



Bydgoszcz, dn. 30.10.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy”**

**autorstwa mgr Marleny Tyneckiej**

realizowanej w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji  
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku  
pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Marcina Moniuszko

**promotor: dr hab. n. med. Andrzej Eljaszewicz**

Mezenchymalne komórki macierzyste to heterogenne morfologicznie i funkcjonalnie multipotencjalne komórki. Możliwości wykorzystania i manipulacji tych wywodzących się z mezodermy komórek są jednym z wiodących i najbardziej obiecujących przedsięwzięć z zakresu inżynierii tkankowej i szeroko pojętej medycyny regeneracyjnej. Mezenchymalne komórki macierzyste są komórkami występującymi w większości unaczynionych tkanek. Pierwotnie, izolowano je ze szpiku kostnego, jednakże później m.in. z tkanki tłuszczowej, galarety Whartona, krwi pępowinowej, miazgi zębowej, błony i płynu owodniowego, krwi obwodowej, gruczołów ślinowych, czy nawet z płynu maziowego. Lata prowadzonych badań pokazały ich unikatowe właściwości, jak np. możliwość ich indukowanego różnicowania się w komórki wywodzące się z endodermy i ektodermy, czy ich właściwości immunoregulacyjne. A zatem mezenchymalne komórki macierzyste są nie tylko w stanie odtwarzać uszkodzoną tkankę, ale również mogą pobudzać albo hamować przebieg odpowiedzi immunologicznej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych pt. „Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy” porusza ciekawe merytorycznie zagadnienia z zakresu immunologii i medycyny regeneracyjnej dotyczące wpływu podania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących

z ludzkiej tkanki tłuszczowej na tkankę płucną i rozwój zapalenia dolnych dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem kurzu domowego. Podjęcie tematu uważam za niezwykle istotne, gdyż pomimo rozwoju w zakresie leczenia objawowego astmy, wciąż niewłaściwie kontrolowana lub nieoptymalny protokół leczniczy prowadzi do powstawania nieodwracalnych zmian strukturalnych w obrębie płuc. Ponadto, konwencjonalne terapie leczenia objawowego astmy opierają się na wykorzystaniu wziewnych lub systemowych glikokortykosteroidów, jednakże ciągle zwiększanie ich dawek może prowadzić do rozwoju oporności terapeutycznej. Natomiast istniejące terapie biologiczne skierowane są jedynie wobec astmy T2 zależnej, stąd brak ich skuteczności u astmatyków Th2-niezależnych.

Obiecujący potencjał terapeutyczny mezenchymalnych komórek macierzystych w regulacji zapalenia dróg oddechowych został już wykazany w wielu badaniach przedklinicznych, jednakże wciąż zakres interakcji z komórkami immunologicznymi, strukturalnymi płuc oraz cząsteczkami biologicznymi nie zostały do końca poznane, a dalsze prace mogą przyczynić się nie tylko do wyjaśniania tych niezwykle złożonych mechanizmów, ale również wskazać kolejne cele terapeutyczne bez konieczności wykonywania procedury przeszczepu komórkowego. Podjęty przez Doktorantkę problem naukowy znajduje się w nurcie aktualnych badań nad rozwojem terapii komórkowej i biologicznej astmy, czego dowodem jest wzrastająca liczba publikacji w zakresie obranej tematyki badawczej.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Marleny Tyneckiej ma charakter eksperymentalny i jest zbiorem 2 powiązanych tematycznie prac naukowych oraz niepublikowanych dotąd danych doświadczalnych. Praca obejmuje 114 stron i ma właściwy układ w zakresie komentarza do opublikowanych prac z ujęciem dodatkowych wyników doświadczeń prowadzących do wyjaśnienia złożonego problemu badawczego. Rozdziały pracy obejmują kolejno: Listę publikacji składających się na rozprawę doktorską, Spis skrótów, Wstęp, Pracę poglądową wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Pracę oryginalną wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej, Nieopublikowane dane włączone do rozprawy doktorskiej, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie polskie i anglojęzyczne, Bibliografię, Zgody Komisji Etycznych na przeprowadzenie doświadczeń, Informację o charakterze udziału współautorów w publikacjach wraz z szacunkowym określeniem procentowego wkładu. Pracę kończy Oświadczenie o wdrożeniowości prowadzonych badań, a całość poprzedzona została poprawnie sformatowanym i czytelnym Spisem treści oraz



