WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

LABORATORIUM BADAWCZE - BANK KOMÓREK

Warszawa, 03.02.2023

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Aliny Mieczkowskiej

pt.: „Transkryptomiczna ocena odpowiedzi na stymulację czynnikami proregeneracyjnymi komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej"

Rozprawa doktorska pani mgr Aliny Mieczkowskiej ma formę dysertacji. Zawiera wszystkie elementy właściwe dla tego typu publikacji, tj. wstęp, wyodrębnione cele pracy, opis metodyki, wyniki połączone z dyskusją oraz wnioski. Zawiera ponadto spis zastosowanych skrótów, wykaz publikacji i patentów powstałych z uwzględnieniem uzyskanych wyników i Zgodę Komisji Bioetycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego odnośnie zastosowanych procedur z udziałem pacjentów, w oparciu o ich pisemną zgodę. Praca została zrealizowana w ramach realizacji Projektu NCBiR STRATEGMED „Nowe technologie farmakologicznej stymulacji regeneracji" (konsorcjum naukowe Regennova), w ramach programu strategicznego „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych" (STRATEGMED) /235077/9/NCBR/2014).

Tematyka pracy jest bardzo aktualna. Z jednej strony nie budzi wątpliwości rosnące zainteresowanie komórkami MSCs[1], w tym zwłaszcza komórkami izolowanymi z tkanki tłuszczowej (ASCs), do których odnosi się rozprawa - ze względu na łatwą, mało inwazyjną dostępność a także ich potencjał immunomodulacyjny. Jednocześnie, wiedza dotycząca charakterystyki tych komórek jak i sposobu ich działania w przypadku zastosowania jako substancji czynnej w produktach leczniczych terapii zaawansowanych, jest daleka od uporządkowania. Jesteśmy ewidentnie na bardzo intrygującym etapie dużej dostępności danych eksperymentalnych, które jednakże raczej prowadzą do kolejnych pytań niż przynoszą ostateczne wyjaśnienia. Przy tym, podejście omiczne do charakterystyki populacji

[1] za najnowszymi sugestiami Arnolda Caplana – twórcy nazwy Mesenchymal Stem Cell, optującym następnie za nazwą „Stromal", a ostatnio – „Signaling", zamiast „Stem" - posługuję się skrótem, zamiast rozwinięcia nazwy populacji komórek, do jakiej odnosi się rozprawa.

komórkowych jest aktualnie najbardziej intensywnie eksploatowane – o ile tylko pozwala na to dostatecznie zaawansowane zaplecze techniczne i umiejętności badaczy. W ocenianej rozprawie zastosowano najbardziej zaawansowane techniki, z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem RNA włącznie, do analizy transkryptomicznej badanych komórek. Zarówno więc przedmiot podjętych badań jak i zastosowane metody badawcze zasługują na wysoką ocenę.

O ile ogólne sformułowanie tematu pracy jest jak najbardziej zasadne, o tyle pewne wątpliwości budzą stwierdzenia zawarte we wstępie, celach i streszczeniu pracy wskazujące komórki ASC jako optymalny model do testowania wpływu „...peptydów i peptydomimetyków stymulujących gojenie się ran..." (cyt. za Streszczeniem) i identyfikacji szlaków sygnałowych. Jest to podejście nietypowe. W wielu pracach, ASCs opisuje się jako komórki, które mają pobudzać gojenie ran poprzez ekspresję stosownych czynników (w mechanizmie działania bezpośredniego, lub poprzez działanie parakrynne oraz za pośrednictwem mikropęcherzyków). Jaka myśl przyświecała Doktorantce, aby sformułować problem przedstawiając ASC jako komórki odpowiadające na czynniki stymulujące gojenie, nie zaś źródło tych ostatnich? ASC nie są typowo komórkami – adresatami czynników stymulujących gojenie, ponieważ nie są to komórki charakterystyczne dla środowiska rany. Zatem, omówienie tego zagadnienia i doprecyzowanie jak Doktorantka rozumie model hodowli ASC jako środowiska do testowania wpływu wybranych związków na gojenie się ran, byłoby pożądanym elementem obrony pracy.

