UNIWERSYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO
W BYDGOSZCZY

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

Katedra Biochemii i Biologii Komórki
ul. Ks. Józefa Poniatowskiego 12, 85-671 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dn. 3 marca 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Renaty Szydlak p.t. **"Ocena właściwości biomechanicznych i potencjału migracyjnego komórek macierzystych wyizolowanych z Galarety Whartona"** wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Laidlera

1. Główne założenia rozprawy

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) to wielce obiecujący materiał biologiczny znajdujący zastosowanie jako produkt leczniczy zaawansowanej terapii wielu chorób, w tym chorób sercowo-naczyniowych. Bogatym źródłem MSC jest galareta Whortona, substancja obecna w sznurze pępowinowym. Podane do naczyń krwionośnych biorcy, MSC są rozprowadzane po całym organizmie, a po dotarciu do chorobowo zmienionej tkanki mają szanse ją zasiedlić i rozpocząć proces regeneracji. Z tego względu adhezja, migracja przez śródbłonek naczyń i inwazja to procesy kluczowe dla skuteczności terapii komórkami macierzystymi. Ruchliwość komórek mezenchymalnych zależy od dynamiki cytoszkieletu aktynowego, który w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe prowadzi do wysuwania krawędzi wiodącej i retrakcji tylnej części komórki. Cytoszkielet aktynowy oraz filamenty pośrednie determinują właściwości biomechaniczne komórek, takie jak elastyczność i podatność na deformację. Jednakże parametry biofizyczne tych procesów nie są jeszcze dobrze scharakteryzowane. Sporą trudność w pracach nad MSC stanowi fakt, że komórki te nie jest łatwo odróżnić od fibroblastów, gdyż oba rodzaje komórek charakteryzują się podobnym wzorem ekspresji markerów powierzchniowych oraz wykorzystują ten sam typ ruchliwości komórkowej. Pełne scharakteryzowanie komórek MSC i poszukiwanie swoistych markerów są zatem wyzwaniami dla współczesnej nauki prowadzącymi do doskonalenia metod zaawansowanych terapii wykorzystujących komórki macierzyste.

Rozprawa doktorska Pani mgr Renaty Szydlak doskonale wpisuje się w ten ważny trend badań. Badania zostały przeprowadzone w ramach programu Strategmed

finansowanego przez NCBiR, o akronimie CIRCULATE. Główne cele ocenianej rozprawy doktorskiej to:

1) Scharakteryzowanie właściwości biomechanicznych komórek MSC wyizolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC).
2) Zbadanie zdolności komórek do migracji transendotelialnej i inwazji w odpowiedzi na różne cytokiny prozapalne oraz skorelowanie tych zdolności z elastycznością komórek.
3) Przeanalizowanie udziału niektórych cząsteczek adhezyjnych w procesie migracji i inwazji.
4) Analiza wpływu prekondycjonowania komórek za pomocą cytokin na ich zdolność do migracji i inwazji.
5) Sprawdzenie, czy odkształcalność komórkowa może służyć jako marker komórek macierzystych odróżniający je od fibroblastów.

Tak sformułowane cele umożliwiły scharakteryzowanie WJ-MSC pod kątem właściwości biofizycznych i molekularnych oraz ich porównanie z właściwościami fibroblastów i komórek macierzystych pochodzących z innych tkanek.

2. Zastosowane podejście eksperymentalne i otrzymane wyniki

Do realizacji postawionych zadań Doktorantka wykorzystała hodowle komórkowe połączone z analizą powierzchni i morfologii komórek z użyciem technik mikroskopii fluorescencyjnej, testy zdolności komórek do migracji i inwazji oraz mikroskopię sił atomowych (AFM), która pozwoliła na wyznaczenie modułu Younga, parametru będącego miarą podatności komórek na deformację. Materiałem użytym do badań były komórki macierzyste wyizolowane z ludzkich tkanek: sznurów pępowinowych oraz tkanki tłuszczowej i szpiku kostnego. Fibroblasty wyizolowano z ludzkiej skóry. Wszystkie procedury przeprowadzono z zachowaniem zasad bioetycznych, po uzyskaniu zezwoleń Komisji Bioetycznej UJ.