Informacją o źródłach finansowania. Praca została napisana w sposób zwięzły i zrozumiały. Skupia się na najważniejszych aspektach prowadzących do czytelnych konkluzji. Język rozprawy jest poprawny i obejmuje właściwą i aktualnie używaną terminologię. Sposób edycji pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Odnotowałem jedynie drobne literówki oraz błędy stylistyczne, które nie umniejszają jakości merytorycznej pracy i są nieodzownym elementem skomplikowanych merytorycznie i układowo prac naukowych.

Prace naukowe ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Marleny Tyneckiej zostały opublikowane w rozpoznawalnych czasopismach naukowych: *Stem Cell Reviews and Reports* (IF=6,692) oraz *Frontiers in Immunology* (IF=8,786), a zgodnie z załączonymi oświadczeniami można stwierdzić, że wkład Doktorantki w ich powstanie był znaczący i optymalnie oszacowany w stosunku do ilości autorów i zakresu indywidualnego wkładu merytorycznego. Ponadto, wskazany wkład indywidualny poszczególnych autorów, w tym Doktorantki, pokazują jednoznacznie mentorski charakter opiekuna naukowego/promotora pracy – dr hab. Andrzeja Eljaszewicza, jak również sprawną pracę doktorantki w zespole badawczym. Jedynym uchybieniem w tym zakresie jest jednoosobowa narracja opisu uzyskanych wyników, które są przecież efektem pracy zespołowej. Wprawdzie trzeba tu przyznać, że w dysertacjach o dużym wkładzie autorskim doktorantów jest to jeszcze akceptowalne, nie mniej jednak uważam, że podkreślenie wagi nawet najmniejszej jednostki zespołowej jest niezwykle istotne, zwłaszcza w tak zaawansowanej metodologicznie pracy.

Wstęp do pracy jest oparty o poprawnie dobrane i aktualne piśmiennictwo z zakresu tematyki badawczej i oparty jest o zakres merytoryczny publikacji pogładowej wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. Warto podkreślić, że praca pogładowa pt. „Old Friends with Unexploited Perspectives: Current Advances in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies in Asthma” opublikowana w *Stem Cell Reviews and Reports* (IF=6,692) na dzień sporządzania niniejszej recenzji cytowana była 6-krotnie wg Web of Science. Rozdział „Wstęp” jest bardzo zwięzły, ale daje solidne podstawy do lektury dalszych części rozprawy. Skrótowe przedstawienie złożoności istoty problemu naukowego wskazuje na ogromną wiedzę Doktorantki w zakresie obranej tematyki badawczej. Rozdział ten uwzględnia charakterystykę mezenchymalnych komórek macierzystych, aktywności immunosupresyjne mezenchymalnych komórek macierzystych, mechanizmy immunomodulacyjne zależne od bezpośrednich interakcji komórkowych, mechanizmy immunomodulacyjne zależne od czynników



rozpuszczalnych oraz wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych w regulacji zapalenia dolnych dróg oddechowych w astmie.

Cel badawczy pracy został poprawnie sformułowany i obejmował:

- 1) Potwierdzenie fenotypu, zdolności do różnicowania się w komórki linii mezodermalnej oraz właściwości immunosupresyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej usuniętej podczas zabiegu abdominoplastyki;
- 2) Ocenę bezpieczeństwa stosowania mezenchymalnych komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej w astmie z wykorzystaniem modelu mysiego;
- 3) Zbadanie i opisanie mechanizmów immunosupresyjnego działania tych komórek w eksperymentalnym modelu astmy indukowanej ekstraktem roztocza kurzu domowego.

Rozprawa doktorska została bardzo dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktorantkę techniki badawcze, które bardzo szczegółowo zostały opisane w rozdziale „Materiał i metody”, pozwoliły na zrealizowanie wszystkich założonych celów badawczych. Na uwagę zasługują również ryciny prezentujące schematy badawcze.

