



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 1 września 2022 r.

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak  
Kierownik Samodzielnego Laboratorium  
Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wioletty Lech na stopień naukowy doktora nauk medycznych w dyscyplinie: biologia medyczna**

**Tytuł rozprawy: Ocena właściwości neuroprotektoryjnych i regeneracyjnych komórek WJ-  
MSC w warunkach kontrolnych i modelach uszkodzenia OUN *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo***

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Wioletty Lech została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n med. Leonory Bużańskiej w Zakładzie Bioinżynierii Komórek Macierzystych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy jest Pani dr n. med. Marzena Zychowicz.

Jest to obszerne opracowanie napisane w języku polskim, zawarte na 201 stronach maszynopisu, bogato ilustrowane, zawierające 39 rycin stanowiących wykresy, fotografie lub schematy oraz 6 tabel ułatwiających analizę uzyskanych wyników. Rozprawa posiada układ typowy dla prac doktorskich tj. Streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzający w temat rozprawy Wstęp, jasno sformułowane Hipoteza badawcza i Cele pracy, opisy stosowanych Materiałów i Metod, Wyniki, Dyskusję, Wnioski oraz bogatą Bibliografię. Obszerny wykaz stosowanych skrótów znakomicie ułatwia recenzję pracy.

Terapie komórkowe w badaniach eksperymentalnych w obszarze medycyny regeneracyjnej to dynamicznie rozwijająca się gałąź medycyny i stanowią nadzieję na regenerację uszkodzonych tkanek, w tym ośrodkowego układu nerwowego (OUN), dla których obecnie nie ma skutecznego sposobu leczenia. Efektywność terapii komórkowej w leczeniu chorób OUN zależy od biologicznych właściwości stosowanych komórek, sposobu podania, a postęp w rozwoju badań nad potencjałem terapeutycznym mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) niesie nadzieję na opracowanie skutecznej terapii.

Zakładając, że potencjał terapeutyczny przygotowanych *in vitro* MSC zależy od warunków mikrośrodowiska, Doktorantka podjęła się oceny potencjału terapeutycznego mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC), w warunkach biomimetycznych właściwych dla tkanki nerwowej OUN, poprzez dobór odpowiedniej struktury skafoldów hydrożelowych 3D utworzonych z białek ludzkiego osocza oraz obniżenie poziomu tlenu do „fizjologicznej normoksji” 5% O<sub>2</sub>. Modelem badawczym uszkodzenia OUN był udar niedokrwienności mózgu w modelu szczurzym.





W tym celu przeprowadzone zostały badania w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych w układzie *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. W badaniach *in vitro* grupy eksperymentalne stanowiły komórki WJ-MSC hodowane w różnych warunkach tlenowych (21% O<sub>2</sub> lub 5% O<sub>2</sub>) i przestrzennych 2D lub 3D z wykorzystaniem hydrożelowych skafoldów – z lizatu płytkowego (LP) oraz fibrynogenu (FB). W badaniach *ex vivo* grupy eksperymentalne stanowiły organotypowe skrawki hipokampa szczura uszkodzone w wyniku czasowego niedoboru tlenu i glukozy (OGD), a następnie hodowane z komórkami WJ-MSC. W badaniach *in vivo* grupy eksperymentalne stanowiły szczury poddane uszkodzeniu mózgu indukowanym ouabainą (OUA), którym do miejsca uszkodzenia podano komórki WJ-MSC z hodowli 2D lub 3D prowadzonej w różnych warunkach tlenowych (21% O<sub>2</sub> lub 5% O<sub>2</sub>) lub sól fizjologiczną albo pusty skafold jako kontrolę.

Część doświadczalną rozprawy poprzedza obszerny **Wstęp** literaturowy, w którym Doktorantka w przedstawiła mechanizmy powstawania udaru niedokrwiennego mózgu związane z aktywnością komórek glejowych i komórek układu odpornościowego, które biorą udział w złożonych procesach zmian patofizjologicznych prowadzących do niewydolności bioenergetycznej komórek, dysfunkcji bariery krew-mózg, uszkodzenia mikrokrążenia, rozwoju stanu zapalnego i w konsekwencji do martwicy lub apoptozy neuronów, komórek glejowych i komórek śródbłonna naczyń. Ponadto, szczególną uwagę Doktorantka poświęciła biologicznym właściwościom mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC) i znaczeniu niszy komórkowej w procesach rozwojowych i aktywności biologicznej komórek MSC.

