



Bydgoszcz, dn. 16.01.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Opracowanie metody izolacji i hodowli pierwotnej oraz badanie zdolności do różnicowania się komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona”

autorstwa mgr Katarzyny Stefańskiej

realizowanej w Instytucie Biostrukturalnych Podstaw Nauk Medycznych
Zakładzie Histologii i Embriologii
Kolegium Nauk o Zdrowiu
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

promotor: prof. dr hab. n. med. Bartosz Kempisty

Mezenchymalne komórki macierzyste to heterogenne morfologicznie i funkcjonalnie multipotencjalne komórki, których możliwości wykorzystania i dalszej manipulacji są jednym z wiodących i najbardziej obiecujących przedsięwzięć z zakresu inżynierii tkankowej. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, mezenchymalne komórki macierzyste są komórkami występującymi w większości unaczynionych tkanek. Liczne badania pokazały ich unikatowe właściwości, tj. możliwość ich indukowanego różnicowania się w komórki wywodzące się z endodermy i ektodermy oraz właściwości immunoregulacyjne. Pierwotnie komórki te izolowano ze szpiku kostnego, jednakże później z tkanki tłuszczowej, galarety Whartona, krwi pępowinowej, miazgi zębowej, błony i płynu owodniowego, krwi obwodowej, gruczołów ślinowych, czy nawet z płynu maziowego. Z punktu widzenia wdrożeniowego oraz komercyjnego w dziedzinie usług, w ostatnich latach, bardzo duże zainteresowanie jako źródło mezenchymalnych komórek macierzystych wzbudza sznur pępowinowy. Szczególnie, z uwagi na fakt, że stanowi on odpad medyczny pozyskiwany w wyniku porodu.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych pt. „Opracowanie metody izolacji i hodowli pierwotnej oraz badanie zdolności do różnicowania się komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona” porusza ciekawe merytorycznie zagadnienia z zakresu medycyny regeneracyjnej i dotyczące charakterystyki

transkryptomistycznej mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona. Podjęty przez Doktorantkę problem naukowy znajduje się w nurcie aktualnych badań nad rozwojem terapii komórkowej i stanowi ważny wkład merytoryczny w dyskusji na temat przydatności usług bankowania mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych ze sznura pępowinowego. Warto podkreślić, że badania ujęte w rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane przez Ministerstwo Edukacji i Nauki w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy”.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Katarzyny Stefańskiej ma charakter eksperymentalny i jest zbiorem 3 powiązanych tematycznie prac naukowych. Praca obejmuje 165 stron i ma właściwy układ dla komentarza do zbioru opublikowanych publikacji naukowych. Rozdziały pracy obejmują kolejno: „Źródła finansowania”, „Listę skrótów”, „Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania o nadanie stopnia doktora”, „Aktywność naukową osoby ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora wraz z opisem dorobku naukowego,” „Przedmiot badań” i „Załączniki” w postaci: kopii prac stanowiących cykl publikacji, pisemnych oświadczeń współautorów prac tworzących cykl o wyrażeniu zgody na wykorzystanie publikacji dla potrzeb przeprowadzenia przewodu doktorskiego oraz określających indywidualny wkład każdego z nich w powstanie wymienionych w cyklu publikacji, a także zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Prace naukowe ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Katarzyny Stefańskiej zostały opublikowane w rozpoznawalnych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku IF = 15.440 i 420 punktów wg MEiN (obecnie MNiSW). Publikacja nr 1 została opublikowana w *Journal of Clinical Medicine* (IF = 4.240), natomiast publikacje nr 2 i 3 w *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 5.600). Zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów, można stwierdzić, że wkład Doktorantki w powstanie zbioru prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej był znaczący i potwierdza jej wiodącą pracę merytoryczną i techniczną.

Komentarz do publikacji wchodzących w skład cyklu prac naukowych stanowiących podstawę nadania stopnia doktora ujęto w rozdziale Przedmiot badań. Został on podzielony na następujące podrozdziały: „Wstęp”, „Założenia rozprawy”, „Cele”, „Komentarz do publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora”, „Wnioski”, „Piśmiennictwo” oraz „Streszczenie” w języku polskim i angielskim.