Mezenchymalne komórki macierzyste zostały wyizolowane z tkanki tłuszczowej pobranej z fałdów tłuszczowo-skrzynych od pacjentów zakwalifikowanych do operacji abdominoplastyki w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Na przeprowadzenie procedur uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr APK.002.114.2021). Fenotyp oraz właściwości komórek zostały potwierdzone zgodnie z minimalnymi kryteriami przyjętymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej, a więc potwierdzono adhezję komórek do powierzchni plastikowych, ekspresję powierzchniową CD73, CD90 i CD105 oraz zdolność do różnicowania się w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów. Oprócz wspomnianych powyżej markerów powierzchniowych cytofotometrycznie oceniono również ekspresję CD45 oraz HLA-DR. Zdolność do różnicowania się komórek w kierunku komórek linii mezodermalnej oceniono przy użyciu mikroskopu konfokalnego z użyciem pierwszorzędowych przeciwciał przeciwko FABP4, agrekanu oraz osteokalcyny. Po każdym trzecim pasażu, wyizolowane mezenchymalne

komórki macierzyste zamrożono w celu późniejszego ich wykorzystania w badaniach z wykorzystaniem eksperymentalnego modelu zwierzęcego. Immunosupresyjne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro* oceniono poprzez kohodowlę z proliferującymi jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej stymulowanymi przeciwciałami przeciwko CD3/CD28, ich bezpośrednią stymulację cytokinami prozapalnymi (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  albo IFN $\gamma$ ) oraz poziom przeciwzapalnej IL-10 w supernatantach hodowlanych. Metody weryfikacyjne obejmowały cytometrię przepływową, PCR w czasie rzeczywistym oraz test ELISA.

W badaniach wykorzystano również modele zwierzęce, które stanowiły myszy płci żeńskiej, szczepu C57BL/6 w wieku od 6 do 8 tygodni. Oceniono wpływ przeznosowego podania wyizolowanych wcześniej ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na płuca nieobjęte stanem zapalnym (zwierzęta uśmiercono po 2 oraz 9 dniach od momentu podania komórek) oraz na rozwój dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy o fenotypie eozynofilowym i neutrofilowym indukowanym ekstraktem kurzu domowego (zwierzęta uśmiercono po 15 dniach, a komórki podawano w dwóch punktach czasowych – w 6. i 13. dniu prowadzenia eksperymentu). Warto podkreślić, że zwierzęcy model astmy wykorzystany w badaniach Doktorantki został opracowany na podstawie doświadczeń zdobytych w Szwajcarskim Instytucie Badań nad Alergią i Astmą. Wykonano ocenę histopatologiczną płuc wraz z barwieniami immunologicznymi, ocenę populacji efektorowych limfocytów T z użyciem cytometrii przepływowej, analizę transkryptomiczną przy pomocy platformy Illumina (sekwencjonowanie nowej generacji), ocenę ekspresji białek bariery nabłonkowej przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz ocenę profilu cytokinowego przy pomocy testów immunoenzymatycznych. Na przeprowadzenie procedur związanych z modelem zwierzęcym uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (uchwała nr 35/2019).

Częściowe wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań zostały opisane w rozdziale „Wyniki”, który obejmuje podsumowanie rezultatów opublikowanych w pracy naukowej pt. „The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung” (Frontiers in Immunology, IF=8,786). Warto podkreślić, że powyższa praca oryginalna powstała w ramach współpracy międzynarodowej ze Szwajcarskim Instytutem Badań nad Alergią i Astmą. Pierwsza faza badań wykazała, że