Pierwszym etapem badań było scharakteryzowanie zmian właściwości biomechanicznych i morfologii WJ-MSC zachodzących podczas pasażowania hodowli komórkowych. Pomiarów dokonano dla komórek pochodzących od 10 dawców, na czterech etapach hodowli począwszy od pasażu P4 aż po pasaż P7. Wyniki pozwoliły na wykazanie korelacji pomiędzy strukturą cytoszkieletu aktynowego i podatnością komórek na deformację. Wartości modułu Younga otrzymane metodą AFM dla komórek na różnych etapach hodowli Doktorantka poddała analizie statystycznej (rozkład badanej zmiennej i współczynnik korelacji wewnątrzklasowych), co umożliwiło ocenę heterogeniczności komórek

pochodzących od różnych dawców. Taka analiza pozwala na wyznaczenie wartości granicznych modułu Younga, co jest szczególnie ważne dla przyszłych terapeutycznych zastosowań WJ-MSC. Zmiany wielkości i kształtu komórek oraz organizacji filamentów powstające na skutek pasażowania zostały prześledzone dzięki fluorescencyjnemu wyznakowaniu filamentów aktynowych. W mojej ocenie połączenie pomiarów elastyczności komórek z ich morfologią jest bardzo dobrym podejściem do badań nad właściwościami migracyjnymi komórek.

W kolejnym etapie badań Doktorantka sprawdziła, czy wybrane cytokiny prozapalne wydzielane przez uszkodzony niedokrwiennie mięsień sercowy promują migrację komórek. Przebadała również udział wybranych cząsteczek adhezyjnych w procesie migracji. Migrację transendotelialną zbadała używając komory Boydena z membraną, którą pokrywała monowarstwą komórek śródbłonka ludzkiej aorty (HAEC). Do badań nad zdolnościami inwazyjnymi zastosowała standardowy test w komorach z *Matrigel*. Dzięki tym testom, popartym rygorystycznymi analizami statystycznymi, Pani Szydlak stwierdziła, że komórki WJ-MSC są indukowane przez cytokiny prozapalne oraz wykryła znacząco większy wpływ TNF-α i IL-1β na indukcję migracji transendotelialnej i inwazyjności niż IL-6 i IFN-γ. Stosując przeciwciała skierowane przeciwko białkom adhezyjnym – H-CAM, integrynie α4β1 i integrynie α5β1, Doktorantka wykazała ich udział w procesach migracji i inwazji stymulowanych przez cytokiny. Dzięki powyższym doświadczeniom Pani Szydlak nie tylko zdobyła ważne informacje na temat czynników, które umożliwiają komórkom WJ-MSC migrację i inwazję, lecz również pozyskała frakcję komórek posiadających zwiększone zdolności migracyjne.

W dalszych badaniach okazało się, że w porównaniu z całą populacją, wyselekcjonowane mobilne komórki WJ-MSC charakteryzują się znacznie większą elastycznością i mniejszą powierzchnią. Ponadto, Autorka wykazała, że komórki poddane krótkotrwałemu wstępnemu działaniu wybranych cytokin wykazują zwiększoną aktywność migracyjną, są mniejsze i bardziej podatne na deformację. Moim zdaniem analiza wpływu prekondycjonowania komórek macierzystych na ich potencjał migracyjny jest szczególnie ważnym etapem badań. Uzyskanie pozytywnych wyników daje szanse na zwiększenie skuteczności zasiedlania chorej tkanki.

Ostatni cel pracy Doktorantka zrealizowała poprzez porównanie komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł i fibroblastów, pod kątem ich morfologii i elastyczności. Wykazała, że w porównaniu ze wszystkimi badanymi komórkami macierzystymi, fibroblasty są mniej elastyczne, większe i cechują się bardziej rozwiniętą siecią mikrofilamentów i filamentów pośrednich. Ze względu na fakt, że do tej pory nie

znaleziono markera swoistego dla każdego typu komórek, odkrycie to dostarcza nowych narzędzia do ich odróżniania.

