

Katowice 22.10.2020

**Prof. dr hab. n. med. i n.o zdrowiu Halina Jędrzejowska-Szypułka**

**Katedra i Zakład Fizjologii**

**Wydział Lekarski w Katowicach**

**Śląski Uniwersytet Medyczny**

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Pilny pt. „Właściwości proangiogenne mezenchymalnych komórek zrębu izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej (ADSC)”**

Angiogeneza jest zagadnieniem od wielu lat bardzo szeroko badanym w medycynie. Z jednej strony badane są wszelkie możliwości przeciwdziałania angiogenezie jak chociażby w chorobie nowotworowej gdzie hamowanie rozwoju naczyń krwionośnych pozwala na ograniczenie rozwoju guza i możliwości tworzenia przerzutów, a z drugiej strony prowadzi się bardzo wiele badań nad możliwością pobudzania angiogenezy jak chociażby w chorobach niedokrwienych. Jednym z większych problemów współczesnej medycyny są choroby cywilizacyjne takie jak miażdżycy czy cukrzyca, które powodują niszczenie naczyń krwionośnych co w konsekwencji doprowadza do niedokrwienia tkanek i całych narządów. Walka z chorobami cywilizacyjnymi takimi jak otyłość, która w konsekwencji doprowadza do miażdżycy i cukrzycy jest najważniejszym wyzwaniem współczesnej medycyny. Dlatego też każda praca, która pozwala rozwiązywać lub przybliżyć zrozumienie mechanizmów, które mogą być wykorzystane do walki ze skutkami takich chorób są niezmiernie cenne.

Jednym z takich zespołów jest krytyczne niedokrwienie kończyn (CLI). Jest to zaawansowana forma choroby naczyń obwodowych (PAD, peripheral artery disease), wynikająca z progresji miażdżycy co prowadzi do stopniowej redukcji napływu krwi do kończyny oraz zamykania światła tętnic doprowadzających krew do tkanek kończyn dolnych. Dominującym objawem krytycznego niedokrwienia tkanek (CLI) jest silny ból niedokrwionej kończyny, który budzi chorego w nocy i zmusza do wstania lub chodzenia, a także niewyczuwalne tętno na nodze, ochłodzenie kończyny, zaniki mięśniowe, zmiany troficzne pod postacią przebarwień i owrzodzeń. W przeważającej mierze (około 80%) są to pacjenci z cukrzycą, a więc również z

wielopoziomowymi zmianami miażdżycowymi we wszystkich naczyniach, często po zabiegach pomostowania aortalno-wieńcowego, z niewydolnością nerek, niewydolnością serca i po udarach.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt. **„Właściwości proangiogenne mezenchymalnych komórek zrębu izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej (ADSC)”** mgr inż. **Eweliny Pilny** powstała w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowym Instytucie Badawczym oddziale Gliwicki w ramach grantu NCN. Jest to ośrodek, który ma duże doświadczenie w prowadzeniu badań nad angiogenezą i bardzo cieszy fakt, że swoje ogromne doświadczenie wykorzystuje do badania innych chorób poza nowotworowymi. W medycynie również od wielu lat próbuje się wykorzystać duży potencjał komórek macierzystych, niestety badania kliniczne nie dają na razie zadawalających rezultatów. Do tej pory w Europie zostały dopuszczone dwie terapie wykorzystujące komórki macierzyste jako w pełni bezpieczny i skuteczny sposób leczenia. Nie mniej jednak badania naukowe na zwierzętach pokazują, że istnieje ogromny potencjał regeneracyjny tych komórek i dlatego coraz więcej badań klinicznych podejmuje te właśnie zagadnienia.

Przedstawiona mi do recenzji praca mgr inż. Eweliny Pilny skonstruowana jest w sposób typowy dla tego rodzaju opracowań i składa się z następujących części: wstępu, założeń i celu pracy, materiału i metodyki, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia oraz piśmiennictwa liczącego 206 pozycji, a także wykazu skrótów zastosowanych w pracy, oraz dorobku naukowego Doktorantki, który muszę przyznać jest imponujący oraz wykaz nagród, stypendiów i grantów które były jej udziałem.

Praca rozpoczyna się od przedstawienia celów pracy co nie uważam za właściwe. Myślę, że lepiej byłoby gdyby cel został zamieszczony po wstępie i zawierał również informacje na temat etapów w jakich te cele będą realizowane. Te informacje zostały zamieszczone dopiero na początku opisu wyników. Taka konstrukcja ułatwiłaby czytanie metodyki i ocenienie czy przyjęte metody są właściwe do osiągnięcia zamierzonych celów pracy. Jednak cele uważam za jasne i prawidłowo postawione.

