



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. UJ
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 7 listopada 2018r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Andrzejewskiej

pt. „Aktywność biologiczna ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z nadekspresją receptora VLA-4; badania funkcjonalne *in vitro* i *in vivo*”

wykonanej pod kierunkiem Promotora: Prof. dr hab. Barbary Łukomskiej oraz Promotora
pomocniczego: dr hab. Mirosława Janowskiego

w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
w Warszawie.

Komórki macierzyste mezenchymalne/ stromalne (z ang. *mesenchymal stem. stromal cells*; MSCs) od lat stanowią przedmiot setek badań prowadzonych w laboratoriach na świecie pod kątem ich wykorzystania w regeneracji tkanek, w tym w leczeniu uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Komórki MSCs - ze względu na swoje unikatowe cechy biologiczne, w tym potencjał do różnicowania w inne dojrzałe komórki oraz zdolność produkcji szeregu czynników o działaniu parakrynnym, jak również ze względu na ich łatwość pozyskiwania dla aplikacji auto- i allo-genicznych, jak również ze względu na bezpieczeństwo ich zastosowania u pacjentów - stanowią dziś najszerzej stosowaną frakcję komórek macierzystych (KM) w badaniach klinicznych prowadzonych na całym świecie.

Z pewnością aspekty związane z wydzielniczą aktywnością tych komórek, mającą istotne znaczenie immunomodulacyjne, cytoprotekcyjne oraz stymulujące endogenne komórki w miejscu przeszczepienia, stanowią dziś najbardziej interesujący aspekt ich aktywności biologicznej pod kątem zastosowań w regeneracji tkanek. Jednakże wciąż istnieje potrzeba zwiększania efektywności ich działania w miejscu uszkodzenia, poprzez m.in. zwiększenie ich właściwości adhezji i zasiedlania

miejsc uszkodzenia, zwiększenia potencjału różnicowania, czy też nadekspresji czynników, które sprzyjałyby samej regeneracji. Istotny aspekt stanowi także optymalne znakowanie tych komórek w celu ich obrazowania w tkankach, co mogłoby rzucić nowe światło na mechanizmy oraz kinetykę działania tych komórek *in vivo*.

Praca doktorska Pani mgr Anny Andrzejewskiej w pełni wpisuje się w ten istotny nurt badań, koncentrując się na modyfikacji genetycznej ludzkich komórek MSCs w celu uzyskania zwiększonej ekspresji adhezyny VLA-4, która stanowi istotną cząsteczkę w oddziaływaniach komórek ze śródbłonkiem. Doktorantka podjęła w swojej pracy szereg działań mających na celu nie tylko uzyskanie komórek MSCs z nadekspresją tej cząsteczki, co może mieć istotne znaczenie dla retencji tych komórek w uszkodzonych tkankach, ale również podjęła się wyselekcjonowania optymalnych metod znakowania takich przeszczepionych komórek w celu ich późniejszej identyfikacji w tkankach z zastosowaniem technik obrazowania powszechnie używanych w medycynie, takich jak technika MRI. Badania objęte w pracy stanowią zatem istotny krok w kierunku optymalizacji metod modyfikacji genetycznej przeszczepianych komórek macierzystych, jak również ich późniejszego przyżyciowego i efektywnego obrazowania w tkankach *in vivo*.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 143 strony i zachowuje układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawa rozpoczyna się od *Spisu treści*, po którym następuje *Wykaz skrótów* stosowanych w pracy. Następnie w pracy umieszczono *Przegląd Piśmiennictwa*, będący merytorycznym wstępem do podejmowanych w pracy aspektów badawczych. Rozdział ten liczy 39 strony maszynopisu i został podzielony na 6 głównych podrozdziałów, zaopatrzonych w 4 ryciny i 1 tabelę, ilustrujące omawiane zagadnienia. Kolejny dwustronicowy rozdział zatytułowany *Założenia i cele pracy*, obejmuje uzasadnienie oraz najważniejsze cele badawcze, jakie Doktorantka postawiła w swojej pracy doktorskiej. Kolejny jednostronicowy rozdział *Materiał* obejmuje opis materiału biologicznego, który Doktorantka zastosowała w swojej pracy, który został zaopatrzony w dodatkową rycinę przedstawiającą schemat doświadczeń prowadzonych w pracy. Po nim następuje 16-stronicowy rozdział *Metody badań*, w którym Doktorantka przedstawia najważniejsze metody stosowane w pracy, który został zaopatrzony w 7 rycin oraz 3 tabele dotyczące przebiegu doświadczeń. Rozdział *Wyniki* liczy 30 stron, na których umieszczono 28 złożonych, wielopanelowych rycin. Następnie w pracy umieszczono 13-stronicowy rozdział *Dyskusja wyników*, w którym Doktorantka omawia swoje wyniki na tle dotychczasowych doniesień naukowych, których spis umieszczono w dalszym rozdziale *Spis*