We Wstępie znalazły się uchybienia redakcyjne, które nie umniejszają wartości pracy a przedstawiam je z obowiązku recenzenta:

- Opis ze strony 38 „Zastosowanie terapeutyczne MSC pozyskiwanych z dorosłych tkanek, wiąże się jednak z inwazyjną i bolesną procedurą izolacji oraz ryzykiem infekcji”. Procedura izolacji komórek odbywa się *in vitro* i nie jest bolesna, raczej procedura pobrania tkanek do izolacji może być bolesna, powyższe zdanie należy odpowiednio przeredagować.
- W pracy często pojawia się potoczne wyrażenie „przeszczep komórek” czy „przeszczep WJ-MSC” jako nazwa procedury podania komórek, tymczasem poprawna nazwa procedury to „przeszczepienie komórek”. „Przeszczep” to materiał przeszczepiany.
- W spisie literatury brak danych bibliograficznych prac cytowanych we wstępie: Bozdag i wsp., 2018 na stronie 36, Johnson i wsp., 2017 cytowanej na stronie 37, Chu i wsp., 2020 str. 37, Murphy i wsp., 2013 str. 38, Dąbrowska i wsp., 2018 str. 38, Marino i wsp., 2019 str. 40, Sargeant i wsp., 2012 str. 44.
- Wyrażenia: „ilość komórek” należy zamienić na „liczbę komórek” (również w pozostałych częściach pracy).

**Hipoteza badawcza** została jasno sformułowana i wynika z przedstawionych we Wstępie zagadnień dotyczących potencjału terapeutycznego komórek WJ-MSC zależnych od mikrośrodowiska *in vitro*, w którym przygotowane zostaną komórki do zastosowania w leczeniu uszkodzeń tkanki ośrodkowego układu nerwowego. Hipoteza badawcza została zweryfikowana w eksperymentach „proof of concept” *ex vivo* z wykorzystaniem hodowli



organotypowej uszkodzonych hipokampów szczura oraz *in vivo* po przeszczepieniu WJ-MSC do mózgu szczura w eksperymentalnym modelu udaru niedokrwiennego.

**Rozdział Materiał i rozdział Metody** zawierają szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonych procedur niezbędnych do wykonania zadań badawczych. Pobranie materiału klinicznego w postaci sznura pępowinowego do izolacji komórek macierzystych/stromalnych zostało zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Badania *ex vivo* i *in vivo* uzyskały akceptację odpowiednich Lokalnych Komisji Etycznych ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Lista opisanych procedur i badań jest szczegółowa i wraz z przedstawionymi wynikami nie pozostawia wątpliwości, że Doktorantka znakomicie opanowała warsztat badawczy w zakresie niezbędnym do oceny wyników badań mających na celu udowodnienie hipotezy badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Doktorantka przejrzyście opisała metodologię poszczególnych etapów pracy doświadczalnej dotyczących badań: (1) *in vitro* mających na celu charakterystykę WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych mikrośrodowiska 2D i 3D na hydrożelowych skafoldach oraz poziomu tlenu atmosferycznego 21% O<sub>2</sub> i fizjologicznej normoksji 5% O<sub>2</sub>, (2) *ex vivo* poprzez ocenę działania neuroprotektoryjnych komórek WJ-MSC na komórki ośrodkowego układu nerwowego szczura w warunkach przestrzennych skrawków organotypowych hipokampa szczura uszkodzonych w modelu ischemicznym wywołanym czasowym pozbawieniem tlenu i glukozy, (3) *in vivo* poprzez ocenę potencjału terapeutycznego WJ-MSC po podaniu do uszkodzonego ouabainą mózgu szczura.