wyzolowane z tkanki tłuszczowej komórki wykazują adhezję do powierzchni plastikowych, charakteryzują się ekspresją CD73, CD90 oraz CD105, przy jednoczesnym braku ekspresji CD45 i HLA-DR, jak również różnicują się w kierunku komórek linii mezodermalnej, a więc adipocytów, osteocytów i chondrocytów, co pozwoliło na włączenie ich do dalszych etapów badań. Badania histopatologiczne potwierdziły, że mezenchymalne komórki macierzyste nie indukowały nacieku zapalnego w obrębie tkanki płucnej oraz nie powodowały zwiększonej produkcji śluzu w porównaniu do grupy kontrolnej, choć zaobserwowano zwiększony odsetek limfocytów T efektorowych produkujących IFN $\gamma$  jako długoterminowy efekt działania mezenchymalnych komórek macierzystych, podczas gdy liczebność pozostałych subpopulacji komórkowych produkujących IL-4, IL-17 lub IL-10 nie uległa zmianom, co świadczy o indukcji zapalenia o niskim nasileniu. Ponadto, zaobserwowano obniżenie ekspresji okludyny i kładyny-3, przy niezmiennej ekspresji ZO-1, co wraz ze zwiększeniem ilości komórek produkujących IFN $\gamma$  może również wskazywać na powstanie zapalenia o niskim nasileniu, a obniżenie ekspresji białek połączeń zamykających może być rezultatem aktywności IFN $\gamma$ . Analiza regulacji szlaków sygnałowych oraz procesów biologicznych tkanek płucnych wykazała, że znaczna część genów o istotnie statystycznie zróżnicowanej ekspresji jest powiązana z procesami stresu oksydacyjnego, aktywacji makrofagów i receptorów rozpoznających wzorce oraz fagocytozy. Badanie przeprowadzone przez zespół dr hab. Andrzeja Eljaszewicza, z wiodącą rolą Doktorantki, wspierają hipotezę „umierającej komórki macierzystej”, zgodnie z którą komórki macierzyste ulegają w środowisku zapalnym apoptozie, a następnie usuwane są przez makrofagi M1 aktywowane przez limfocyty Th1 produkujące IFN $\gamma$ . Co więcej, badania zaprezentowane w niniejszej pracy pokazują, że proces ten nie musi być ograniczony do tkanek zapalnych. Tym samym określono bezpieczeństwo przynosowego podania preparatu opartego o mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z tkanki tłuszczowej.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej zostały uzupełnione o dane wcześniej nieopublikowane ujęte w rozdziale „Nieopublikowane dane włączone do rozprawy doktorskiej”. Obejmowały one potwierdzenie właściwości immunosupresyjnych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej w warunkach *in vitro* oraz efekty przynosowego podawania tych komórek w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego. Wykazano, że stymulacja mezenchymalnych komórek macierzystych za pomocą IFN $\gamma$





najefektywniej indukowała ekspresję genu CD274, co potwierdzono również cytometrycznie na poziomie produktu białkowego PD-L1. Stymulacja za pomocą IL-1 $\beta$  była z kolei najbardziej efektywna w zakresie indukcji ekspresji IL10. Ponadto, potwierdzony został potencjał immunosupresyjny, co potwierdzono znacznym obniżeniem proliferacji limfocytów. Potwierdzono tym samym, że mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej nabierają właściwości immunosupresyjnych poprzez stymulację mediatorami stanu zapalnego. Badanie z użyciem zwierzęcego modelu astmy indukowanego ekstraktem kurzu domowego wykazały, że mezenchymalne komórki macierzyste ograniczają naciek zapalny tkanki płucnej, choć istotnie tylko w przypadku ich krótkoterminowej aktywności. Ponadto jako krótkoterminowy wyraz działania tych komórek, obserwowano również obniżenie produkcji śluzu. Zaobserwowano także wzrost odsetka limfocytów T produkujących IL-4, IL-17, IFN $\gamma$  oraz IL-10 po indukcji zapalenia ekstraktem kurzu domowego, a podanie komórek macierzystych nie powodowało zmian w odsetkach analizowanych populacji limfocytów T efektorowych. Nie zaobserwowano również zmian w profilu cytokinowym popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych po przeznosowym podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych. Zaobserwowano jednakże istotne różnice w profilu ekspresji genów po podaniu komórek macierzystych. W modelu krótkoterminowym 844 geny ulegały zróżnicowanej ekspresji, podczas gdy w modelu długoterminowym zaledwie 159. W obu modelach ekspresja 279 genów była regulowana w taki sam sposób. Wykazano, że po indukcji zapalenia ekstraktem kurzu domowego zmiany obejmowały między innymi podwyższoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią zależną od limfocytów Th1, Th2, Th17, różnicowaniem limfocytów w kierunku Treg, proliferacją limfocytów, zapaleniem układu oddechowego, rekrutacją neutrofilów i eozynofili, aktywacją mediatorów lipidowych, ekspresją połączeń zamykających oraz produkcją mucyn. Natomiast zmiany w regulacji ścieżek sygnałowych po podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych w wykorzystanym modelu astmy obejmują obniżenie ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną. Bazując na wynikach analiz szlaków sygnałowych oceniono ekspresję genów związanych z takimi procesami, jak: chemotaksja, migracja i rekrutacja komórek układu immunologicznego. Podanie mezenchymalnych komórek macierzystych skutkowało istotnym statystycznie obniżeniem ekspresji genów związanych z zapaleniem układu oddechowego, migracją leukocytów, a także rekrutacją neutrofilów i eozynofili.