piśmiennictwa (na końcu rozprawy). Po dyskusji umieszczono rozdziały *Podsumowanie* oraz *Wnioski*, gdzie na 1 stronie w punktach podsumowano najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej. Po spisie piśmiennictwa, na końcu pracy, umieszczono 4-stronicowe *Streszczenie* pracy w języku polskim (uzupełnione dodatkowymi dwoma schematami) oraz 3-stronicowy abstrakt w języku angielskim.

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia w pełni wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

Ocena merytoryczna

W rozdziale *Przegląd piśmiennictwa* będącym wstępem do pracy, Doktorantka przedstawiła w sposób obszerny dobrze dobrane treści wprowadzające czytelnika w zakres merytoryczny, jak również ułatwiający czytelnikowi zrozumienie celów oraz znaczenia badań podejmowanych w rozprawie doktorskiej. Doktorantka w sposób bardzo obszerny i wyczerpujący omawia zagadnienia dotyczące historii odkryć, źródeł oraz kryteriów identyfikacji komórek MSCs, jak również wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące właściwości immunomodulacyjnych oraz parakrynnych tych komórek w kontekście ich wykorzystania w naprawie tkankowej. Przytacza także przykłady prób eksperymentalnego wykorzystania komórek MSCs w leczeniu wybranych chorób układu nerwowego, w tym w ostrych uszkodzeniach OUN, co uzupełniła informatywną tabelą wskazującą na mechanizmy zależne od komórek MSCs, które mogą brać udział w poprawie funkcji układu nerwowego po przeszczepie tych komórek. Następnie Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy i wnikliwy omawia techniki oraz znaczniki stosowane w celu znakowania komórek, w tym KM, w celu ich późniejszej wizualizacji w tkankach, co stanowiło jeden z zasadniczych tematów jej pracy doktorskiej. W mojej ocenie ta część wstępu szczególnie stanowi bardzo dobre kompendium wiedzy na temat techniki wykorzystywanych w znakowaniu obrazowaniu komórek po przeszczepieniu *in vivo*. W ostatniej części tego rozdziału Doktorantka opisuje różne drogi podania komórek do obszarów OUN, ich zasiedlania tkanek uszkodzonego OUN po ich podaniu systemowym.

Podsumowując, *Przegląd piśmiennictwa* jest przygotowany bardzo starannie i wyczerpująco, w pełni dostarczając tła merytorycznego dla zrozumienia celów i działań podejmowanych dalej w pracy. stanowi on mocną część całej rozprawy i w mojej ocenie powinien stać się podstawą pracy przeglądowej w tym temacie.

Do tej części pracy mam nieliczne uwagi oraz pytania inspirowane ciekawością naukową, w tym następujące:

- w niektórych miejscach pracy przy krytycznych informacjach merytorycznych brak odniesienia do referencji w literaturze (np. str. 24, 25, 28, 37);

- zastrzeżenie budzi użyty w kilku miejscach pracy (np. na str. 30) termin "kwantyfikacja" np. komórek, który należałoby raczej zastąpić sformułowaniem "analiza ilościowa", bo zapewne o to chodziło Doktorantce.