3. Struktura pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Renaty Szydlak została przedstawiona w klasycznej formie monografii liczącej 142 strony. Jest ona podzielona na rozdziały zawierające: teoretyczny wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki oraz ich dyskusję. Za bardzo udany zabieg w opisie wyników uważam opatrzenie każdego rozdziału krótkim wstępem, w którym Autorka krótko uzasadnia podjęcie opisywanych badań, i zakończenie rozdziału podsumowaniem. Nadaje to pracy bardzo klarowną formę. Na początku rozprawy umieszczone zostały streszczenia w j. polskim i angielskim. Po spisie treści Pani Szydlak załączyła alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów wraz z ich wyjaśnieniami. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że nie wszystkie użyte skróty znalazły się w tym miejscu. Zabrakło na przykład wyjaśnienia skrótów takich jak: ECM, ICC, IFN, H-CAM. Niektóre z nich wydają się oczywiste, stąd może umknęły uwadze Autorki, ale konsekwentne ich umieszczenie w alfabetycznym wykazie, nadałoby rozprawie większą redakcyjną spójność. Pokaźny spis literatury mieści się na końcu opracowania i liczy 219 pozycji. Format cytowań jest prawidłowy i konsekwentnie stosowany. W pracy umieszczono 39 rysunków i 10 tabel, których spis znajduje się na końcu pracy. Ponadto, na końcu pracy Autorka zamieściła dwa załączniki. Załącznik 1 zawiera szczegółowe wartości modułu Younga uzyskane z pomiarów komórek pozyskanych od 10 donorów. W załączniku 2 podała wartości ekspresji markerów powierzchniowych WJ-MSC, wyznaczone w ramach projektu CIRCULATE. W układzie pracy nie dostrzegam formalnych uchybień, jest on typowy dla tego rodzaju opracowań.

Liczący 22 strony „Wstęp" jest interesującym wprowadzeniem do badań. Na początku rozdziału Autorka wprowadza problem i przedstawia plan rozprawy. W dalszej jego części opisuje źródła pochodzenia komórek macierzystych, problemy z identyfikacją tych komórek, zastosowania i mechanizmy terapeutycznego działania. Z uwagi na fakt, że mikroskopia sił atomowych jest główną metodą badawczą użytą w pacy, we „Wstępie" Autorka w przejrzysty i zrozumiały sposób opisała teoretyczne podstawy pomiarów elastyczności komórek. Pewne uwagi mam jedynie do treści podrozdziału 1.6, w którym zostały opisane molekularne mechanizmy migracji komórkowej. Nie mogę się zgodzić ze sformułowaniem, że w komórkach aktyna występuje jako „...liniowy łańcuch (F-aktyna)...", bowiem filamentowa aktyna ma strukturę prawoskrętnej dwułańcuchowej helisy. Nie jest też prawdą, że „W większości komórek eukariotycznych włókna aktynowe są rozlokowane w warstwie leżącej pod błoną komórkową". Filamentowa aktyna jest rozlokowana w całej komórce, natomiast w

różnych przedziałach komórkowych, z udziałem licznych białek wiążących aktynę, jest w odmienny sposób zorganizowana. Pani Szydlak nie rozróżniła dwóch modeli migracji – migracji mezenchymalnej i ameboidalnej oraz możliwości przejścia pomiędzy tymi dwoma typami migracji, co wydaje mi się ważne dla opisywanego mechanizmu transmigracji przez warstwę śródbłonka. W migracji mezenchymalnej komórki wysuwają lamelipodia, w których filamenty aktynowe są rozgałęzione, oraz wąskie filopodia wypełnione równolegle ułożonymi filamentami. Prawdą jest, że jak pisze Autorka, ruch komórki jest napędzany przez wydłużanie końców filamentów skierowanych w stronę krawędzi wiodącej lamelipodium, ale stwierdzenie, że „Równolegle z tworzeniem nowych włókien aktynowych następuje także ich depolimeryzacja na końcu komórki" jest uproszczeniem, gdyż w ruchliwości typu mezenchymalnego depolimeryzacja następuje na końcu lamelipodium, a nie na końcu komórki. Z kolei w migracji ameboidalnej skurcz aktomiozyny znajdującej się w korowej części cytoszkieletu podbłonowego wywołuje napięcie, które prowadzi do tworzenia wypełnionych cytoplazmą wypustek błonowych w formie pęcherzyków (ang. *blebs*), o których Doktorantka wspomina pisząc o transmigracji MSC. We „Wstępie" zabrakło mi również informacji na temat filamentów pośrednich i ich udziału w ruchliwości komórkowej. Ponieważ w podrozdziale 4.5.4 Pani Szydlak opisała organizację nie tylko filamentów aktynowych, lecz również wimentyny, wydaje mi się, że wzmianka na temat udziału wimentyny w ruchliwości komórkowej byłaby na miejscu.