Dodatkowym atutem pracy jest bogata ilustracja przeprowadzonych procedur eksperymentalnych w postaci schematów co znakomicie ułatwia ocenę wykonanych czynności. W opisie metod nasuwa się kilka pytań:

- W opisie modelu badawczego *ex vivo* podano, że współhodowlę organotypową skrawków hipokampa szczura z komórkami WJ-MSC rozpoczęto bezpośrednio po zakończeniu procedury czasowego pozbawienia tlenu i glukozy (Ryc. 16). Jakże były przesłanki aby w eksperymencie *in vivo* komórki WJ-MSC zostały podane po 48 godzinach od momentu wywołania uszkodzenia indukowanego ouabainą (Ryc. 17)?
- Dotychczasowe badania MSC dokumentują, że biologiczna aktywność MSC jest najbardziej efektywna we wczesnych pasażach i może być zależna osobniczo. Komórki WJ-MSC do badań *in vivo* pochodziły z pasażu 3-5 (str. 78). Czy WJ-MSC użyte do hodowli trójwymiarowych i do badań *ex vivo* współhodowli ze skrawkami hipokampa szczura pochodziły z tych samych pasaży? Czy WJ-MSC użyte do badań *in vivo* pochodziły z tej samej izolacji co komórki do badań *in vitro* i *ex vivo*? Ile izolacji WJ-MSC zostało wykonanych?

**Wyniki.** W rozdziale Wyniki Autorka szeroko i starannie udokumentowała wyniki badań dotyczące efektywności potencjału terapeutycznego WJ-MSC w różnych warunkach mikrośrodowiska. Analizę ułatwiają liczne wykresy i ryciny, które znakomicie ilustrują uzyskane wyniki.

W badaniach *in vitro* wyznacznikiem były: żywotność; proliferacja; zdolność do migracji; zdolność do różnicowania w kierunku neuralnym; ekspresja czynników bioaktywnych i cytokin prozapalnych; zmiany w profilu ekspresji wybranych genów w odpowiedzi na stymulację



czynnikami prozapalnymi. Autorka udokumentowała, że komórki WJ-MSC wykazują liniowe tempo wzrostu w warunkach 2D oraz 3D, który był istotnie szybszy w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O<sub>2</sub>) w porównaniu do 21% O<sub>2</sub>. W hodowlach 3D ekspresja badanych czynników bioaktywnych (BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1, IL-6, IL-1β) na poziomie mRNA uległa znaczącemu zwiększeniu już po 24 godz. i efekt ten utrzymywał się w trakcie kilkudniowej hodowli *in vitro*, zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu w odniesieniu do hodowli 2D.

W komórkach WJ-MSC hodowanych w skafoldach LP i FB zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów neuralnych (nestyny, β-Tubuliny III, NF-200 i GFAP) na poziomie mRNA oraz białka. Poziom stężenia tlenu wpływał na kierunek różnicowania neuralnego WJ-MSC: przy stężeniu tlenu na poziomie 21% zaobserwowano tendencję do zwiększonego różnicowania w kierunku glejowym (znaczący wzrost ekspresji GFAP). Fizjologiczna normoksja (5% O<sub>2</sub>) sprzyjała zwiększonej ekspresji markera neuralnych komórek macierzystych – nestyny oraz markera różnicowania w kierunku neuronów NF-200.

Stymulacja komórek WJ-MSC *in vitro* czynnikami prozapalnymi (TNFα + IFNγ) zarówno w warunkach 2D jak i 3D wywołała znaczący wzrost ekspresji markerów stanu zapalnego:IDO-1 oraz TSG-6, oraz wzrost ekspresji zarówno czynników troficznych (BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1) jak i cytokin prozapalnych (IL-6 oraz IL-1β), przy czym warunki 3D istotnie zwiększały ekspresję wszystkich badanych czynników bioaktywnych.

W badaniach *ex vivo* wyznacznikiem efektywności potencjału terapeutycznego WJ-MSC były: neuroprotekcja uszkodzonych w wyniku czasowego niedoboru tlenu i glukozy skrawków hipokampa szczura; zmiany w ekspresji badanych markerów (wyznaczników różnicowania i zdolności parakrynych) po współhodowli z uszkodzoną tkanką nerwową. Komórki WJ-MSC hodowane w hydrożelowych skafoldach, zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu, wykazały silne działanie ochronne względem uszkodzonych skrawków organotypowych hipokampa szczura. Najsilniejsze działanie ochronne wykazały komórki hodowane w skafoldach z fibrynogenu w obecności 5% tlenu.