Podrozdział „Wstęp” stanowi krótkie wprowadzenie do zagadnień ujętych w publikacjach naukowych stanowiących podstawę nadania stopnia doktora i obejmuje zwięzłą charakterystykę głównych typów komórek macierzystych, sznura pępowinowego i galarety Whartona. Ponadto Doktorantka, wymieniła identyfikatory badań klinicznych uwzględniających wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona w leczeniu przykładowych chorób. Rozdział ten słusznie kończy się wprowadzeniem do metodologii pracy i hasłowym uzasadnieniem wybrania kluczowej metody prac badawczych – sekwencjonowania RNA. Rozwinięciem tego rozdziału jest publikacja pogładowa, która wchodzi w skład niniejszej dysertacji i stanowi właściwy wstęp do rozprawy doktorskiej. Stąd, w mojej ocenie, zwięzły charakter rozdziału jest w pełni uzasadniony i stanowi jedynie nakierowanie czytelnika na istotę problemu naukowego rozwiązywanego podczas realizacji przewodu doktorskiego, choć dla zachowania przejrzystości określiłbym go mianem „Wprowadzenia”.

W podrozdziale „Założenia rozprawy”, Doktorantka prezentuje przedmiot badań i wskazuje, że założeniem rozprawy była weryfikacja hipotezy mówiącej, że zoptymalizowana metoda izolacji, długoterminowej hodowli pierwotnej oraz różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona pozwoli na uzyskanie chondrocytów, adipocytów, osteoblastów i komórek typu nerwowego. Założeniem rozprawy było również dostarczenie nowych informacji dotyczących molekularnych mechanizmów zaangażowanych w proces różnicowania *in vitro*, co może przełożyć się na ich zastosowanie w środowisku klinicznym.

Cele rozprawy doktorskiej zostały wskazane przez mgr Katarzynę Stefańską w podrozdziale „Cele” i odnoszą się do poszczególnych prac włączonych do cyklu publikacji naukowych stanowiących podstawę nadania stopnia doktora. Obejmują kolejno: (1) Charakterystykę ludzkich komórek pozyskiwanych z galarety Whartona, a w szczególności ich potencjału macierzystości oraz analizę aktualnego zastosowania w badaniach klinicznych i przedklinicznych, jako alternatywy dla przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych w terapiach komórkowych, (2) Identyfikację genów związanych z apoptozą, zaangażowanych w proces różnicowania *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona w kierunku osteoblastów, chondrocytów, adipocytów i komórek typu nerwowego, i (3) Określenie zmian transkryptomicznych zachodzących podczas różnicowania

mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona oraz identyfikacja nowych markerów biorących udział w tym procesie, co może służyć jako punkt odniesienia do dalszych badań eksplorujących rolę tych genów w fizjologii mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona oraz w medycynie regeneracyjnej. Określone przez Doktorantkę cele skonstruowane są poprawnie, znajdują odzwierciedlenie w celach opublikowanych prac i stanowią rozwinięcie założeń rozprawy doktorskiej.

Prace naukowe cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską mgr Katarzyny Stefańskiej zostały przez nią omówione w podrozdziale „Komentarz do publikacji wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora”.

Pierwszą publikację cyklu stanowi praca pogładowa pt. „Human Wharton's Jelly-Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trial” opublikowana w 2020 roku w *Journal of Clinical Medicine* (IF = 4.240). Warto podkreślić, że na dzień sporządzenia niniejszej recenzji, publikacja cytowana była 32-krotnie wg Web of Science i powstała ona w ramach współpracy zagranicznej (afiliacje z Wielkiej Brytanii, Brazylii i Republiki Czeskiej). Publikacja ta stanowi właściwy wstęp do rozprawy doktorskiej i swoim zakresem obejmuje kluczowe aspekty związane z komórkami macierzystymi oraz sznurem pępowinowym, w tym jego histologię i charakterystykę komórek znajdujących się w poszczególnych jego komponentach. Praca obejmuje również charakterystykę komórek znajdujących się w galarecie Whartona, macierzystych właściwości komórek stromalnych galarety Whartona, właściwości immunoregulacyjne wykazywane przez mezenchymalne komórki macierzyste pozyskiwane z galarety Whartona, a także omówienie dotychczas przeprowadzonych badań przedklinicznych i klinicznych z wykorzystaniem powyższych komórek.

