

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Siennickiej pt. "Badanie zależności pomiędzy morfologicznymi i czynnościowymi parametrami mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC) a wiekiem szczura – dawcy komórek"

Mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (*adipose stem cells* - ASC) stanowią nie tylko interesujący model badawczy procesu różnicowania się ich w kierunku wielu typów komórek, ale stanowią też potencjalne narzędzie w auto- i allogenicznym terapiach regeneracyjnych u ludzi. Jak dotąd, zastosowanie komórek ASC w tego typu leczeniu ujawniło duże możliwości terapeutyczne. Dotychczasowe doniesienia na ten temat nie poruszały jednak wpływu wieku dawcy komórek macierzystych ASC na efekty leczenia przeszczepami auto- i allogenicznymi. Nie znane są także morfologiczne i czynnościowe właściwości tych komórek hodowanych *in vitro*.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej był w pełni uzasadniony i stanowił poważne wyzwanie dla Doktorantki. A mianowicie postanowiła na modelu zwierzęcym zbadać wpływ wieku dawcy komórek ASC na ich cechy morfologiczne i czynnościowe w organizmie biorcy *in vivo* oraz czy te cechy zmieniają się one podczas pasażowania komórek *in vitro*.

Przesłana do oceny rozprawa doktorska liczy 128 stron i ma klasyczny układ rozdziałów. Zawiera dziewięć tabel oraz 33 ryciny. Piśmiennictwo zawiera 203 pozycje.

Rozprawę otwiera streszczenie napisane jasnym językiem i umożliwia całościową ocenę rozprawy doktorskiej. Zamiast tradycyjnego „wstępu” Doktorantka napisała **Wiadomości ogólne**, w których wprowadza czytającego z jednej strony w skomplikowany a z drugiej strony fascynujący świat komórek macierzystych. Szczególną uwagę poświęca mezenchymalnym komórkom macierzystym pochodzącym z tkanki tłuszczowej (ASC) opisując ich właściwości biologiczne ze szczególnym uwzględnieniem potencjału terapeutycznego tych komórek. Podrozdział ten kończy opis dotychczasowych nielicznych zastosowań klinicznych komórek ASC w medycynie regeneracyjnej. Zwraca uwagę oryginalna rycina przedstawiająca mechanizmy działania tych komórek. Takie oryginalne ryciny pojawiają się na dalszych stronach rozprawy i cechuje je duża przejrzystość ułatwiająca zrozumienie tekstu.

Nie ulega wątpliwości, że tkanka tłuszczowa, jak podkreśla Doktorantka, stanowi wydajne źródło komórek macierzystych dla terapii komórkowych. Ponadto zwraca ona uwagę na coraz większe znaczenie takich terapii u pacjentów w podeszłym wieku. Dlatego też zadania badawcze Doktorantki są w pełni uzasadnione i dotyczą zbadania wpływu starzenia się komórek ASC *in vivo* i *in vitro* na ich zdolności terapeutyczne. Doktorantka sformułowała cztery czytelne **cele pracy**: (1 i 2) ocena związków pomiędzy wiekiem dawcy (na modelu młodych i starych szczurów) a właściwościami biologicznymi komórek macierzystych ACS izolowanych *in vivo* oraz w badaniach *in vitro*; (3) wpływ wieku dawcy komórek macierzystych ASC z frakcji stromalno-waskularnej (SVF) i z hodowli *in vitro* na procesy neoangiogenezy w obrębie przeszczepu tkanki tłuszczowej; (4) ocena wpływu SVF lub ASC jako czynników wzbogacających przeszczepy tkanki tłuszczowej na ich stabilność. Należy podkreślić, że powyższe cele były ambitne i stanowiły duże wyzwanie dla Doktorantki.

Opisy zastosowanego **materiału badawczego** i metodyka pracy są perfekcyjne. Bez zbędnych szczegółowych opisów zastosowanych bardzo złożonych technik badawczych Doktorantka podzieliła tekst na krótkie podpunkty określające cel określonego działania badawczego i użyte techniki laboratoryjne. Opisy te cechuje duża dojrzałość i świadczy o osobistym wykonaniu planowanych zadań badawczych. Strategia zaplanowanych badań wymagała starannego doboru materiału doświadczalnego oraz wielu zadań badawczych.

Materiałem badawczym były pochodzące z hodowli wsobnej szczury rasy *Wistar Albino Glaxo* w wieku sześciu miesięcy oraz dwóch lat. Nie podano informacji na temat płci tych zwierząt. Po uśpieniu zwierząt, pobierano tkankę tłuszczową białą i brunatną z czterech okolic ciała. Pobrane tkanki poddano następującym procedurom badawczym: izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych, przygotowanie zawiesin tych komórek o określonej liczebności, badanie żywotności komórek i wyprowadzanie pierwotnych hodowli komórkowych *in vitro*, które pasażowano i uzyskiwano większą liczbę komórek do doświadczeń. Podczas pasażowania zastosowano trypsynę do odrywania komórek od dna butelek hodowlanych – w przyszłości, czy nie lepsza będzie kolagenaza, która w odróżnieniu od trypsyny, nie uszkadza struktur powierzchniowych komórek. Zamrożone komórki stały się „magazynem” do dalszych badań. Badania komórek macierzystych dotyczyły: określenia potencjału klonogenego (CFU-F), tempa wzrostu i czasu podwojenia ich populacji, określanie aktywności enzymatycznej (test MTS), definiowanie fenotypu komórek metodą cytometrii przepływowej, stymulowanie różnicowania się komórek ASC w kilku kierunkach: adipogenezy,

osteogenezy oraz chondrogenyzy. Badania molekularne wykonywano na izolowanych z komórek kwasów nukleinowych RNA i cDNA stosując rutynowe techniki a w celu badań ekspresji genów zastosowano technikę qPCR. Ponadto zastosowano wysokospecjalistyczne analizy typu: ocena zdolności ASC do tworzenia struktur podobnych do naczyń włosowatych, do tworzenia samoorganizujących się sferycznych agregatów komórek, badanie potencjału parakrynnego ASC a po implantacji tych komórek szczirom ocena proangiogennych właściwości. Wobec licznych wyników badań zastosowano odpowiednie testy statystyczne.