Wśród zagadnień podjętych w rozprawie, znajdują się: wpływ wybranych warunków hodowli na profil transkryptomiczny komórek ASC – uwzględniono tu wpływ obecności 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) a także stabilność transkryptomiczną komórek w odległych pasażach, możliwość charakterystyki macierzystości ASC poprzez oznaczenie wybranych markerów metodami transkryptomicznymi oraz transkryptomiczna ocena wpływu wybranych w ramach Projektu związków na komórki ASC.

Wszystkie te zagadnienia są ważne i interesujące.

Badania nad wpływem FBS na komórki w hodowli są podejmowane w różnych laboratoriach i mają znaczenie o tyle, iż jest to rutynowo stosowany dodatek do medium hodowlanego komórek przylegających, podczas gdy w mediach hodowlanych stosowanych w przygotowywaniu preparatów do stosowania klinicznego jest on na ogół zastępowany innymi czynnikami nie pochodzącymi od zwierząt. Jest też często eliminowany z hodowli eksperymentalnych poszukujących ścieżek sygnałowych obserwowanych zjawisk – dla uniknięcia wpływu samego serum na wyniki.

Powszechnym, wynikającym stąd problemem, są trudności w interpretacji wyników z różnych laboratoriów w zależności od tego, czy stosowały one dodatek FBS. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki nie są przełomowe, ale dobrze dokumentują spodziewany efekt hamujący na migrację i namnażanie komórek i ujawniają brak aktywacji szlaków apoptozy i nekrozy. Są to wartościowe wyniki o potencjalnym znaczeniu dla interpretacji wyników prac oryginalnych *in vitro* pochodzących z różnych warunków eksperymentalnych.

Ważnym wynikiem pracy jest charakterystyka ASC w dalszych pasażach. Zgadzam się z Doktorantką, iż jest to ważne zagadnienie, zarówno w kontekście badań podstawowych nad biologią tych komórek, jak i w kontekście translacyjnym, w perspektywie ich terapeutycznego zastosowania. Stabilność transkryptomiczna ASC w odległych pasażach ma bardzo istotne znaczenie praktyczne, ze względu na potrzebę uzyskiwania dużej liczby komórek wyprowadzonych od jednego dawcy, zarówno do celów badawczych, jak i w kontekście translacyjnym. Te powody zostały jasno wyłuszczone w rozprawie. Doktorantka udowodniła w szczególności zachowanie markerów macierzystości do szóstego pasażu, co jest bardzo cennym wynikiem.

Możliwość oznaczenia wybranych markerów MSC na komórkach ASC metodami transkryptomicznymi uważam za bardzo cenny wkład pracy do stanu wiedzy. Co prawda ustalenie panelu tzw. markerów macierzystości dla komórek MSC (w tym ASC) jest umowne i jako takie, jest przedmiotem trwającej w środowisku naukowym dyskusji. Z drugiej strony, w kontekście zastosowania ASC w terapiach komórkowych należy zauważyć rosnący nacisk ciał regulatorowych, w tym Europejskiej Agencji Leków EMA a zwłaszcza agencji Food and Drug Administration FDA, na konieczność charakterystyki każdej serii zwalnianych leków zawierających komórki właśnie ze względu na te markery. W tej sytuacji, poszukiwanie testów alternatywnych dla, powszechnie stosowanej cytometrii przepływowej, jest bardzo atrakcyjne. Co prawda wniosek, iż uzyskane w pracy wyniki dają podstawę traktowania metody qPCR jako alternatywy dla tej metody uważam za zbyt daleko idący, co zostało skomentowane w dalszej części recenzji. Jednak na pewno uzyskane wyniki są ważnym krokiem w tym kierunku. Doktorantka przekonująco dyskutuje walory techniki qPCR podkreślając jej czułość a także uniknięcie ryzyka zaburzenia wyników przez występowanie izoform transkryptów, co może mieć miejsce w metodach opartych na reakcji antygen-przeciwciało.