- na str. 36-38, Doktorantka opisuje budowę i funkcję bariery krew-mózg, przytaczając informacje o poszczególnych warstwach. m.in. komórkowych wchodzących w skład. W mojej ocenie, w celu uporządkowania informacji, byłoby wskazane umieszczenie schematu obrazującego poszczególne warstwy komórkowe i pozakomórkowe budujące BBB.

- na str. 25, Doktorantka pisze o efektach systemowego podania komórek MSCs w modelu EAE, po którym zaobserwowano wytworzenie tolerancji u biorcy na własne antygeny. Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić na czym może polegać proces takiego wytwarzania tolerancji? Jakie mechanizmy zależne od MSCs mogą potencjalnie brać udział w tym procesie?

- na str. 43, Doktorantka pisze m.in. o molekułach zaangażowanych w oddziaływanie komórek MSCs ze śródbłonkiem po podaniu dożylnym, w tym podaje informację, że MSCs nie posiadają na swojej powierzchni selektyn, co może wskazywać na innych mechanizm "dokowania" MSCs do komórek śródbłonka, niż właśnie poprzez te molekuly. Czy Doktorantce wiadomo coś na temat indukowanej ekspresji selektyn na powierzchni MSCs? Czy istnieją badania wskazujące, że np. w środowisku stanu zapalnego może jednak dochodzić do zwiększonej ekspresji selektyn lub innych molekuł adhezyjnych na powierzchni MSCs, co potencjalnie mogłoby jednak tłumaczyć oddziaływanie MSCs ze śródbłonkiem poprzez te cząsteczki w miejscach zapalnych?

Myślę, że odpowiedzi na te pytania będą ciekawym wstępem do dyskusji nad pracą w czasie jej obrony.

Założenia i cel pracy zostały sformułowane jasno oraz przedstawione i dobrze uzasadnione w kontekście wiedzy omówionej we wprowadzeniu.

W rozdziale *Materiał* Doktorantka umieściła opis materiału biologicznego stosowanego w badaniach, który stanowiły komercyjnie dostępne ludzkie komórki macierzyste mezenchymalne (MSCs) szpiku kostnego oraz w celu wykonania badań *in vivo* - zwierzęta (szczury szczepu Wistar). Tę część Doktorantka uzupełniła schematem prowadzonych w pracy doświadczeń. Ta część napisana jest jasno i informatywnie.

- niewielki zastrzeżenie budzi jedynie brak informacji o liczbie linii komórek MSCs, które Doktorantka zakupiła i stosowała w pracy oraz informacji, czy prawidłowy fenotyp wieloantygenowy MSCs był sprawdzony przez Doktorantkę, czy został podany przez firmę dostarczającą komórki.

W rozdziale *Metody badań* w sposób dokładny i wyczerpujący zostały opisane procedury eksperymentalne zastosowane w pracy. Procedury zostały opisane w sposób zasadniczo pozwalający na odtworzenie przeprowadzonych eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała w swojej pracy szereg metod biologii komórkowej i molekularnej, w tym metody specjalnie opracowane i dedykowane jej badaniom, takie jak m.in. system do ilościowej oceny poszczególnych etapów migracji i oddziaływania komórek w przepływie z komórkami śródbłonna, co pozwala dokładniej prześledzić procesy wiązania, toczenia się i diapedezy.

Uwagi do tej części pracy:

- na str. 53 (Hodowla komórek hBM-MSCs) – brak informacji odnośnie stosowanej pożywki MSCBM. Nie jest to standardowa pożywka do hodowli MSCs i dlatego wskazana byłaby krótka informacja co to jest za medium, dlaczego takie zostało zastosowane w pracy.

