Recenzja

pracy doktorskiej (cykl prac opublikowanych) autorstwa mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej pt. „Detailed characteristics of stem cells isolated from Wharton's Jelly (WJ-MSCs) by the use of modern molecular genetic methods. Assessment of the regenerative potential of WJ-MSCs based on the murine model of hindlimb ischaemia (HLI)."

Z przyjemnością zapoznałem się z pracą doktorską p. mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej pt. „Szczegółowa charakterystyka komórek macierzystych izolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC) przy użyciu nowoczesnych metod genetyki molekularnej". Ta praca (osiągnięcie) oparta jest o 3 publikacje, z czego dwie (oryginalne) zostały opublikowane w ***Int J Mol Sci*** (współczynnik oddziaływania, IF>4,0) oraz jednej pracy poglądowej opublikowanej w prestiżowym piśmie branżowym, ***Cell Transplantation*** (współczynnik oddziaływania ok. 3,5). Oba pisma należą do międzynarodowych, prestiżowych tytułów z zakresu prac komórkowych, w tym zwłaszcza komórek macierzystych. Komórki mezenchymalne, pochodzące z Galarety Whartona od dawna zajmują umysły badaczy i ich warsztaty z powodu obiecujących efektów terapeutycznych w dziedzinie tzw. medycyny regeneracyjnej.

W tej dosyć spójnej pracy promocyjnej autorka zakreśliła 2 etapy swojego toku badawczego dotyczącego charakterystyki komórek mezenchymalnych pochodzących z Galarety Whartona (sznury pępowinowe) jak i ich potencjalnego wpływu na procesy pro-regeneracyjne, w niedokrwionej (podwiązanej) tętnicy kończyny dolnej, w modelu mysim. W celu pracy można zakwestionować punkt dotyczący „stworzenia modelu niedotlenienia kończyny dolnej". Otóż wydaje mi się, że takie modele już stosunkowo dawno istniały, natomiast ten obecnie przedstawiony, wydaje się być dosyć nienaturalny, albowiem zamknięcie światła naczynia jest zabiegiem sztucznym i nie posiada cech zbieżnych z rzeczywistością kliniczną, jaką jest stenoza tętnicy, powstająca najczęściej w wyniku procesu atherosklerozy. Dodatkowo przy braku udziału komponentów adaptatywnej odpowiedzi immunologicznej, która nie występuje w myszach o upośledzonej odporności (SCID), powoduje to niemożność prześledzenia konsekwencji połączenia procesu zapalnego z reakcją (swoistą) układu odpornościowego. Również mam zastrzeżenia, co do utworzonej grupy „sham". Moim zdaniem prawidłową kontrolą byłaby grupa „sham" z prawdziwą interwencją w postaci realnego podwiązania tętnicy wraz z nakłuciami interwencyjnymi (ale bez podania komórek), które w identycznym cyklu jak te doświadczalne, odpowiedziałyby na pytanie o rozwój ew. krążenia obocznego, indukowanego samymi nakłuciami. Ogólnie też ujmując zakres informacyjno/obserwacyjny z 21 dni po interwencji nie jest on wystarczający dla oceny procesów pro-regeneracyjnych – mamy tu do

czynienia raczej z niedotlenieniem ostrym, a 3 podania komórkowe w odstępach tygodniowych również budzą pewne wątpliwości, albowiem winny być porównane z efektem (na przykład) tylko jednej interwencji komórkowej, co pozwoliłoby wyodrębnić kinetykę pozytywnego efektu terapeutycznego, bądź jego trwałość. W przedstawionym schemacie monitorowany okres jest krótki! To jest zresztą zarzut wobec całego przedstawionego modelu. Generalnie interesują nas bardziej przewlekłe stany niedotlenienia i efektywne terapie wobec nich. Ostra stenoza naczyniowa może być eradykowana obecnie dostępnymi środkami z włączeniem stentów, bądź przeszczepów naczyniowych.

