

Łódź, 15.10.2018

Dr hab. n.med. Mariola Świderek-Matysiak

Katedra i Klinika Neurologii

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

**Recenzja w przewodzie doktorskim Ewy Kruminis-Kaszkiel pt.: "Galareta Whartona –
źródło mezenchymalnych komórek macierzystych do różnicowania w kierunku
nerwowych komórek macierzystych (NSC)."**

Pod kierunkiem dr hab.n.med. Joanny Wojtkiewicz

Odkrycie mezenchymalnych komórek macierzystych wraz z ich potencjałem różnicowania m.in. w kierunku neuralnym dało ogromne nadzieje chorym, zwłaszcza tym cierpiącym na dotąd nieuleczalne degeneracyjne i metaboliczne choroby układu nerwowego. Wiele lat prac nad zastosowaniem tych komórek, w praktyce nie przyniosło jednoznacznych odpowiedzi co do skuteczności terapeutycznej, brakuje również bezpiecznych, efektywnych i w pełni powtarzalnych metod izolacji komórek i ich różnicowania. Komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona w wielu publikacjach mają dobre parametry proliferacji, stabilności fenotypowej w hodowli, niskiej immunogenności, z tego powodu uważane są za obiecujące źródło mezenchymalnych komórek macierzystych dla terapii komórkowej allogeniczej. Ma to duże znaczenie, gdyż komórki pozyskiwane z tkanek pacjenta m.in. szpiku kostnego w części opublikowanych doniesień w tym np. w stwardnieniu rozsianym czy stwardnieniu zanikowym bocznym charakteryzują się gorszym potencjałem proliferacyjnym i mniej korzystnym profilem immunoregulacyjnym i troficznym.

Przedstawiona rozprawa doktorska rozpoczyna się od spisu treści i wykazu skrótów zastosowanych w rozprawie, po których następuje typowy układ pracy obejmujący wstęp, cele, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo. Praca liczy 101 stron; obejmuje 21 rycin i 17 tabel oraz 147 pozycji piśmiennictwa. Praca nie budzi większych zastrzeżeń pod względem językowym, autorka nie ustrzegła się drobnych błędów ortograficznych, gramatycznych i interpunkcyjnych, które jednak nie mają wpływu na rozumienie i przejrzystość formy pracy.

Wstęp do pracy liczy 19 stron, na których autorka w sposób wyczerpujący charakteryzuje mezenchymalne komórki macierzyste, w szczególności te izolowane z galarety Whartona. Duży podrozdział poświęcony jest metodom różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku neuralnych komórek macierzystych, autorka opisuje metodę pośrednią i bezpośrednią, wskazując na zalety tej drugiej, tym samym uzasadniając wybór tej metody w badaniach przeprowadzonych przez doktorantkę. Zamieszczone we wstępie ryciny dobrze ilustrują przedstawiane zagadnienia, a tabela nr 1 opisująca przykładowe markery neuralnych komórek macierzystych i neuralnych komórek progenitorowych w sposób systematyczny charakteryzuje fenotyp tych komórek. Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów, rzadko zamiennie nazywając neuralne komórki macierzyste – nerwowymi komórkami macierzystymi (str 27, 29), czy zbyt odważnie opiniując, że komórki pochodzenia płodowego są: *”... bardziej bezpiecznym i skutecznym narzędziem medycyny regeneracyjnej w stosunku do MSC pochodzących z tkanek dorosłych”*, jest to zbyt duże uproszczenie (str. 21).

Hipoteza i cele pracy zostały sformułowane w celu głównym i trzech celach pośrednich. Celem głównym pracy było opracowanie wydajnej, praktycznej i powtarzalnej bezpośredniej metody różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z galarety Whartona w kierunku komórek neuralnych w jednowarstwowej hodowli przylegającej. Cele pośrednie obejmowały charakterystykę potencjału neurogenicznego mezenchymalnych komórek macierzystych poprzez ocenę ekspresji markerów różnicowania neuralnego na poziomie białka i mRNA w komórkach nieróżnicowanych i wyróżnicowanych.