- na str. 56, Doktorantka zamieszcza tabelę (Tabela 4) ze starterami użytymi do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. W tabeli umieszczono jednak tylko sekwencję jednego startera (*forward*). Brak sekwencji drugiego startera. Z czego to wynika?

- na str. np. 58-59, Doktorantka podając procedury znakowania komórek przeciwciałami (i 7-AAD), podaje ich ilość w mikrolitach. Byłoby stosowniej podać końcowe stężenie/a stosowanego odczynnika.

Wyniki zostały zaprezentowane w 30-o stronicowym rozdziale *Wyniki*, podzielonym na 3 główne podrozdziały przedstawiające rezultaty badań przeprowadzonych w 3 głównych etapach. Wyniki zostały zaprezentowane w sposób przejrzysty, w tym z zastosowaniem 28 rycin zawierających zarówno zdjęcia komórek, jak również dane ilościowe z prowadzonych badań. Wyniki są opisane w sposób zrozumiały i usystematyzowany.

W pierwszej części Doktorantka przedstawiła wyniki odnoszące się do przydatności wybranych metod przyżyciowego znakowania komórek MSCs dla celów ich dalszej detekcji w tkankach. W tej części zbadała efektywność znakowania MSCs trzema znacznikami oraz ich wpływ na fenotyp i wybrane funkcje tych komórek *in vitro*, w tym na ich właściwości różnicowania. Doktorantka wykazała, że znacznik oparty o nanocząstki tlenku żelaza sprzęgnięty z fluorescencyjną rodaminą B (Molday ION),

stanowi optymalny znacznik dla komórek MSCs spośród badanych, m.in. ze względu na stabilność fluorescencji oraz brak negatywnego efektu na fenotyp i wybrane funkcje MSCs. Co więcej, Doktorantka zaobserwowała zwiększoną efektywność różnicowania się komórek MSCs znakowanych Molday ION w kierunku chondrocytów, co w mojej ocenie może stanowić interesującą obserwację w kontekście wykorzystania takich komórek w regeneracji chęstno-kostnej. Zaletą znacznika Molday ION jest również możliwość jego wykorzystania celem znakowania komórek dla dalszego ich obrazowania w tkankach z zastosowaniem technik MRI.

W drugiej części badań Doktorantka skoncentrowała się na modyfikacji genetycznej komórek MSCs w celu zwiększenia w nich powierzchniowej ekspresji integryny VLA-4, co mogłoby zwiększyć oddziaływania tych komórek z komórkami śródbłonna po podaniu dożylnym *in vivo*. Doktorantka wykazała m.in., że dzięki zastosowaniu transfekcji specjalnie przygotowanym wektorem mRNA niosącym informację dla VLA-4, można uzyskać przejściową, zwiększoną ekspresję tego białka na powierzchni MSCs (maksymalną pi 12h od transfekcji). Co ciekawe, Doktorantka wykazała, że komórki z podwyższoną ekspresją VLA-4 wykazują zwiększone właściwości adhezyjne w komorze przepływu imitującej warunki naczynia krwionośnego poprzez pokrycie jej ścian białkiem oddziałującym z VLA-4 (czyli VCAM1), co stanowi istotny punkt wyjścia dla dalszych badań i modyfikacji powierzchni MSCs celem zwiększenia oddziaływań ze śródbłonkiem. Warto zaznaczyć, że dzięki zastosowaniu unikatowego systemu do pomiaru takich interakcji w komorze przepływu, Doktorantka wykazała, że komórki MSCs podlegają procesom toczenia się i pełzania zbliżonym do leukocytów w czasie procesu ich diapedezy.