Wstęp pracy liczy 19 stron w którym opisuje Doktorantka co to jest krytyczne niedokrwienie kończyn, mechanizm powstawania naczyń krwionośnych, badania kliniczne z zastosowaniem angiogenezy terapeutycznej. Opisuje również komórki mezenchymalne zrębu, tłumaczy problemy nazewnictwa, sposoby ich pozyskiwania oraz ich właściwości i wszechstronne

możliwości. Bardzo dobry jest rozdział tłumaczący problemy z nazewnictwem tych komórek, które są dużym problemem i często utrudniają interpretację wyników różnych prac. Wstęp zawiera bardzo dobre ryciny, które ułatwiają czytanie i zrozumienie tekstu.

W rozdziale „Materiał i metody” zostały w wyczerpujący sposób opisane wszystkie stosowane metody i odczynniki. Jednak do tego rozdziału mam najwięcej zastrzeżeń. Najpoważniejszym błędem jest zupełny brak opisu doświadczenia na zwierzętach. Nie wiemy ile zwierząt uczestniczyło w tym badaniu, ile było grup badawczych oraz jaki był okres obserwacji. Dowiadujemy się tego dopiero z opisu wyników, ale i tam nie jesteśmy w stanie powiedzieć czy obserwacje były prowadzone w 7, 14, 21 dniu ponieważ niektóre obserwacje kończą się 14 dnia np. skuteczność podwiązania kończyny, ale już naprawa mięśnia obserwowana jest także w 21 dniu, a napływanie makrofagów również w dniu 3. To powoduje, że bardzo trudno jest ocenić i porównać wyniki przeprowadzonych doświadczeń. Z mojego punktu widzenia uważam również, że niepotrzebnie zostały wprowadzone niektóre grupy kontrolne np. z myszami z niedoborem odporności NOD/SCID. W tym wypadku ta grupa kontrolna wręcz zaciemniła obraz ponieważ zwierzęta te poza dysfunkcyjnymi makrofagami pozbawione są limfocytów T, B, a także komórek NK (Natural killer) więc do końca nie wiemy czy obserwowane efekty są spowodowane dysfunkcyjnymi makrofagów czy też dysfunkcją innych komórek. Jestem też ciekawa czy komórki mezenchymalne hodowane in vivo były stymulowane do wydzielania IL-6 czy nie? Cytokina ta jest najczęściej wydzielana wtedy gdy komórki są stymulowane przez określone bodźce lub określoną sytuację środowiska w którym się znajdują.

W rozdziale tym mamy również trochę „skrótów myślowych” i żargonowych sformułowań takich jak „wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem mMSC wykonane były między drugim, a piątym pasażem” w pracy doktorskiej powinno się unikać takich sformułowań.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka opisała uzyskane wyniki wspomagając się 36 rysunkami i zdjęciami z pod mikroskopu. Przedstawiona dokumentacja uzyskanych wyników jest rzetelna i nie budzi moich zastrzeżeń, czyta się je dobrze, schematy i rysunki są przejrzyste i łatwe do analizy.

Dyskusja zawarta jest na 11 stronach. Uzyskane wyniki, konfrontowane są z bogatym piśmiennictwem. Doktorantka pokazała, że ludzkie mezenchymalne komórki zrębu pochodzące z tkanki tłuszczowej posiadają cechy komórek mezenchymalnych i są dobrze tolerowane przez organizm myszy ponieważ są obecne w miejscu podania do 14 dni.

Pokazano, że odpowiadają one za napływanie makrofagów proangiogennych M2 w niedokrwione miejsca i biorą udział w naprawie uszkodzonych tkanek oraz tworzeniu nowych naczyń krwionośnych zarówno włosowatych jak i tętniczych. Pokazano również, że IL-6 wydzielana przez, ludzkie mezenchymalne komórki zrębu pochodzące z tkanki tłuszczowej (hADSC) odgrywa istotną rolę w aktywowaniu proangiogenych i przeciwzapalnych makrofagów M2. Doktorantka stwierdziła również, że nie można za pomocą deferoksaminy zwiększyć wydzielania IL-6 z ludzkich komórek mezenchymalnych zrębu pochodzących z tkanki tłuszczowej. Bardzo cenne jest również to, że Doktorantka przedstawia możliwy mechanizm naprawy uszkodzonych tkanek i przebiegu angiogenezy. Brakuje mi we wnioskach podkreślenia co jest najistotniejszego i innowacyjnego w tych badaniach.

Podsumowując mimo uwag, które są recenzenckim obowiązkiem uważam pracę i badania za wartościowe i jestem pewna, że zostaną bardzo dobrze opublikowane. Doceniam przede wszystkim ogrom wykonanej pracy i ciekawe wyniki. Ponadto uważam, że dorobek Doktorantki jest bardzo dobry co pozwala mieć nadzieję na szybki i wspaniały rozwój naukowy.

**Praca ta spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim zwracam się więc do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego, a obecnie Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Pilny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. dr hab. n. med.i n.o zdrowiu Halina Jędrzejowska-Szypułka