Otrzymane wyniki zostały omówione przez Doktorantkę w kontekście doniesień literaturowych w rozdziale „Dyskusja”. Rozdział ten jest napisany rzeczowo i merytorycznie, z możliwie najmniejszym powtarzaniem informacji zawartych w opublikowanej pracy oryginalnej. Nie mniej jednak, przedyskutowane zostały wszystkie niezbędne aspekty związane z zakresem merytorycznym rozprawy. Z obowiązku recenzenta zobowiązany jestem do wskazania braku poruszenia kwestii możliwości pokonania przez mezenchymalne komórki macierzyste najważniejszych barier organizmu regulowanych przez międzykomórkowe połączenia zamykające, w tym barierę powietrze-krew. Poruszenie tej kwestii byłoby niezwykle interesujące chociażby w kontekście oceny potencjalnego bezpieczeństwa przyszłej terapii.

Część merytoryczną pracy kończy 5 wniosków, które w pełni odzwierciedlają postawione przez Doktorantkę cele badawcze:

- 1) Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej tkanki tłuszczowej usuniętej podczas zabiegu abdominoplastyki posiadają charakterystyczne cechy fenotypowe, różnicują się do komórek linii mezodermalnej oraz wykazują właściwości immunosupresyjne po stymulacji czynnikami zapalnymi.
- 2) Podanie mezenchymalnych komórek macierzystych do niezmienionej zapalnie tkanki płucnej myszy indukuje stan zapalny niskiego nasilenia, który związany jest z usuwaniem apoptotycznych komórek przez fagocyty biorcy. Dlatego, przenosowe podanie mezenchymalnych komórek macierzystych może być rozpatrywane jako bezpieczne.
- 3) Przenosowe podanie mezenchymalnych komórek macierzystych ogranicza zapalenie dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy o endotypie mieszanym.
- 4) Immunosupresyjne efekty działania mezenchymalnych komórek macierzystych w zastosowanym modelu zależą od regulacji procesów chemotaksji, migracji i rekrutacji komórek immunologicznych
- 5) Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej może być efektywne w leczeniu astmy o endotypie mieszanym.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Marleny Tyneckiej są spójne i niezwykle przydatne z punktu widzenia podjętej problematyki



badawczej. Co więcej, mają one duży potencjał aplikacyjny i stanowią część większego projektu naukowego. Doktorantka pokazała, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, a także wykorzystać niezwykle szeroki i godny podziwu warsztat badawczy. Mgr Marlena Tynecka wykazała się również umiejętnością przeprowadzenia dyskusji swoich wyników z wynikami innych grup badawczych. Wskazane przeze mnie drobne błędy stanowią jedynie element kosmetyczny pracy i nie mają wpływu na jakość merytoryczną rozprawy, a zatem kwestia przedyskutowania lub rozszerzenia badań o zdolność pokonywania barier organizmu przez komórki mezenchymalne jest jedynie wskazówką do dalszej drogi aplikacyjnej.

W związku z powyższym, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marleny Tyneckiej pt. „Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022 r., poz 574 z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Marleny Tyneckiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość poznawczą pracy wyrażoną w międzynarodowych i wysokopunktowanych publikacjach naukowych, jakość przeprowadzonych badań w oparciu o imponujący warsztat naukowy, współpracę międzynarodową, a także aplikacyjność otrzymanych wyników wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Marleny Tyneckiej pt. „Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy”.



dr hab. n. med. i n. o zdr. Maciej Gagat, prof. UMK