W trzeciej części badań Doktorantka zbadała zdolność zasiedlania komórek MSCs z nadekspresją VLA-4 tkanek mózgu *in vivo* - po ich dotętnicznym podaniu u szczurów w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prądkowia, który stanowi model uszkodzenia opracowany w laboratorium, w którym wykonywana była niniejsza praca doktorska. Dzięki znakowaniu komórek MSCs znacznikiem Molday ION, stopień zasiedlania tkanek mózgu był oceniany z zastosowaniem techniki MRI. Doktorantka wykazała m.in., że sygnał korelujący z liczbą komórek w tkankach mózgu, był silniejszy w przypadku komórek modyfikowanych genetycznie w porównaniu z komórkami natywnymi. Co istotne komórki z nadekspresją VLA-4 utrzymywały się w tkankach dłużej niż komórki natywne, co stanowi istotny punkt wyjścia dla dalszych optymalizacji tej strategii. Co istotne, zaobserwowano jednak zwiększoną liczbę komórek modyfikowanych we wnętrzu naczyń krwionośnych w miejscu uszkodzenia, jak również wyższy poziom ich fagocytozy przez komórki żerne biorcy, co z pewnością może wskazywać na dalsze kierunki optymalizacji tej strategii, które mogłyby doprowadzić do zwiększenia ekstrawazji komórek MSCs do tkanek mózgu z równoczesnym ograniczeniem ich zalegania w naczyniach oraz

"zmiatania" przez komórki żerne. Z pewnością badania dostarczone przez Doktorantkę są istotne również w tym kontekście.

Podsumowując, wyniki badań zostały przedstawione w sposób przejrzysty i spójny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników Doktorantki zostało już opublikowanych w dwóch artykułach oryginalnych o zasięgu międzynarodowym, a także zostało umieszczone w dwóch artykułach będących obecnie przedmiotem w recenzji.

Do tej części pracy mam następujące drobne uwagi oraz pytania:

- na ryc. 17, panel H, Doktorantka przedstawia wartości parametru SSC odnoszącego się do ziarnistości komórek znakowanych różnymi znacznikami. Z czego według Doktorantki może wynikać większy niż w innych grupach, rozrzut w wartości tego parametru w komórkach MSCs znakowanych Molday ION (zawłaszcza po 2h od znakowania)?

Na tej samej rycinie (17), Panele B, C i D - Co oznacza "siła sygnału fluorescencyjnego"? Jak był mierzony ten parametr?

- na ryc. 19, Doktorantka prezentuje zmiany fenotypu komórek MSCs po znakowaniu różnymi znacznikami, wskazując na wzrost antygenu typowego dla komórek pluripotencjalnych - SSEA-4 w komórkach MSCs po znakowaniu Molday ION. Doktorantka stara się tłumaczyć ten ciekawy fenomen w Dyskusji. Moją ciekawość budzi, czy Doktorantka podążała za tą ciekawą obserwacją i badała np. poziom innych markerów pluripotencji w w/w komórkach MSCs, co mogłoby dostarczyć odpowiedzi, czy rzeczywiście namnożeniu uległa frakcja komórek bardziej wczesnych rozwojowo w populacji MSCs?

- na ryc. 21, przedstawiającej zmiany w ekspresji wybranych genów w komórkach znakowanych, można zauważyć nieistotny statystycznie, ale jednak dość znaczny, wzrost ekspresji mRNA dla genu semaforyny (SEM) m.in. w komórkach znakowanych Molday ION (szczególnie w 5 i 7 dniu po znakowaniu). Moją ciekawość budzi, jaka jest rola tego białka w komórce i czy ma ona związek z działaniem czynnika IGF, którego istotny wzrost również obserwowany w przypadku zastosowania w/w znacznika?

- W eksperymencie oceniającym stopień oddziaływania komórek natywnych i z nadekspresją VLA-4 z powierzchnią imitującą śródbłonek w przepływie, Doktorantka zaobserwowała m.in. większą prędkość

przepływu, toczenia się i pełzania komórek z ekspresją VLA-4 w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi. Jak można wytłumaczyć to ciekawe zjawisko, szczególnie w kontekście zwiększonej prędkości przepływu tych komórek w "naczyniu"?