Ponadto, komórki WJ-MSC w warunkach 3D (skafoldy LP i FB), po współhodowli z uszkodzonymi skrawkami hipokampa, wykazywały istotny wzrost ekspresji czynników troficznych (GDNF, VEGF-A) oraz spadek ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1β), przy jednoczesnym wzroście ekspresji cytokin przeciwzapalnych tj. TGF-β.

Proszę o odniesienie się do poniższych pytań/komentarzy dotyczących badań *in vitro* i *ex vivo*:

- Analizę ekspresji czynników troficznych i cytokin: BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1, IL-6, IL-1β na poziomie mRNA została przeprowadzona w komórkach WJ-MSC hodowanych *in vitro* w warunkach 2D lub 3D oraz w warunkach obecności tlenu 21% O<sub>2</sub> lub 5% O<sub>2</sub>. Dlaczego analiza odpowiedzi komórek WJ-MSC na stymulację czynnikami prozapalnymi (TNFα 5 ng/ml + IFNγ 5 ng/ml) w warunkach 3D została przeprowadzona tylko w warunkach „fizjologicznej normoksji” 5% O<sub>2</sub>?
- Pytanie to poprzedza kolejne badania przeprowadzone *ex vivo* gdzie zastosowano eksperymentalny model ischemicznego uszkodzenia skrawków hipokampa szczura poprzez przeprowadzenie procedury czasowego pozbawienia tlenu i glukozy a komórki WJ-MSC były użyte we współhodowli ze skrawkami hipokampa jako źródło czynników bioaktywnych o działaniu neuroprotekcijnym w warunkach hodowli 21% O<sub>2</sub> lub 5% O<sub>2</sub>. Zaobserwowano, że komórki WJ-MSC hodowane w hydrożelowych skafoldach zarówno w warunkach 21% jak i



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

5% stężenia tlenu wykazują silne działanie ochronne wobec uszkodzonych skrawków hipokampa szczura. Ocena ekspresji mRNA dla badanych czynników bioaktywnych wykazała, że w przypadku hodowli komórek WJ-MSC eksponowanych na działanie czynników wydzielanych przez uszkodzoną tkankę nerwową, w warunkach 21% O<sub>2</sub> odnotowano wyższy poziom ekspresji GDNF i VEGF-A niż w warunkach fizjologicznej normoksji 5% O<sub>2</sub> (Ryc. 30). GDNF sprzyja przeżyciu i regeneracji dojrzałych neuronów, natomiast VEGF, który zaangażowany jest w różnych etapach neurorozwoju, przede wszystkim stymuluje procesy angiogenezy co ma istotne znaczenie dla prawidłowego unaczynienia tkanek. Stąd istotnym pytaniem jest jaki efekt ma zostać osiągnięty: jeżeli ma to być działanie proregeneracyjne to korzystniejsze dla hodowli WJ-MSC są warunki tlenu atmosferycznego 21%, natomiast działanie przeciwzapalne związane ze zwiększoną ekspresją TGF-β1 korzystniej będzie osiągnąć w warunkach prekondycjonowania WJ-MSC w normoksji fizjologicznej 5% O<sub>2</sub>. Zatem, proszę o komentarz który model prekondycjonowania może być rozważany do przygotowania komórek dla celów terapeutycznych?

W badaniach *in vivo* efektywność potencjału terapeutycznego WJ-MSC została oceniona poprzez potwierdzenie obecności i przeżycia przeszczepionych komórek oraz ekspresję czynników troficznych i cytokin biorcy badaną w tkance i w płynie mózgowo-rdzeniowym.