W odniesieniu do transkryptomicznej oceny wpływu wybranych w ramach Projektu związków na komórki ASC, znaczenie uzyskanych wyników będzie lepiej zrozumiałe po wyjaśnieniach dotyczących zastosowania ASC jako modelu do oceny potencjału regeneracyjnego w kontekście leczenia ran i ewentualnie w szerszym znaczeniu, dla których szansą będzie obrona pracy. Uwagi

dotyczące interpretacji wyników w tym obszarze zostały omówione w dalszej części recenzji. Natomiast, niezależnie od dyskusji nad zastosowanym układem eksperymentalnym i uzyskanymi wynikami, wszelkie analizy transkryptomiczne komórek ASC w różnych układach doświadczalnych, są cennym wkładem do nauki, bowiem ten obszar badań jest obecnie w fazie mnożenia pytań i poszukiwania odpowiedzi. Dobrze udokumentowane wyniki uzyskane wyrafinowanymi metodami są więc bardzo wartościowe.

Materiały i Metody

W części metodycznej najbardziej brakuje opisu zastosowanych układów eksperymentalnych. Jak wspomniano, w pracy podjęto kilka różnych wątków – co, jak warto podkreślić, jest ważną zaletą Rozprawy - ale wymaga ogromnej konsekwencji w opisie. W dodatku wyniki zostały zaprezentowane we wspólnej części z dyskusją i opisane w sposób, z którego trudno się zorientować, co jest oryginalnym efektem rozprawy doktorskiej, a które wyniki pochodzą z innych prac. Pomocne byłoby jasne określenie tego, może z pomocą schematów, wskazujących, jakimi wynikami Doktorantka dysponowała przystępując do eksperymentów stanowiących przedmiot pracy, które pozyskała dzięki równolegle prowadzonym obserwacjom innych badaczy w Projekcie i wykorzystała do interpretacji wyników, a które planowała uzyskać samodzielnie i jakie schematy badań zaplanowała w tym celu. Takie schematy, bądź jednoznaczne zbiorcze zestawienia opisowe mogłyby być alternatywnie umieszczone we wstępie lub w wynikach – to kwestia redakcji tekstu. Zwykle umieszczane są w części metodycznej aby ułatwić śledzenie wyników, ich interpretacji i podsumowań, w dalszych częściach rozprawy. Może Doktorantka mogłaby pokusić się o takie zestawienia podczas obrony pracy. Należy zaznaczyć, iż rycina otwierająca część metodyczną, porządkuje te kwestie tylko częściowo. Odnosi się bowiem wyłącznie do badań nad komórkami ASC, gdy tymczasem elementem dysertacji są liczne wyniki uzyskane z użyciem innych linii komórkowych. Poza tym, z przedstawionej ryciny wynikałoby, iż cała analiza transkryptomiczna jest efektem pracy Doktorantki, gdy tymczasem z opisu rezultatów wynika, iż przynajmniej część badań była przedmiotem prac magisterskich innych autorek. Rycina ta nie ilustruje także układów doświadczalnych skonstruowanych przez Doktorantkę dla osiągnięcia postawionych w pracy celów.

Wśród uwag szczegółowych do tej części, należy wspomnieć o braku konsekwencji w opisie komórek użytych do badań. Wszystkie cele pracy odnoszą się do komórek ASC. Tymczasem w różnych miejscach pracy pojawiają się odniesienia do komórek ludzkich o czterech innych immunofenotypach, a mianowicie: fibroblastów, keratynocytów, komórek śródbłonka, komórek jednojądrzastych krwi obwodowej; nie wspominając o neuronach z zarodków szczurzych i nienazwanych komórkach

izolowanych z tkanek myszy. Komórki gryzoni zostały uwzględnione w zestawieniach niektórych wyników Pracy – nie jest jednak jasne jaki mają związek z jej założeniami i celami. Rodzaj użytych fibroblastów i keratynocytów - dostępnych ustalonych linii komórkowych (przyjętym jest wskazanie źródła ich pozyskania) - wskazano w opisie wyników. Po raz pierwszy informacja ta pojawia się dopiero w podsumowaniu wyników odnoszących się do odpowiedzi na stymulację peptydami (jest tam zresztą omyłkowo zamieniona nazwa linii fibroblastów i keratynocytów – oczywista omyłka, nie powtarza się bowiem w dalszych częściach opisu). Natomiast pochodzenie komórek śródbłonka izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC) i komórek krwi nie zostało w ogóle wyjaśnione (zgoda Komisji Bioetycznej?).

