IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Dyrektor
Prof. dr hab. n. med. Leonora Bużańska
Kierownik Zakładu Bioinżynierii Komórek Macierzystych
Tel: (48 22) 668 52 50
Fax: (48 22) 668 55 32
e-mail: sekretariat@imdik.pan.pl

Warszawa, 06.02.2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej, pt. „Szczegółowa charakterystyka komórek macierzystych izolowanych z Galarety Whartona (WJ-MSC) przy użyciu nowoczesnych metod genetyki molekularnej. Ocena potencjału regeneracyjnego WJ-MSC w oparciu o mysi model niedotlenienia kończyny dolnej (HLI)"

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej dotyczy charakterystyki oraz oceny właściwości terapeutycznych komórek mezenchymalnych wyizolowanych z Galarety Whartona (WJ-MSC) w leczeniu schorzeń związanych z niedotlenieniem kończyn. Temat rozprawy jest istotny zarówno merytorycznie – ciągle nie znane są mechanizmy molekularne leżące u podstaw działania MSC w miejscu przeszczepu, jak i społecznie – poszukiwany jest skuteczny sposób terapii, a także przeciwdziałanie zmianom degeneracyjnym po niedotlenieniu tkanki mięśniowej.

Badania Doktorantki prowadzone pod opieką merytoryczną promotora prof. Marcina Majki w Zakładzie Transplantologii, Katedrze Immunologii Klinicznej i Transplantologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum w Krakowie, mają na celu uzupełnienie wiedzy w tym temacie, a przedstawione wyniki są istotnym wkładem w zrozumienie i standaryzację otrzymywania kompetentnych terapeutycznie MSC, które można stosować do regeneracji tkanki mięśniowej.

Prace badawcze nad właściwościami regeneracyjnymi MSC i ich translacją do kliniki od lat prowadzone są w Zespole prof. Marcina Majki. Prace te doprowadziły ostatnio do opracowania produktu leczniczego „CardioCell" otrzymanego na bazie WJ-MSC, który obecnie stosowany jest w trzech randomizowanych, podwójnie zaślepionych próbach klinicznych. Część przedstawionej do oceny dysertacji stanowią badania przedkliniczne produktu „CardioCell" w modelu mysim niedotlenienia kończyny dolnej, a wyniki tych badań stały się podstawą merytoryczną do rozpoczęcia prób klinicznych.

02-106 Warszawa
ul. A. Pawińskiego 5
Tel.: (0-22) 668 52 50
Fax: (0-22) 668 55 32
www.imdik.pan.pl

IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

Recenzowana rozprawa doktorska jest zbiorem trzech związanych tematycznie prac, opublikowanych w 2019 roku w międzynarodowych czasopismach naukowych („International Journal of Molecular Sciences" oraz „Cell Transplantation") indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście Journal Citation Reports. Łączny współczynnik oddziaływania tych prac jest wysoki i wynosi IF=11,8. Dwa przedstawione artykuły to prace badawcze - oryginalne, trzeci artykuł jest pracą przeglądową, we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Wymagane oświadczenia współautorów, które świadczą o wiodącej roli Doktorantki w tych publikacjach zostały dołączone do rozprawy.

Rozprawa opatrzona jest krótkim „Wprowadzeniem" dotyczącym przedmiotu pracy i zawiera kolejne rozdziały: „Cele pracy", „Materiały i metody", „Piśmiennictwo", „Streszczenia artykułów w języku polskim i angielskim", „Wyniki i wnioski" oraz „Podsumowanie". Wyodrębnione przez Doktorantkę cele pracy zawierały (cytuję):

1. Opracowanie i zoptymalizowanie metody izolacji oraz hodowli komórek WJ-MSC.
2. Szczegółową charakterystykę WJ-MSC przy zastosowaniu technik mikroskopowych i molekularnych, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości proangiogennych i kardiotroficznych.
3. Stworzenie mysiego modelu niedotlenienia kończyny dolnej.
4. Ocenę potencjału regeneracyjnego WJ-MSC *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu niedotlenienia kończyny dolnej
5. Ocenę bezpieczeństwa terapii opartej na WJ-MSC.

Analizując sformułowane cele dysertacji, chciałam prosić Doktorantkę o wyjaśnienie, czym różniła się metoda izolacji WJ-MSC od powszechnie stosowanej metody mechanicznej lub enzymatycznej. Ciekawi mnie również, czy mysi model niedotlenienia kończyny dolnej w prezentowanej pracy oryginalnej został autorsko „stworzony" (w tym miejscu użyłabym raczej słowa „opracowany") przez Doktorantkę, czy też znany był wcześniej z literatury (referencja 14 w przedstawionym piśmiennictwie).

