkanek pozostaje jednym z największych wyzwań medycyny. Możliwość farmakologicznej indukcji regeneracji tkanek z wykorzystaniem małocząsteczkowych związków pro-regeneracyjnych jest jednym z najbardziej interesujących zagadnień badawczych współczesnej medycyny regeneracyjnej.

Mając na względzie powyższe, należy z całą mocą podkreślić, iż wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr Aliny Mieczkowskiej jest nie tylko trafny z punktu widzenia konieczności pogłębienia wiedzy na temat charakterystyki komórek MSCs tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived MSCs, AD-MSCs) w hodowli *in vitro,* ale również potrzeby poszukiwania nowych związków o działaniu

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

proregeneracyjnym i oceny wpływu tych związków na komórki AD-MSCs. Należy przy tym podkreślić, że badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej są częścią większego projektu pt. „Nowe technologie farmakologicznej stymulacji regeneracji" finansowanego ze środków programu STRATEGMED Narodowego Centrum Badań i Rozwoju i realizowanego przez konsorcjum naukowe Regennova, w którym jednym z liderów jest prof. dr hab. Arkadiusz Piotrowski- promotor niniejszej rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku polskim, ma układ typowy dla pracy doświadczalnej. Praca zawiera 117 stron wydruku podzielonego na 5 rozdziałów. Dodatkowo przedstawiono wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazy tabel i rycin, publikacje i patenty powstałe w wyniku realizacji pracy, bibliografię, oraz zgodę Komisji Bioetycznej GUMed. Rozprawa zawiera 11 tabel i 35 rycin. Bibliografia zawiera 124 pozycje, w tym pozycje nowe (do 10 lat) stanowią 60%. Część starszych pozycji jest z całą pewnością niezbędna do wnikliwej analizy dysertacji.

Celami pracy było:

1) opracowanie jakościowej i ilościowej metody oceny „macierzystości" komórek ASCs w oparciu o analizę pozytywnych i negatywnych markerów tych komórek;

2) przygotowanie transkryptomicznej charakterystyki różnicowania komórek ASCs w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów poprzez oznaczanie tkankowo-swoistych markerów;

3) ocena stabilności markerów „macierzystości" ASCs w czasie prowadzenia ich hodowli *in vitro* od pasażu nr 1 do pasażu nr 6;

4) zbadanie efektu proregeneracyjnego peptydomimetyków i płodowej surowicy bydlęcej- FBS na profil transkryptomiczny komórek ASCs.

W bardzo krótkim, liczącym niespełna 8 stron rozdziale „Wstęp" Autorka zdefiniowała pojęcie regeneracja, a następnie scharakteryzowała komórki „progenitorowe" tkanki tłuszczowej, wyszczególniając markery służące do identyfikacji komórek. W dalszej części przedstawiono wady i zalety stosowania płodowej surowicy wołowej w hodowli komórek *in vitro* oraz opisano badane związki o potencjale proregeneracyjnym.

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

Po przeczytaniu tej części dysertacji nasuwają mi się pewne uwagi. Autorka pracy nazywa komórki izolowane z tkanki tłuszczowej komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ang. Adipose derived Stem Cells, ASCs). W pracy brakuje informacji na temat toczącej się dyskusji co do nomenklatury komórek izolowanych z tkanki tłuszczowej i kontrowersji co do ich macierzystości. Komórki izolowane z tkanki tłuszczowej wykazują cechy komórek MSCs definiowanych jako mezenchymalne komórki macierzyste (ang. Mesenchymal Stem Cells), mezenchymalne komórki zrębowe (ang. Mesenchymal Stromal Cells) (Cytotherapy, 2019; 21: 10191024), lub rzadziej multipotencjalne komórki macierzyste (ang. Multipotent Stem Cells), czy lecznicze komórki sygnalizacyjne (ang. Medicinal Signaling Cells) (Tissue Eng Part A 2010;16:2415-7; Stem Cells Translational Medicine 2017;6:1445–1451). Arnold Caplan, który rozpropagował w latach 90. XX wieku nazwę mezenchymalne komórki macierzyste (J Orthop Res 1991, 9:641-650) już w 2010 r. zaapelował do środowiska naukowego, by zmienić tę nazwę, by przestać nazywać komórki MSCs macierzystymi (Tissue Eng Part A 2010;16:2415-7).