Abstrahując od powyższych uwag krytycznych, odnoszących się do redakcji i konstrukcji rozprawy w tej części, należy podkreślić ważne walory zastosowanego aparatu metodycznego. Analiza transkryptomiczna została przeprowadzona bardzo wyrafinowanymi technikami i stanowi to filar rozprawy. Zwraca uwagę zastosowanie trzech genów referencyjnych w analizach PCR. Pomimo tego, iż jest to od lat zalecane, wciąż publikowane są, także w dobrych czasopismach, wyniki odnoszące się do jednego genu referencyjnego, często nieadekwatnego do analizy. Krótkie uzasadnienie wyboru genów referencyjnych zastosowanych w Rozprawie, byłoby wartościowym elementem w opisie metodyki.

Wyniki i Dyskusja

Zestawienie wyników i dyskusji we wspólnej części utrudnia rozróżnienie wyników będących wprost efektem badań Doktorantki i innych efektów Projektu, pomimo, że Doktorantka w wielu miejscach zaznacza, które zespoły badawcze uczestniczyły w realizacji zadań projektowych. Ten problem został już w recenzji poruszony.

Generalnie, wyniki analiz transkryptomicznych zostały przedstawione klarownie w odniesieniu do wszystkich zastosowanych metod, tj. PCR, mikromacierze i wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu. W tym ostatnim przypadku, zastosowanie analizy różnicowej i interpretacje wyników w oparciu o dostępne biblioteki zostały przedstawione w sposób właściwy dla tego typu analiz – co, nie będąc bioinformatykiem – mogę ocenić jedynie na podstawie lektury doniesień naukowych i osobistej współpracy ze specjalistami z tego zakresu. Pozyskane dane są bardzo wartościowym wynikiem, choć interpretacja biologiczna rodzi pewne zastrzeżenia.

Patrząc na zestawienie wyników w tabeli 12 („Podsumowanie badań transkryptomicznych dla ASCs traktowanych związkami IM, AGF, A20, A196, PDGF2, Z1"), w której wymieniono dawców komórek i uzyskane efekty, można wnosić, iż opisane w tabeli wyniki uzyskano dla komórek od

wszystkich wymienionych donorów. Po lekturze podrozdziałów odnoszących się indywidualnie do poszczególnych związków okazuje się jednak, iż nie zachodzi to praktycznie w żadnym przypadku. Przeciwnie, wyniki są niejednoznaczne, czasem sprzeczne. W świetle stanu wiedzy, taki rozrzut wyników nie budzi zdziwienia. Zależna od dawcy zmienność charakterystyki ASC jest szeroko opisywanym zjawiskiem i wiele uznanych laboratoriów poświęca dużo uwagi badaniom służącym zarówno wyspecyfikowaniu cech i reakcji ASC na różne stymulanty w zależności od różnych cech dawcy, historii klinicznej, miejsca pobrania, etc. Oczywiście uzyskanie spójnych wyników na większej liczbie dawców byłoby bardziej spektakularnym wynikiem Rozprawy. Jednakże przy podjęciu w Pracy licznych wątków i skali zastosowanych analiz, ograniczenia w liczbie badanych populacji są zrozumiałe. Natomiast sugerowanie w podsumowaniu wyników zestawionym w tabeli, a następnie także we wnioskach, iż uzyskano w tej części spójne wyniki, jest nieuprawnione.

Interpretacje wyników w odniesieniu do stabilności immunofenotypu ASC w kolejnych pasażach, charakterystyki ich markerów macierzystości poprzez analizę transkryptomiczna, a także ocenę efektu odstawienia FBS jako składnika medium hodowlanego są rzetelne i stanowią wartościowy efekt pracy.