W pierwszej pracy składającej się na zbiór prac przewodu doktorskiego, zatytułowanej: "Molecular and functional verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) pluripotency" Doktorantka podjęła się wnikliwej analizy molekularnej badanej populacji WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach tlenowych, ze szczególnym uwzględnieniem markerów pluripotencji (NANOG, OCT-4, SSEA-4). W tym celu, poza typowymi metodami (np. RT-PCR w czasie rzeczywistym) Doktorantka zastosowała nowoczesne techniki biologii molekularnej, m.in. sekwencjonowanie całogenowe (NGS) oraz wysoko specyficzne molekularne techniki cytometrii przepływowej. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie techniki analizy cytofluorymetrycznej z panelem przesiewowym

02-106 Warszawa
ul. A. Pawińskiego 5
Tel.: (0-22) 668 52 50
Fax: (0-22) 668 55 32
www.imdik.pan.pl

IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

„Lyoplate", co umożliwiło zbadanie poziomu ekspresji molekuł adhezyjnych w komórkach WJ-MSC, niezmiernie ważnych dla ustalenia mechanizmu działania tych komórek w przeszczepionej tkance. Charakterystyka molekularna badanej populacji WJ-MSC wykazała, że posiadają wszystkie cechy zdefiniowane dla MSC przez ISCT (International Society for Cellular Therapy), m.in. obecność typowych dla MSC markerów powierzchniowych i zdolność różnicowania do osteoblastów, adipocytów oraz chondroblastów in vitro. Okazało się również, że w WJ-MSC podlegają ekspresji niektóre markery pluripotencji (NANOG, OCT-4, SSEA-4), jednak na znacząco niższym poziomie niż w komórkach indukowanych pluripotencjalnych, które w tym doświadczeniu stanowiły kontrolę. Obniżenie poziomu tlenu w hodowli do 5% spowodowało wzrost ekspresji tych markerów w WJ-MSC, ale ciągle był to poziom znacząco niższy niż w komórkach iPS. Szczególne uwzględnienie poziomu ekspresji genów pluripotencjalnych w tej analizie ma uzasadnienie z punktu widzenia bezpieczeństwa terapeutycznego komórek izolowanych, tym bardziej, że izolacja dotyczy MSC z tzw. „popłodu", cechujących się niedojrzałością rozwojową. Dlatego ważna jest druga część tej pracy, w której badano bezpieczeństwo stosowania WJ-MSC jako terapii komórkowej w modelu in vivo. Śledzenie przeszczepionych komórek, zarówno kontrolnych jak i mezenchymalnych, umożliwiła modyfikacja genetyczna polegająca na wprowadzeniu wektorem lentiwirusowym genu lucyferazy (LUC). Doktorantka badała obecność komórek, ich proliferację i czas przeżycia. Pomimo ekspresji markerów pluripotencji, WJ-MSC po przeszczepieniu podskórnym do myszy nie wykazały właściwości tumorogennych, w przeciwieństwie do kontrolnych komórek iPS, gdzie zaobserwowano pojawienie się mierzalnych guzów podskórnych. Komórki hodowane w obniżonym poziomie tlenu cechował dłuższy czas przeżycia w organizmie myszy. Warto też wiedzieć, że są doniesienia, iż przedłużona hodowla *in vitro* komórek mezenchymalnych (ok. 30 pasaży) w warunkach tlenu atmosferycznego może prowadzić do aberracji chromosomowych, podczas gdy te same komórki hodowane w 5% stężeniu tlenu są stabilne genetycznie (Lech i wsp. Stem Cells International, 2016, dx.doi.org/10.1155/2016/2514917). Świadczy to o pozytywnym wpływie biomimetycznego środowiska hodowli na zdolność komórek do przeżycia w organizmie biorcy. W tym miejscu celowo użyłam słowa „biomimetycznego", ponieważ naturalny poziom tlenu w niszach komórek macierzystych *in vivo* waha się od 3% do 8% i w literaturze nazywany jest „fizjologiczną normoksją" lub „fizjoksją". Termin „hipoksja" stosuje się zwykle do poziomu tlenu poniżej 1% O2. Chciałabym poprosić Doktorantkę o skomentowanie występujących w literaturze rozbieżności, dotyczących tej sprawy.