Pomimo tego, że komórki MSCs wykazują pewne cechy komórek macierzystych, takie jak multipotencjalność w obrębie linii mezodermalnej czy pewną zdolność do samoodnowy w warunkach *in vitro*, to nie są prawdziwymi komórkami macierzystymi- nie mają zdolności do samoodnowy i różnicowania w warunkach *in vivo,* a ich właściwości proregeneracyjne wynikają głównie z sekrecji czynników troficznych oraz immunomodulujących. Mając na względzie powyższe uważam, że należy z dużą ostrożnością używać określenia „macierzyste" w odniesieniu do komórek MSCs izolowanych z tkanki tłuszczowej, albo przynajmniej wyjaśnić czytelnikowi we wstępie, że określenie „macierzyste" używane w pracy ma bardziej wymiar refleksyjno-tradycyjny aniżeli ściśle naukowy. W najbardziej aktualnej rekomendacji Międzynarodowego Towarzystwa ds. Terapii Komórkowej i Genowej (Cytotherapy, 2019; 21: 10191024) podtrzymano stanowisko, aby nie używać terminu „mezenchymalne komórki macierzyste" do czasu znalezienia ścisłych dowodów funkcyjnych potwierdzających zdolność do samoodnowy i różnicowania komórek MSCs *in vitro* i *in vivo*. Jednocześnie wskazano by utrzymać akronim MSCs dodając do niego informację wskazującą na pochodzenie komórek MSCs. Zgodnie z tymi wytycznymi najbardziej właściwym w odniesieniu do mezenchymalnych komórek zrębowych izolowanych z tkanki tłuszczowej wydaje się być użycie akronimu AD-MSCs. Określenie „markery macierzystości" zastąpiłabym konsekwentnie określeniem markery komórek AD-MSCs.

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

W rozdziale „Materiały i Metody" Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała przyjętą metodologię badawczą. **Dobór technik oraz przeprowadzenie badań świadczy o znakomitym warsztacie naukowym Doktorantki. Godna podkreślenia i uznania jest rozległość i mnogość wykonanych analiz.** W mojej ocenie brakuje tu jedynie krótkiej informacji na temat przebiegu doświadczenia, w którym oceniano wpływ związków proregeneracyjnych na komórki AD-MSCs i która ułatwiłaby czytelnikowi zrozumienie wyników przedstawionych w kolejnym rozdziale. Warto byłoby dodać tu również chociaż krótki akapit poświęcony metod użytym do analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Wyniki badań są bardzo dobrze udokumentowane i przedstawione w przejrzysty i staranny sposób. Połączenie wyników z elementami dyskusji pozwala na bezpośrednią konfrontację uzyskanych danych z danymi z piśmiennictwa.

Przeprowadzone badanie pozwoliło na opracowanie rozszerzonego panelu 28 markerów komórek AD-MSCs do oznaczenia ilościowego metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wykazano, że ocena markerów komórek za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym może być z powodzeniem stosowana jak alternatywna do cytometrii przepływowej technika do oceny fenotypu komórek AD-MSCs. I co należy podkreślić i na co wskazuje Doktorantka, zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym niesie tę korzyść, iż wyklucza ryzyko zaburzenia wyników przez występowanie izoform markerów komórek AD-MSCs. Są to w mojej ocenie niezwykle cenne obserwacje wskazujące na ograniczenia stosowania komercyjnie dostępnych przeciwciał i techniki cytometrii przepływowej do analizy fenotypu komórek AD-MSCs.