W rozdziale „Cel Pracy" Autorka w jasny sposób sformułowała główny cel rozprawy oraz cele szczegółowe. Zastanawiam się jedynie, czy przystępując do badań Pani Szydlak stawiała hipotezy badawcze i czy otrzymane wyniki były zgodne z jej oczekiwaniami.

Stosowane procedury zostały opisane w sposób przejrzysty i wyczerpujący, a ich opis dobrze koresponduje z opisem wyników. Kolejność omawiania wyników jest logiczna, wykonanie poszczególnych etapów jest uzasadnione, a otrzymane dane są dobrze opisane, ujęte w tabele i zilustrowane rysunkami zawierającymi wykresy i zdjęcia spod mikroskopu fluorescencyjnego.

W „Dyskusji" Autorka w zwarty sposób omawia otrzymane wyniki i krytycznie się do nich odnosi. Szczególnie cenne są próby wyjaśnienia w oparciu o dane literaturowe tych wyników, które nie były zgodne z oczekiwaniami. Na przykład, brak zmian w organizacji cytoszkieletu aktynowego pomimo znacznego spadku wartości modułu Younga komórek poddanych prekondycjonowaniu Doktorantka tłumaczy możliwością reakcji komórek na obciążenie w nanoskali, jaką jest nacisk wywołany przez ostrze mikroskopowe (str. 107-108). Zabrakło mi jedynie omówienia różnic w wartościach modułu Younga otrzymanych na dwóch poziomach indentancji. Które elementy cytoszkieletu zdaniem Doktorantki wpływają

na elastyczność badaną na tych poziomach? Czy metodyka badań mogła mieć wpływ na otrzymane wyniki?

Praca jest napisana poprawnym naukowym językiem, chociaż w kilku miejscach zarówno styl, interpunkcja, jak również terminologia wymknęły się poprawkom edytorskim. Na przykład, na stronie 102 w ostatnim akapicie Autorka użyła sformułowania „cytoszkielet komórkowy", zamiast po prostu „cytoszkielet", a na stronie 106 zastosowała termin „lamelipodium przednie", chociaż nie ma tylnego. Podając wartości liczbowe, dla oddzielenia liczby całkowitej od dziesiętnej Autorka generalnie stosuje kropkę zamiast obowiązującego w języku polskim przecinka. Wyjątkiem są liczby podane na stronie 57 i w podpisach pod rysunkami. Na stronach 72 i 108 pojawiły się odnośniki do nieistniejących rozdziałów 5.2 i 5.5. Tego typu pomyłki nie są jednak liczne i nie mają wpływu na mój pozytywny odbiór pracy.

4. Podsumowanie

Przedłożona do oceny rozprawa jest interesującym studium powiązań pomiędzy zdolnościami migracyjnymi, zmianami w strukturze cytoszkieletu aktynowego i elastycznością komórek wyizolowanych z galarety Whartona. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia eksperymentów z użyciem nowoczesnych technik, w tym zaawansowanej technologicznie mikroskopii sił atomowych. Zwraca uwagę systematyczne i skrupulatne podejście do analizy właściwości komórek, co wobec potencjalnych zastosowań terapeutycznych komórek wyizolowanych z galarety Whartona jest szczególnie ważne. Wyniki przedstawione w rozprawie zostały już częściowo opublikowane, w *International Journal of Molecular Sciences*, piśmie o dobrym współczynniku oddziaływania, a zatem zyskały aprobatę międzynarodowego środowiska naukowego.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Renaty Szydlak spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz.1789) i wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

JMoraczewska

prof. dr hab. Joanna Moraczewska