Metodologia pracy została przedstawiona bardzo rzetelnie, w przejrzysty sposób, co nie budzi wątpliwości co do bezpośredniego zaangażowania autorki w planowanie i wykonanie eksperymentów badawczych. Narzędzia badawcze zostały dobrane i zastosowane prawidłowo. Analizowano 10 hodowli ludzkich komórek macierzystych ze sznurów pępowinowych techniką eksplantów tkankowych, komórki fenotypowano przy pomocy cytometrii przepływowej. Hodowlę różnicującą w kierunku komórek neuralnych prowadzono w jednowarstwowej hodowli przylegającej suplementując bFGF, EGF, B27. Komórki charakteryzowano przy pomocy cytometrii przepływowej, immunocytochemii i badając ekspresję wybranych genów reakcją PCR w czasie rzeczywistym.

Wyniki przedstawiono na 21 stronach, w 5 podrozdziałach, w formie opisowej oraz w 3 tabelach i 16 rycinach. W rozdziale 5 podsumowano wyniki i wnioski, wskazując, że komórki

macierzyste izolowane ze sznura pępowinowego techniką eksplantów tkankowych odpowiadają fenotypowi mezenchymalnych komórek macierzystych na poziomie ekspresji białek i mRNA. Komórki charakteryzowały się dużym potencjałem proliferacyjnym, natomiast ekspresja nestyny i słaba ekspresja SOX2 wskazuje na ich wysoki potencjał neurogeny. Do pełnej charakterystyki wyizolowanych komórek zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ISCT) brakuje oceny potencjału różnicowania w kierunku osteoblastów, chondroblastów i adipocytów. Otrzymane w pierwszym etapie komórki poddano hodowli różnicującej jednowarstwowej uzyskując populację neuralnych komórek macierzystych z wysoką ekspresją genów nestyny, MAP2 i Ki67 oraz neuralnych komórek progenitorowych (SOX1⁺nestyna⁺). Równocześnie niska ekspresja na poziomie białka S100β oraz niska koekspresja GFAP i S100β wskazują, że komórki te nie mają fenotypu dojrzałych astrocytów. Uzyskane przez autorkę wyniki potwierdzają, że zastosowana metoda jednowarstwowej hodowli różnicującej umożliwia uzyskanie homogennej populacji komórek o fenotypie neuralnych komórek macierzystych i progenitorowych. Udowodnienie wyższości zastosowanej metody nad różnicowaniem pośrednim w eksperymentach porównawczych byłoby cennym uzupełnieniem pracy,

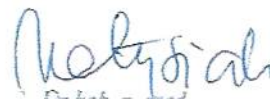
W dwunastostronicowej dyskusji autorka omówiła uzyskane wyniki odnosząc się do wybranych i adekwatnych pozycji piśmiennictwa. Autorka dobrze oceniła rozbieżności lub niejednoznaczne wyniki przeprowadzonych eksperymentów, wybrane w dyskusji doniesienia innych autorów wskazują, że autorka biele porusza się w piśmiennictwie dotyczącym szerokiego zagadnienia neuralnego potencjału mezenchymalnych komórek macierzystych.

Przedstawione wnioski odpowiadają celom pracy, są istotne dla rozwoju nauk podstawowych i mają praktyczne kliniczne implikacje. Autorka dowiodła, że stosowana metoda pozwala uzyskać homogenną populację neuralnych komórek macierzystych, równocześnie doktorantka widzi i wskazuje niezbędny kierunek dalszych badań tj. oceny zdolności różnicowania w kierunku oligodendrocytów, neuronów i astrocytów i badań czynnościowych.

Rozprawa doktorska Pani Ewy Kruminis-Kaszkiel jest wartościową pozycją na drodze do praktycznego zastosowania neuralnych komórek macierzystych w terapii komórkowej.

Po dokładnej analizie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej Pani Ewy Kruminis-Kaszkiel stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom na

stopień doktora. W związku z powyższym zgłaszam do Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosek o dopuszczenie Pani Ewy Kruminis-Kaszkiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. n. med.
Mariola Świderek-Matusiak
specjalista neurolog
1570456