W drugiej pracy zatytułowanej: "Regenerative potential of the product "CardioCell" derived from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for treating hindlimb ischemia" badano właściwości terapeutyczne ludzkich WJ-MSC po podaniu

02-106 Warszawa
ul. A. Pawińskiego 5
Tel.: (0-22) 668 52 50
Fax: (0-22) 668 55 32
www.imdik.pan.pl

IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

domięśniowym produktu leczniczego „CardioCell" w modelu niedokrwienia kończyn dolnych myszy. Podczas eksperymentu trwającego 3 tygodnie badany był poziom przepływu krwi, mierzony za pomocą laserowego obrazowania perfuzji oraz morfologiczne objawy uszkodzenia kończyn. Dodatkowo oceniano sprawność kończyny dolnej zgodnie z przyjętą skalą punktową określonych zadań behawioralnych. Doktorantka wykazała, że przepływ krwi i wyniki czynnościowe uległy poprawie u myszy leczonych WJ-MSC w porównaniu z kontrolami. Przeszczepione komórki indukują odpowiedź neowaskularną, powodując znaczny wzrost przepływu krwi w kończynach z niedokrwieniem. Wynik ten jest zgodny z wysoką ekspresją czynników proangiogennych (VEGF-A, ANGPT-1, MMP-1, FGF-1, FGF 2, HGF, PDGF-A), które Doktorantka badała w populacji podawanych komórek na poziomie ekspresji genów. Analiza histopatologiczna regenerującej tkanki wykazała obecność przeszczepianych komórek po miesiącu od przeprowadzonego zabiegu. Te wyniki uprawniają do wysnucia wniosku, że potencjał terapeutyczny WJ-MSC jest wysoki, a ich proangiogenne właściwości sprzyjają tworzeniu nowych naczyń i regeneracji tkanki.

Szeroki wachlarz zastosowanych metod zarówno w eksperymentach in vitro, jak i obrazowanie in vivo oparte na bioluminiscencji w dwóch przedstawionych do oceny pracach oryginalnych dowodzi, że Doktorantka posiada wszechstronny warsztat eksperymentatora. W przedstawionych do oceny publikacjach oryginalnych Doktorantka wykazała dojrzałość w planowaniu i wykonaniu prac badawczych oraz umiejętność wyciągania właściwych wniosków.

Trzecia przedstawiona w dysertacji praca zatytułowana "The pros and cons of Mesenchymal Stem Cell-based therapies", to praca przeglądowa, w której doktorantka przedstawia w sposób krytyczny wady i zalety terapii komórkowych z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych. Praca jest rzetelnym przeglądem istniejącej na ten temat literatury. Doktorantka słusznie podsumowuje, że pomimo bardzo zaawansowanych badań nad MSC, konieczne są długoterminowe obserwacje w celu zbadania efektów terapeutycznych MSC, a także skutków negatywnych, których nie można pominąć stosując terapie komórkowe w badaniach klinicznych.

Z pozycji recenzenta muszę jeszcze zwrócić uwagę na brak przedstawienia hipotezy całej dysertacji. Wprawdzie wypunktowane przez Doktorantkę cele badawcze jasno określają zakres prowadzonych badań, ale hipotezy która powinna być postawiona przed prezentacją wyników (a następnie wykazana jej słuszność bądź nie), recenzent może się jedynie domyślać. Dlatego zwracam się z prośbą o jasne postawienie hipotezy i jej obronę w dalszych etapach przewodu doktorskiego.

Powyższe uwagi nie zmieniają ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej dysertacji. Przedstawione badania są cennym wkładem eksperymentalnym dla określenia kompetentnej terapeutycznie populacji komórek do leczenia

02-106 Warszawa
ul. A. Pawińskiego 5
Tel.: (0-22) 668 52 50
Fax: (0-22) 668 55 32
www.imdik.pan.pl

IMDiK
POLSKA AKADEMIA NAUK

niedokrwienia kończyn dolnych i może znaleźć w przyszłości zastosowanie kliniczne.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 21 kwietnia 2017 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej przed Wysoką Radą Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum w Krakowie. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość merytoryczną i cechy wdrożeniowe pracy, wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Prof. dr hab. Leonora Bużańska

02-106 Warszawa
ul. A. Pawińskiego 5
Tel.: (0-22) 668 52 50
Fax: (0-22) 668 55 32
www.imdik.pan.pl