Drugą publikację cyklu stanowi praca oryginalna pt. „Apoptosis Related Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Differentiation into Osteoblasts, Chondrocytes, Adipocytes and Neural-like Cells-Complete Transcriptomic Assays” opublikowana w 2023 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 5.600). Publikacja cytowana była 1-krotnie wg Web of Science, jednakże ukazała się ona 12 czerwca 2023 r. Warto podkreślić, że podobnie jak praca nr 1, publikacja ta powstała w ramach współpracy zagranicznej (afiliacje z Republiki Czeskiej i USA). Oprócz klasycznej oceny morfologii komórek i różnicowania oraz



analizy cytometrycznej, praca skupia się na przedstawieniu wyników sekwencjonowania RNA wyizolowanego z komórek zróżnicowanych oraz kontrolnych mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona. Na uwagę zasługuje bogata analiza bioinformatyczna wyników, która dowodzi zaawansowaniu prac stanowiących przedmiot niniejszego doktoratu. Przeprowadzone badania, nie tylko potwierdziły dostępne dane literaturowe w zakresie zwiększonej ekspresji genów związanych z apoptozą w procesie różnicowania, ale również wykazały nowe potencjalne markery różnicowania osteogenego (*CD14*, *EDNRB*, *SEPTIN4*), neurogenego (*BEX2*, *ITPR1*, *SEPTIN4*), adipogenego (*ITPR1*, *SEPTIN4*) i chondrogenego (*SEPTIN4*) mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona. W publikacji zwrócono również uwagę na potrzebę identyfikacji skutków długotrwałej hodowli *in vitro* i procesu różnicowania w kontekście śmierci na drodze apoptozy, zwłaszcza, że w środowisku klinicznym komórki te mogą być dodatkowo narażone na śmierć indukowaną hipoksją i niedostateczną zawartością składników odżywczych.

Trzecią i ostatnią publikacją cyklu stanowi praca oryginalna pt. „Expression Profile of New Marker Genes Involved in Differentiation of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes, Osteoblasts, Adipocytes and Neural-like Cells” opublikowana w 2023 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 5.600). Publikacja nie była dotąd cytowana, lecz ukazała się dopiero 18 sierpnia 2023 r. Podobnie jak dwie poprzednie publikacje cyklu powstała ona we współpracy z ośrodkami zagranicznymi (afiliacje z USA i Republiki Czeskiej). W pracy przedstawiono analizę wyników sekwencjonowania RNA macierzystych komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona i zróżnicowanych do chondrocytów, adipocytów, osteoblastów oraz komórek typu nerwowego wobec komórek niezróżnicowanych. Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy stanowią bezpośrednią kontynuację i rozwinięcie badań przedstawionych w publikacji nr 2 cyklu prac tworzących niniejszą rozprawę doktorską. Umożliwiły one poznanie zmian transkryptomicznych zachodzących podczas różnicowania macierzystych komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona w warunkach *in vitro* oraz identyfikację nowych markerów zaangażowanych w ten proces. Są one o tyle istotne, gdyż mogą stanowić podstawę do dalszych badań transkryptomicznych i proteomicznych w celu opracowania bezpiecznych i skutecznych terapii komórkowych, a także pozwalają uzupełnić obraz fizjologii tych komórek. W pracy wskazano również, że zróżnicowane komórki mezenchymalne



pozyskane z galarety Whartona, zwłaszcza w formie sferoidów, mogą służyć jako trójwymiarowy model do testowania i opracowywania nowych leków.