W pierwszym opublikowanym doniesieniu dowiadujemy się charakterystyki molekularno-biologicznej dot. izolowanych komórek z Galarety Whartona, które możemy z powodzeniem nazwać mezenchymalnymi. W odróżnieniu od komórek pluripotentnych – naturalnych lub indukowanych – nie obserwowano w nich ekspresji 4 podstawowych genów odpowiedzialnych za utrzymywanie stanu pluripotencji (***OCT3/4, SOX2, KLF4, cMYC***) a jedynie podwyższonej ekspresji genu ***OCT3/4*** i towrzyszącemu mu genu ***NANOG***, odpowiadającemu za utrzymywanie stanu niezróżnicowania komórkowego i tzw. odnowy własnej. Zaobserwowano, że ekspresja genów ***OCT3/4*** i ***NANOG*** wzrasta w warunkach hipoksji. W wynikach tej pracy sugeruje się na Ryc. 1A-C porównanie morfologii tych komórek ze stanem hodowli w normoksji, ale w sumie na rzeczonej rycinie obserwuje się jedynie dokumentację z warunków normoksyjnych (A-C). Uważam też za schizofreniczne uwagi na stronie wynikowej tej pracy, że obserwujemy podobne profile transkryptomowe w uzyskiwanych liniach komórkowych z WJ-MSC. Tutaj, widać „jak na dłoni" raczej heterogenność transkryptomową podobnych linii WJ-MSC 1,2 wobec linii komórkowej WJ-MSC 3 – i dziwiłbym się gdyby było inaczej. Spośród badanych markerów pluripotentności, w zasadzie odnosimy wrażenie, że opisywane komórki ulegają ekspresji jedynie w stosunku do antygenu SSEA-4, w opozycji do innych (w tym TRA-1-60 czy SSEA-1) – te ostatnie są charakterystyczne dla komórek pluripotentnych. W odróżnieniu od charakterystyki markerowej nie wykonano analizy funkcjonalnej dla żadnej z przedstawionycyh nam 3 linii WJ-MSC, tak więc nadal nie wiemy czym się one różniły w aspekcie funkcjonalnym wobec piętna molekularnego. Interesującym zjawiskiem opisywanym w tej publikacji jest dłuższy sygnał luminescencyjny uzyskiwany z komórek w warunkach hipoksyjnych (lepsze przeżycie lub pre-selekcja?), natomiast stosunkowo szybko rozpraszały się komórki iPS (lub raczej sygnał z nich pochodzący), a nastepnie obserwowano wtórny wzrost tego sygnału. Nie znalazło to należytego miejsca w późniejszej dyskusji.

W drugiej pracy oryginalnej oceniony zostal potencjał regeneracyjny zastosowanych komórek, izolowanych z Galarety Whartona (moim zdaniem udowodniono

jedynie reperfuzję naczynia). W tym celu oznaczono potencjał pro-angiogenny zastosowanych komórek mezenchymalnych, jednocześnie wprowadzono lucyferazowy reporter molekularny dla obrazowania komórek i wymiareczkowano poziom sygnału luminescencyjnego. Tutaj, dla podniesienia wartości pracy, brakuje nam indywidualnego obrazowania komórkowego możliwego np. w PET i uwidocznienia transformacji komórek mezenchymalnych, albowiem ich wpływ na mięśniówkę gładką w tak przeprowadzanych doświadczeniach jest iluzoryczny (nieudowodniony). Potencjał pro-angiogenny winien też być moim zdaniem oceniony in vitro poprzez interakcję WH-MSC z komórkami HUVEC. Jednak tego wyraźnie brakuje a oznczanie wydzielania pro-angiogennych czynników parakrynowych uchodzi jakiejkolwiek korelacji. Schemat doświadczenia podany na rycinie 3A należy uznać za nieczytelny. W tekście (dział Wyniki) autorka wskazuje ucieczkę sygnału lumienscencyjnego na dzień 14-ty, jednak z ryciny 4H wynika, że utrzymuje się on co najmniej do dnia 21-szego. Z tej ryciny też wynika, że w dniu 21-szym różnica w natężeniu sygnału (pomimo istotności statystycznej) w stosunku do interwencji z roztworem PBS jest raczej mała. Nie jest dyskutowany fakt wytworzenia naturalnego krążenia obocznego i/lub samoczynna reperfuzja (pod rycinami nie ma liczebności badanych zwierząt – zwłaszcza dotyczy to ryciny 4). Nie jestem też usatysfakcjonowany legendą i zawartością ryciny 5 – jeśli mówimy o jakimkolwiek nacieku proliferujących komórek – to w zasadzie jakich komórek to dotyczy? I czy są one reprezentatywne w tym akurat immunokompromisowanym modelu myszy SCID?

Do zgłoszonej w osiągnięciu pracy poglądowej nie mam w zasadzie żadnych uwag. Reasumując, ocena przedstawionego osiągnięcia jest pozytywna, pomimo zgłoszonych krytycznych uwag, które mają na celu wykazanie prawdziwego sensu biologicznego obserwowanych zmian. Publikacje składające się na cykl są dobrze opublikowane, pomimo wskazanych braków. Całość osiagnięcia zasługuje na stopień promocyjny doktora i spełnia wszystkie obwiązujące w tym zakresie wymogi, dlatego też przedkładam swoją ogólnie pozytywną opinię i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego -Collegium Medicum o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego, p. mgr Aleksandry Musiał-Wysockiej.

Poznań, dnia 5.03. 2020

Maciej Kurpisz