Zagadnienie angiogenezy oraz działania przeciwzapalnego ASC w odpowiedzi na związek A-196 omówiono w sposób budzący kontrowersje. W dwóch, nieodległych od siebie miejscach w tekście napisano: „...Wstępny wynik dla duplikatu PS6 i PS7 wykazał hamowanie odpowiedzi przeciwzapalnej i antyangiogennej ..." (str. 84), a następnie „...Wykazano działanie antyangiogenne oraz hamujące odpowiedź zapalną..." (str. 90). Na podstawie zaprezentowanej na ryc. 23 sieci regulatorowej IPA dla ASCs stymulowanych peptydem A-196 pokazano downregulację czynników uważanych za proangiogenne i przeciwzapalne. Doktorantka oba efekty opisuje jako pożądane w początkowym okresie gojenia się rany. Trudno mi się zgodzić z zaprezentowanym twierdzeniem, iż „...hamujący wpływ na angiogenezę ... jest pożądanym efektem w początkowym etapie gojenia się rany..." a przywołane referencje także nie przekonują do tego stwierdzenia. Co do efektu pro- vs anty-zapalnego, wydaje się, ze zaszło tu nieporozumienie.

Wnioski z pracy

Pierwszy wniosek sugeruje, iż Doktorantka opracowała panel „...28 transkryptów charakteryzujących komórki ASC..." na podstawie oceny ilościowej metodą PCR w czasie rzeczywistym. Tymczasem w opisie wyników (podrozdział „Charakterystyka komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej ang. ASC – Adipose-derived Stem Cells"), a także w pracy oryginalnej Doktorantki i

współaut., wskazano, iż panel ten został opracowany na podstawie przeglądu literatury. Analizując wyniki pracy, można stwierdzić, iż jej efektem jest potwierdzenie stabilności tych markerów w kolejnych pasażach i to ten wynik jest potwierdzony wskazaną metodą.

Drugi wniosek odnosi się do oceny markerów macierzystości ASC w analizie transkryptomicznej jako alternatywy dla powszechnie stosowanej metody cytometrii przepływowej. Taki postulat, bez starannej walidacji na odpowiednio dużym materiale, od licznych dawców, przeprowadzony na tych samych subpopulacjach komórkowych, w wystandaryzowanych warunkach, jest zbyt daleko idący. Natomiast w pełni zgadzam się z Doktorantką, iż uzyskane wyniki są zachęcającą podstawą do dalszych kroków w tym kierunku. Postulowana metoda może być brana pod uwagę jako potencjalna alternatywa dla oznaczeń cytometrycznych.

Czwarty wniosek tylko częściowo znajduje odzwierciedlenie w wynikach. Ogólne stwierdzenie wzmożonego potencjału stymulowanych ASC do różnicowania in vitro nie jest uprawnione. Różnicowanie do immunofetypu chondrocytów, wskazane we wniosku jako przykładowe, jest jedynym wykazanym w wynikach przypadkiem, a i to – w świetle wyników transkryptomicznych - niejednoznacznym.

Zastrzeżenia budzi sformułowanie szóstego wniosku, który stanowi, iż w pracy wyłoniono 6 związków o charakterze proregeneracyjnym, gdy tymczasem związki te zostały wskazane we wstępie jako już wytypowane do analiz, których przedmiotem jest rozprawa. Z treści pracy wynika, iż jej przedmiotem było zbadanie wpływu wyselekcjonowanych wcześniej związków na transkryptom komórek, zatem wniosek wskazujący, iż ich wyłonienie do badań jest efektem pracy, jest niespójny z założeniami i wynikami. Dodatkowo, Zebularyna (oznaczana symbolem Z1), w ogóle nie została włączona do pracy jako stymulator ASC. W tabeli zamieszczono jedynie opis efektu jej działania na linie ustalone fibroblastów i keratynocytów.

Wnioski 7-11, odnoszące się do odpowiedzi komórek na stymulację badanymi w pracy związkami, budzą zastrzeżenia w kontekście niejednoznaczności uzyskanych wyników, na co już wskazano w recenzji. Podobnie jak w pozostałych częściach pracy, wnioski te zdają się być oparte nie tylko na wynikach uzyskanych w rozprawie, co powinno mieć odzwierciedlenie w ich sformułowaniu. Ostatni wniosek natomiast, porównujący reakcję ASC oraz fibroblastów i keratynocytów na stymulację peptydami IM, A20 i A196 nie ma poparcia w wynikach, ponieważ wyniki dla tych ostatnich dwóch typów komórek nie zostały opisane w pracy.

