

Dr hab. n. med Dawid Murawa prof UZ, Prof WSZUiE

Katedra Chirurgii i Onkologii

Collegium Medicum

Uniwersytet w Zielonej Górze

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Lacha pt.: „Opracowanie metody różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku progenitorów chondrocytów w warunkach przedklinicznych”

Praca liczy 85 stron maszynopisu i zawiera 3 publikacje które składają się na dysertację.

Układ pracy jest prawidłowy i zawiera rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, kopie publikowanych prac oraz podsumowanie i wnioski.

Zachorowalność na chorobę zwyrodnieniową stawów stale wzrasta. Problem dotyczy głównie krajów wysokorozwiniętych. Ma to związek z trybem życia i wzrastającą średnią długością życia. W rozwoju choroby podkreśla się rolę licznych czynników chociażby: otyłość, siedzący tryb życia, ciężką pracę fizyczną, wzmożoną aktywność fizyczną czy też oczywiście predyspozycje genetyczne. Pierwsze etapy choroby w większości sytuacji są bezobjawowe dlatego też najczęściej rozpoznanie stawiane jest w późniejszych etapach. Stany te wymagają niestety często interwencji chirurgicznych. Mniej inwazyjne metody takie jak autologiczny przeszczep chondrocytów, czy mikroślamania to postępowanie doraźne poprawiające kondycję stawów, ale nie hamujące i nie cofające rozwoju samej choroby. Problem odnowy chrząstki we wspomnianych metodach mniej inwazyjnych polega na tworzeniu się zamiast chrząstki szklistej w miejscach ubytków chrząstki włóknistej, która charakteryzuje się

odmiennymi właściwościami biomechanicznymi. Chondrocyty stanowią zaledwie 2% masy chrząstki stawowej co powoduje, że zdolności regeneracyjne są znacznie ograniczone.

Chondrocyty pochodzą w swoim rozwoju ze zróżnicowanej mezenchymy. Opracowanie zatem terapii komórkowych opartych o mezenchymalne komórki zrębowe wydaje się być w pełni uzasadnione. W dorosłym organizmie źródłem tych komórek są szpik kostny oraz tkanka tłuszczowa. Okazuje się, iż pochodzenie komórek determinuje ewentualne różnicowanie. Zdecydowanie lepszy prochondrogeny potencjał przedstawiają komórki izolowane ze szpiku niż z tkanki tłuszczowej. Tutaj pojawia się kolejny problem małej populacji komórek w szpiku i potrzeby ich namnażania w warunkach *in vitro*. Dlatego wydaje się, iż ciekawym źródłem komórek do celów terapeutycznych są pluripotencjalne komórki macierzyste. Ich uzyskiwanie z rozwijającego się embrionu budzi oczywiste kontrowersje natury etycznej. Dlatego odkrycie możliwości pozyskiwania komórek pluripotencjalnych z komórek somatycznych na drodze reprogramowania wydaje się być doskonałym rozwiązaniem pod warunkiem eliminacji populacji komórek, które nie zdołały się całkowicie zróżnicować. Komórki te grożą bowiem powstaniem heterogennych tkanek pod postacią potworniaków. Z kolei używane czynniki transkrypcyjne, które są znanymi protoonkogenami w przypadku integracji z genomem biorcy mogą zwiększać ryzyko transformacji nowotworowej. Dlatego zwraca się uwagę aby w sposób rygorystyczny analizować i identyfikować zmiany świadczące o potencjalnej transformacji nowotworowej. Kolejny problem zastosowania pluripotencjalnych komórek macierzystych to potencjalna immunogenność. Mimo, iż mamy do czynienia z przeszczepem autologicznym obserwuje się indukcję odpowiedzi immunologicznej ze strony biorcy. Dlatego być może rozsądnym rozwiązaniem wydają się przeszczepy allogeniczne z banków komórek zmodyfikowane dzięki metodom inżynierii genetycznej. Dotychczasowe wyprowadzanie komórek prochondrogennych z komórki pluripotencjalnej wymaga między innymi stosowania

czynników wzrostowych. Ważne jest tutaj także mikrośrodowisko charakterystyczne dla tkanki chrzęstnej – ilość składników odżywczych, hipoksja. Powszechnie stosowane dziś metody wykorzystują znaczne ilości cytokin i czynników wzrostu co w istotny sposób podnosi koszty procesu różnicowania komórek prochondrogennych.

Cele recenzowanej pracy zostały przedstawione w 3 punktach. Zasadniczym założeniem i celem pracy było opracowanie wydajnej metody różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku chondrocytów i tym samym przedklinicznego modelu dla regeneracji chrząstki stawowej.