Multipotencjalny charakter komórek AD-MSCs oceniono poprzez ich różnicowanie w kierunku adipocytów, chondrocytów i osteocytów. Potencjał do różnicowania komórek AD-MSCs z pasaży P2, P4, P6 w kierunku adipocytów, chondrocytów i osteocytów potwierdzono z wykorzystaniem metod cytochemicznych, odpowiednio barwień: czerwienią oleistą O, błękitem alcjanu i czerwienią alizarynową S. Analiza wybranych markerów różnicowania komórkowego z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym potwierdziła potencjał komórek AD-MSCs do różnicowania w kierunku adipocytów i chondrocytów. Nie potwierdzono natomiast zdolności komórek AD-MSCs do różnicowania w kierunku osteocytów. Mając na względzie powyższe, uważam, że wniosek

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

„Wybrano i oznaczono tkankowo- specyficzne markery trasnskryptomicznej charakterystyki różnicowania ASCs w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów, potwierdzając potencjał do różnicowania niezależną metodą" wymaga przeredagowania. Brakuje tu również informacji czy obserwowano różnice w potencjale do różnicowania w kierunku adipocytów i chondrocytów komórek AD-MSCs pochodzących z rożnych pasaży P2, P4 i P6. Czy różnice w ekspresji markerów różnicowania adipogennego i chondrogennego przedstawione odpowiednio na Ryc. 14 i Ryc. 15 pomiędzy różnicowanymi komórkami AD-MSCs, a komórkami AD-MSCs hodowanymi w pożywce kontrolnej były istotne statystycznie?

Najbardziej innowacyjną część pracy stanowią badania w zakresie oceny wpływu wybranych związków proregeneracyjnych zsyntetyzowanych w ramach projektu Regenova na komórki AD-MSCs. Doktorantka poddała szczegółowym badaniam transkryptomicznym komórki AD-MSCs traktowane 6 wybranymi związkami: IM, AGF, A20, A196, PDGF2, Z1. Badania te stały się podstawą szeregu zgłoszeń patentowych. Z dużym uznaniem należy podkreślić, że Doktorantka jest współautorką aż 4 patentów. Z perspektywy klinicznej, najbardziej interesującym wydaje się być chondrogenne działanie czynnika AGF9, co może w przyszłości znaleźć zastosowanie w terapii uszkodzeń chrząstki. Równie interesujące wydają się być w mojej ocenie wyniki badań związku A-196, który wykazuje właściwości przeciwzapalne, co może zapobiegać bliznowaceniu i sprzyjać regeneracji tkanek. Badane związki IM, A20, A196 indukowały różną odpowiedź w zależności od rodzaju komórek użytych do eksperymentów. Co ciekawe, AD-MSCs oraz fibroblasty charakteryzowały się podobną, aktywacyjną reakcją na badane związki, natomiast keratynocyty reakcją przeciwstawną. To kolejne dane wskazujące na olbrzymie podobieństwo komórek AD-MSCs i fibroblastów. Obserwacje te powinny być przedmiotem dalszych badań, mających na celu próbę odpowiedzi na pytanie co do mechanizmu działania wyselekcjonowanych czynników proregeneracyjnych w warunkach *in vivo.*

Wnioski wieńczące pracę (z wyjątkiem jednego, co do którego uwagi przedstawiono powyżej i który wymaga niewielkiego przeredagowania) wypływają z uzyskanych wyników, potwierdzając osiągnięcie założonych celów badawczych. Uważam również, że stylistycznego przeredagowania wymaga ostatni wniosek „Wyniki transkryptomiczne dla peptydów IM, A20 i A196 wykazały różną odpowiedź na badane związki w zależności od rodzaju komórek użytych do eksperymentów".

UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Urologii i Andrologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Bank Komórek i Tkanek, Wytwórnia ATMP
Prof. dr hab. n. med. Marta Pokrywczyńska
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz
tel./fax. +48 52 585 60 80
e-mail: zmr@cm.umk.pl

Podsumowując, wysoko oceniam istotność, trafność, aktualność i oryginalność podjętej tematyki badawczej oraz trud pracy włożony w jej wykonanie. Wszystkie zawarte w recenzji uwagi, które musiałam z obowiązku poczynić, w najmniejszym stopniu nie umniejszają naukowej i poznawczej wartości pracy. Dlatego podsumowując z wielką satysfakcją stwierdzam, że dysertacja mgr Aliny Mieczkowskiej pod tytułem: „Transkryptomiczna ocena odpowiedzi na stymulację czynnikami proregeneracyjnymi komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej" odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim, co upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Pokrywczyńska