Powyższe, krytyczne uwagi, nie przekreślają znaczenia licznych uzyskanych wyników, jako cennego materiału dla innych badaczy, podczas gdy ich interpretacja wymaga dyskusji. Świetnym polem dla niej będzie obrona pracy stanowiąca dobrą okazję, dla zaprezentowanie efektów Rozprawy w sposób wolny od wskazanych uchybień, lub podjęcia dyskusji z krytycznymi uwagami zawartymi w recenzji. Doktorantka powinna też podczas obrony bardzo jednoznacznie określić swój osobisty udział w zaprojektowaniu, przeprowadzeniu i interpretacji przeprowadzonych analiz. Niektóre fragmenty opisu w pracy wskazywałyby na udział Doktorantki także w tych częściach pracy, które wykraczały poza analizę transkryptomiczna. Z drugiej strony, w badaniach transkryptomicznych, Doktorantka posiłkuje się wynikami prac magisterskich, które zostały włączone do dysertacji. Wskazuje też, iż badania transkryptomiczne prowadziła razem z zespołem Zakładu, z którego wychodzi praca. Z powodów formalnych jednoznaczne wyodrębnienie autorskiego wkładu Doktorantki jest nieodzowne i obrona pracy będzie po temu dobrą okazją.

W pierwszej, zasadniczej części mojej oceny pracy podkreślałam już, iż zaprezentowane wyniki analizy transkryptomicznej populacji komórkowych w różnych warunkach hodowli i ekspozycji na różne czynniki, z zastosowaniem tak zaawansowanego aparatu badawczego jest bezsprzecznie wartościowym wkładem do stanu wiedzy. Zwłaszcza, że duża część wyników została już opublikowana. Doktorantka jest współautorką czterech publikacji naukowych ogłoszonych w czasopismach z listy JCR o współczynniku oddziaływania o wartości od 3.111 do 5.736. W jednej z tych prac, z której pochodzi duża część wyników opisanych w Dysertacji, jest pierwszym autorem. Wyniki pracy zostały także wykorzystane w trzech krajowych i jednym międzynarodowym zgłoszeniu patentowym. Fakt, iż uzyskane wyniki są ogłaszane zarówno w literaturze naukowej, jak i w postaci zastrzeżeń patentowych, ilustruje nowoczesne podejście do nauki, w którym poszukuje się elementów translacyjnych i stanowi dobry bagaż doświadczeń dla przyszłej kariery naukowej Doktorantki. Bezspornie też udział w tak rozbudowanym Projekcie wymagał od Doktorantki umiejętności współpracy z różnymi zespołami badawczymi, co znalazło swoje odzwierciedlenie we wspólnych publikacjach. Wielowątkowość podjętych tematów i zapewne wspólna w wielu miejscach interpretacja wyników uzyskiwanych w Projekcie nie ułatwiała z pewnością redakcji dysertacji, która w pewnych fragmentach przypomina raczej raport z realizacji Projektu niż autorską monografię. Jestem jednak przekonana, że uzupełniające wyjaśnienia przedstawione podczas obrony, pozwolą na jednoznaczne wyodrębnienie autorskiego wkładu Doktorantki i – wobec ogromnej ilości pozyskanych danych naukowych wysokiej jakości, w ważnym i aktualnym kierunku badawczym - nie pozostawią wątpliwości co do tego, iż aspiracje pani mgr Aliny Mieczkowskiej do uzyskania stopnia naukowego doktora są całkowicie uzasadnione.

Podsumowując, wyrażam opinię, iż przedłożona do oceny dysertacja p. mgr Aliny Mieczkowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i niniejszym przedkładam Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pozytywną recenzję rozprawy i wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Aliny Mieczkowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

KIEROWNIK
Laboratorium Badawczego-Banku Komórek
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

prof. dr hab. Małgorzata Lewandowska-Szumieł