W celu identyfikacji przeszczepionych komórek WJ-MSC znakowanych nanocząsteczkami tlenku żelaza (SPIO) zastosowano nowoczesną technologię bioobrazowania z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego i wysokorozdzielczego skanu TurboRARE-T2. Sygnał generowany przez komórki WJ-MSC znakowane nanocząsteczkami tlenku żelaza (SPIO) pozwolił na wizualizację komórek po podaniu do miejsca uszkodzenia mózgu (prążkowie) wywołanego ouabainą po 24 godz. od transplantacji i utrzymywał się w czasie 21-dniowej obserwacji. Zaobserwowano istotne zahamowanie uszkodzenia mózgu w następstwie podania komórek WJ-MSC, przy czym, podanie komórek w skafoldach przyczyniło się do zmniejszenia uszkodzenia mózgu w większym stopniu niż w przypadku przeszczepienia komórek w soli fizjologicznej. W następstwie indukowanego iniekcją ouabainy uszkodzenia mózgu zaobserwowano zwiększoną ekspresję BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1, IL-6 oraz IL-1β.

Podanie komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura spowodowało wzrost ekspresji sznurzych markerów troficznych i cytokin na poziomie mRNA dla: BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1 oraz spadek ekspresji IL-6 i IL-1β w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowie, gdzie nie zostały podane komórki. Najwyższy wzrost analizowanych genów zaobserwowano w przypadku podania komórek, które były hodowane w warunkach fizjologicznej normoksji, a następnie przeszczepione w skafoldach LP. Analiza poziomu czynników neurotroficznych i cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po przeszczepieniu komórek WJ-MSC wykazała wzrost poziomu BDNF, GDNF, TGF-β1 w porównaniu do poziomu obserwowanego po uszkodzeniu ogniskowym bez podania komórek WJ-MSC. Wyższy poziom badanych czynników obserwowano po podaniu WJ-MSC w skafoldach w porównaniu do komórek z hodowli 2D. Jednocześnie, u szczurów po podaniu komórek WJ-MSC zaobserwowano zmniejszony poziom cytokin prozapalnych IL-6 oraz IL-1β w płynie mózgowo-rdzeniowym.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

**Wnioski** wynikające z podsumowanych wyników stanowią wyczerpującą odpowiedź na postawione cele i zadania badawcze.

**Dyskusja.** Dogłębna dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnień dotyczących biologicznej aktywności WJ-MSC oraz potencjalnego wykorzystania ich bioaktywności w postępowaniu terapeutycznym. Doktorantka w sposób krytyczny dokonała przejrzystej analizy i interpretacji uzyskanych wyników na tle bogatego piśmiennictwa w większości opublikowanego w ostatnich latach.

**Podsumowanie.** Praca została starannie zredagowana z dużą dbałością o stronę graficzną, jednak Doktorantka nie ustrzegła się pewnych błędów redakcyjnych czy stylistycznych. Uchybienia redakcyjne, o których wspomniałam w treści recenzji, w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy a stanowią jedynie wskazówki dla Autorki przed opracowaniem wyników pracy do druku w specjalistycznym czasopiśmie.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Wioletty Lech stanowi oryginalne i nowatorskie osiągnięcie naukowe polegające na wykazaniu pozytywnego wpływu warunków biomimetycznych do „prekodycjonowania” komórek WJ-MSC w celu uzyskania pożądanego potencjału terapeutycznego.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie dowiodły, że dzięki zastosowaniu określonych warunków biomimetycznych hodowli komórek WJ-MSC (stała fizjologiczna normoksja 5% O<sub>2</sub>, skafoldy hydrożelowe wykonane z białek ludzkiego osocza), otrzymano komórki o najkorzystniejszym profilu neuroprotektynym i przeciwzapalnym. Odpowiednie przygotowanie *in vitro* komórek MSC przed przeszczepieniem ma kluczowe znaczenie dla opracowania nowych, skutecznych rozwiązań w medycynie regeneracyjnej, szczególnie w perspektywie późniejszego opracowania innowacyjnego produktu leczniczego terapii zaawansowanej (ATMP, ang. Advanced Therapy Medicinal Product) w leczeniu chorób OUN o niskim wskaźniku sukcesu terapeutycznego, co stanowi wymiar społeczny.

Z uwagi na wysoką wartość poznawczą wyników niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wyjątkową staranność w opracowaniu wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej dysertacji doktorskiej stosowną nagrodą.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478 ze zmianami), stawiane rozprawom na stopień doktora, wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr Wioletty Lech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Laboratorium Biologii Komórek  
Macierzystych i Nowotworowych

Prof. dr hab. Aleksandra Klimczak