Celowo wymieniłem powyżej wszystkie elementy części doświadczalnej rozprawy, aby podkreślić, że stworzony model badawczy był oryginalny i wymagał dużego nakładu pracy Doktorantki.

Uważam, że opis analizy mikroskopowej powinien być trochę poszerzony: w jaki sposób dokumentowano (jaka kamera cyfrowa)? Nie określono w jaki sposób wykonywano makrofotografie szczurów z implantami (Ryc. 6).

Wyniki badań opisane na 43 stronach są wzbogacone o liczne czytelne tabele ryciny oraz mikrofotografie. W dokumentowaniu komórek niebarwionych rosnących *in vitro* lepszy byłoby kontrast fazowy a nie zwykły świetlny mikroskop. Ponadto na niektórych fotografiach brak jest strzałek wskazujących na charakterystyczne cechy badanych komórek (ryc. 13, 17B, 27, 28, 32).

Za najważniejsze wyniki badań uważam:

- (1) Wykazanie, że wiek dawcy mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) nie wpływa w znaczący sposób na morfologiczne i czynnościowe właściwości tych komórek
- (2) Obserwacje komórek ASC długotrwałej hodowli *in vitro* wykazują, że starzenie się komórek pochodzących od młodych dawców jest szybsze niż w ASC pochodzących od dawców starszych nie hodowanych *in vitro*. Ponadto długotrwałe hodowle *in vitro* zwiększają odsetek komórek klonogennych (CFU-F), które zmieniają także swoje biologiczne cechy.
- (3) Badania zdolności do neowaskularyzacji i różnicowania komórek ASC w kierunku tkanki tłuszczowej, kostnej i chrzęstnej, pomimo zmienności osobniczej, wskazują na potencjalną przydatność kliniczną komórek macierzystych uzyskanych od starszych wiekowo dawców.

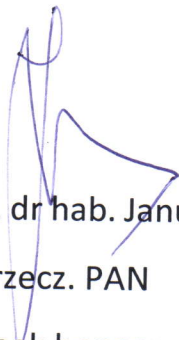
(4) Wykazanie, że komórki SVF i ASC pochodzące z obu grup wiekowych dawców po dodaniu do przeszczepionej tkanki tłuszczowej zmniejszają tempo jej resorpcji.

Rozdział **dyskusja** został napisany dynamicznie i czytelnie dzięki podziałowi problemów na określone zagadnienia (podrozdziały). Doktorantka w sposób ostrożny przedstawia swoje wyniki badań na tle danych z piśmiennictwa. Umiejętnie „wplata” swoje wyniki badań w stan wiedzy na temat mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Opracowany przez Doktorantkę oryginalny model badawczy pozwolił na wiarygodną ocenę wpływu wieku dawców komórek macierzystych mezenchymalnych ASC na ich właściwości biologiczne w hodowli *in vitro* oraz wpływ ich implantacji do przeszczepów tkanki tłuszczowej *in situ*. Są to ważne wyniki badań wobec stosunkowo nielicznych publikacji na ten temat. Co więcej, mają potencjalne implikacje kliniczne w terapii rekonstrukcyjnej w medycynie.

Dyskusja zakończona jest **pięciami wnioskami**. Część z nich stanowią uzyskane wyniki badań, co jest zrozumiałe – oryginalne wyniki badań mogą być ujęte w formie wniosków. Zasadniczy wniosek (1) dotyczy braku znaczenia wieku dawcy mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC). Z kolei szereg obserwacji biologicznych tych komórek hodowanych *in vitro* (2, 3) dostarcza ważne implikacji do wiedzy o biologii tych komórek. Optymistyczny jest wniosek (4) wskazujący na zdolność do angiogenezy oraz różnicowania się komórek ASC w komórki różnego typu tkanek. Wniosek piąty ma duże znaczenie kliniczne, gdyż wykazano, że dodanie komórek SVF i ASC zmniejsza resorpcję przeszczepionej tkanki tłuszczowej. A zatem dodawanie tych komórek do przeszczepianej tkanki tłuszczowej może poprawić efekty terapii rekonstrukcyjnej.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Siennickiej jest złożoną eksperymentalną pracą, w której zastosowano szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych a uzyskane wyniki stanowią oryginalne elementy wiedzy o mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Już teraz można dostrzec kliniczne implikacje wyników tych badań.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Siennickiej jest dojrzałą pracą naukową, a oryginalne wyniki powinny być przedmiotem publikacji w renomowanym piśmie naukowym. Dlatego też występuję do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o **wyróżnienie rozprawy**.



Prof. dr hab. Janusz Limon

Gdańsk-Strzyża, 27 kwietnia 2019 roku

Czł. rzecz. PAN

Członek honorowy

Warszawskiego Oddziału

Polskiego Towarzystwa Onkologicznego