- drobna uwaga: Na ryc. 17, wykresy w panelach B, C i D są nieco za małe i skale na osi Y są praktycznie nieczytelne.

- uwaga techniczna: Wątpliwość budzą wartości powiększeń umieszczonych w legendach rycin przedstawiających zdjęcia komórek (np. Ryc. 13-16). W mojej ocenie Doktorantka, jako "powiększenie" podała *de facto* wartość powiększenia obiektywu użytego do obrazowania (bez uwzględnienia powiększenia okularu lub kamery), co nie jest tożsame z powiększeniem obrazu. Jeśli Doktorantka stosowała kamerę w celu zapisu obrazów, bardziej stosownym byłoby umieszczenie skali na zdjęciu i podanie jej wymiaru w mikrometrach.

W rozdziale *Dyskusja* autorka dojrzałe ocenia własne wyniki na tle innych danych literaturowych oraz wskazuje, gdzie wyniki uzyskane w jej pracy doktorskiej mogą być wykorzystane w przyszłości. Dyskusja jest napisana starannie i wskazuje na znajomość tematu. Nie mam uwag krytycznych do tej części rozprawy.

W rozdziałach *Podsumowanie* oraz *Wnioski*, Doktorantka podsumowała w punktach główne osiągnięcia badawcze swojej pracy oraz przedstawiła najważniejsze wnioski płynące z jej badań. Nie mam uwag krytycznych do tej części rozprawy.

Streszczenie pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, umieszczone na końcu rozprawy, zostało przygotowane przez Doktorantkę bardzo starannie i zawiera najistotniejsze informacje odnośnie prowadzonych badań; jest informatywne i w sposób wyczerpujący przedstawia uzasadnienie oraz zakres rozprawy doktorskiej. Dodatkowo Doktorantka uzupełniła streszczenie dwoma informatywnymi schematami.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana starannie. W czasie czytania pojawiają się jedynie nieliczne, drobne błędy literowe i interpunkcyjne, w tym drobne błędy w terminach, np. "PRC" zamiast "PCR", "acytwina A" zamiast, jak sądzę, "aktywiny A", brak cyfry w numeracji niektórych rycin (np. ryc. 5, zamiast 35, na str. 93). Wspomniane drobne błędy edytorskie nie umniejszają jednak w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy.

Podsumowując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Anny Andrzejewskiej, Doktorantka podjęła się ważnych działań badawczych mających na celu z jednej strony wyselekcjonowanie optymalnego znacznika komórkowego dla dalszego śledzenia losów przeszczepionych komórek w tkankach, co stanowi istotny aspekt praktycznych zastosowań komórek macierzystych w terapiach oraz ich obrazowania w tkankach, co również rzuciłoby nowe światło na mechanizmy i kinetykę działania takich komórek w tkankach po przeszczepieniu *in vivo*. Doktorantka podjęła także ważny temat modyfikacji genetycznej komórek macierzystych stosowanych w celach regeneracyjnych, celem zwiększenia ich efektywności w tkankach, poprzez np. zwiększenie ich retencji do uszkodzonych tkanek po podaniu systemowym. Wykazała, że taka strategia jest możliwa i chociaż wymaga dalszych optymalizacji, otwiera nowe możliwości w zastosowaniach komórek MSCs w regeneracji tkanek, co jest walorem tej pracy. Wyniki Doktorantki przedstawione w pracy stanowią jej nowatorski wkład w światowe badania w tym zakresie i mają również potencjalne znaczenie aplikacyjne.

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Andrzejewskiej oceniam wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji powyższe uwagi oraz pytania nie wpływają na jak najbardziej pozytywną moją ocenę całej pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Anny Andrzejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na dotychczasowy dorobek Doktorantki oraz aplikacyjne aspekty i wysoką wartość naukową rozprawy, wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