Doktorant wyniki przedstawił w trzech publikacjach w recenzowanych czasopismach. W pierwszym doniesieniu podjęto próbę ekonomicznego opracowania protokołu do wykształcenia populacji komórek prochondrogennych. W badaniu uformowano dwie grupy; jedną w hodowli w pożywce chondrogennej i drugą z dodatkiem czynników wzrostu. W tym ostatnim wariantcie wykazano większą intensywność barwień w kierunku kolagenu II oraz depozycji proteoglikanów. Zwrócono uwagę na niższą ekspresję markerów prochondrogennych niż w kontroli – linia ludzkich chondrocytów wyizolowanych z chrząstki stawowej. Ponadto obecna ekspresja markera NANOG stwarza ryzyko tworzenia potworniaka. Autor sugeruje zatem dalsze modyfikacje i wydłużenie procesu różnicowania celem pozbycia się komórek PSC. Kolejny etap przedstawiony w publikacji nr 2 zwraca uwagę na wykorzystanie innej właściwości komórek pluripotencjalnych; zdolności do różnicowania w komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych w formie tzw. kul zarodkowych. Odpowiednie ukierunkowanie procesu na uzyskanie promezodermalnych kul zarodkowych do dalszego prochondrogennego różnicowania byłoby zatem właściwą drogą. Doktorant wykazał, iż wykorzystanie mniejszych kul zarodkowych wzmaga różnicowanie komórek w kierunku mezodermalnego listka zarodkowego co w przypadku ich dalszego różnicowania w kierunku komórek chondrocytopodobnych przekłada się na zwiększoną

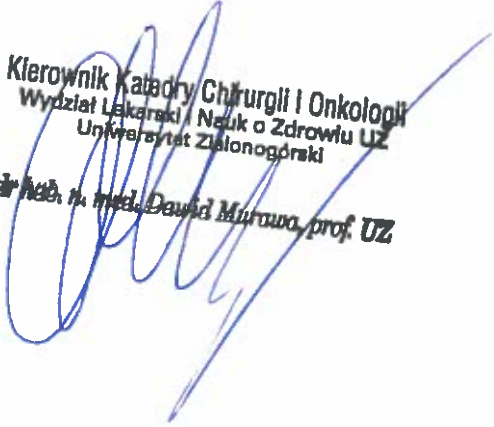
ekspresję związaną z chondrogenezą. Doktorant zwraca uwagę jednak na znaczną heterogenność populacji i niezbędne dalsze modyfikacje, które pozwolą na przeprowadzenie analiz in vivo. Kolejną część przedstawionego we wstępie omówienia to problem wykorzystania komórek macierzystych pluripotencjalnych w warunkach przedklinicznych. Doktorant zwraca uwagę na kwestie sporne dotyczące pożywek hodowlanych niezbędnych w procesie proliferacji komórek. Dodatek płodowej surowicy bydlęcej to problem produktów pochodzenia zwierzęcego, zmiennej ich jakości i ryzyko immunologicznej odpowiedzi biorcy na białko zwierzęce. W aspekcie procesu chondrogenyzy jej dodatek może negatywnie wpływać na funkcjonalność uzyskanych komórek. Kolejny hamulec do wykorzystania komórek pluripotencjalnych w warunkach klinicznych to zastosowanie w hodowlach, mysich lub ludzkich fibroblastów. Ponownie pochodzenie komórek, ich zmienność w kolejnych pasażach oraz sposób zatrzymywania proliferacji chociażby poprzez napromienianie to realne elementy wykluczające rutynowe użycie w klinice. Doktorant zwraca dalej uwagę na postęp technologiczny i fakt kolejno w latach 2006 i 2011 uzyskania gotowych pożywek hodowlanych pozbawionych wyżej opisywanych problemów. Podkreśla także brak na ten moment badań klinicznych dotyczących regeneracji tkanki chrzęstnej co wynika z braku zwalidowanego modelu przedklinicznego. Tej kwestii dotyczy trzecia publikacja przedstawionej dysertacji jako kontynuacja badań z publikacji numer dwa. Badania przeprowadzone przez doktoranta dowodzą, iż niska liczba komórek wykorzystanych w tworzeniu kul zarodkowych oraz stosowanie hodowli trójwymiarowej umożliwiają uzyskanie progenitorów chondrocytów z komórek pluripotencjalnych. Poza tym eliminacja komórek warstwy odżywczej jak i surowicy zwierzęcej umożliwiły wskazanie protokołu o określonych i powtarzalnych warunkach przy niższych kosztach co stanowi wydaje się otwartą drogę do realizacji modelu badań przedklinicznych. Należy żywić nadzieję, iż doktorant będzie kontynuował tak ciekawy i istotny klinicznie temat badawczy.

Rozprawa kończy się 3 wnioskami, które w pełni wynikają z analizowanego materiału.

Wyniki przedstawionej rozprawy doktorskiej przedstawiają innowacyjny protokół różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku progenitorów chondrocytów umożliwiającą zastosowanie otrzymanych komórek w warunkach badań przedklinicznych.

Praca opatrzona została streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Michała Lacha przedstawia aktualny problem kliniczny i naukowy. Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgr Michała Lacha pt. „Opracowanie metody różnicowania pluripotencjalnych komórek macierzystych w kierunku progenitorów chondrocytów w warunkach przedklinicznych” w pełni spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę rozprawom doktorskim. Jednocześnie uważam, że Pan Michał Lach jest kandydatem spełniającym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Na tej podstawie stawiam wniosek do Wysokiej Rady Dyscyplin Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Michała Lacha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Kierownik Katedry Chirurgii i Onkologii
Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu UZ
Uniwersytet Zielonogórski
dr hab. n. med. Dawid Murawa, prof. UZ