Rozprawa doktorska została bardzo dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktorantkę techniki badawcze i uzyskane za ich pośrednictwem wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej reprezentowanej przez Doktorantkę. Źródłem materiału badawczego były sznury pępowinowe pozyskane ze Szpitala Ginekologiczno-Położniczego w Poznaniu na podstawie zgód Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (nr 237/19 i 199/21). Język rozprawy nie budzi zastrzeżeń, choć odnotowałem drobne błędy stylistyczne, literowe, żargon laboratoryjny, czy zbędne wtręty anglojęzyczne. Dla przykładu:

- na stronie 17 rozprawy Doktorantka pisze „W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki sekwencjonowania RNA komórek WJ-MSCs nieodróżnicowanych” zamiast „W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiono wyniki sekwencjonowania RNA nieodróżnicowanych WJ-MSCs”,
- na stronie 23 rozprawy Doktorantka używa „odtrawionych komórek” zamiast „enzymatycznie odklejonych” albo „odklejonych od podłoża przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny”, odnosząc się do wskazania w omawianej publikacji naukowej,
- na stronie 45 rozprawy Doktorantka nie tłumaczy na język polski grupy ontologicznej „pozytywna regulacja procesu apoptozy” i pomija literę „s” w słowie anglojęzycznym „*process*” („*positive regulation of apoptotic proces*”).

Część merytoryczną rozprawy kończą 3 wnioski, które w pełni odzwierciedlają postawione przez Doktorantkę cele badawcze i bezpośrednio odnoszą się do poszczególnych publikacji naukowych stanowiących podstawę do nadania stopnia doktora:

- 1) Na podstawie dostępnych danych literaturowych wykazano, że mezenchymalne komórki macierzyste pozyskiwane z galarety Whartona wykazują cechy mezenchymalnych komórek macierzystych o wysokim potencjale różnicowania i proliferacji, a także o szerokich właściwościach immunomodulujących. Przyniesione w publikacji nr 1 prezentowanego cyklu badania przedkliniczne oraz



kliniczne wskazują, że potencjał do zastosowania tych komórek we wspomaganiu leczenia poważnych schorzeń oraz w regeneracji tkanek jest wysoki.

- 2) Dzięki przeprowadzonemu sekwencjonowaniu RNA komórek mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona niezróżnicowanych oraz zróżnicowanych do osteoblastów, chondrocytów, adipocytów i komórek typu nerwowego (publikacja nr 2) zidentyfikowano geny zaangażowane w proces apoptozy, których ekspresja ulega zmianie podczas różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że większość genów ulegających najbardziej podwyższonej ekspresji w zróżnicowanych komórkach jest zaangażowana w pozytywną regulację tego procesu, w związku z czym można wnioskować, że przedłużona hodowla *in vitro* oraz różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona skutkuje nasileniem apoptozy.
- 3) Na podstawie przeprowadzonych analiz (publikacja nr 3) zidentyfikowano geny o najbardziej zmienionej ekspresji podczas różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskanych z galarety Whartona do osteoblastów, chondrocytów, adipocytów i komórek typu nerwowego w warunkach *in vitro*. Mezenchymalne komórki macierzyste pozyskane z galarety Whartona zróżnicowane do komórek typu nerwowego różnią się w kwestii genów o najbardziej podwyższonej ekspresji w porównaniu z pozostałymi trzema grupami, które wykazują znaczące podobieństwa w tym zakresie. Chociaż większość genów o stwierdzonej na podstawie obecnych badań najbardziej podwyższonej ekspresji w zróżnicowanych mezenchymalnych komórkach macierzystych pozyskanych z galarety Whartona została już w literaturze powiązana z procesem różnicowania komórek, z reguły analizy te nie były przeprowadzane na mezenchymalnych komórkach macierzystych pozyskanych z galarety Whartona, tylko na komórkach pozyskiwanych z innych tkanek. Ponadto na podstawie otrzymanych wyników zidentyfikowano także nowe markery, których wcześniej nie wiązano z procesem różnicowania.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej mgr Katarzyny Stefańskiej 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, w tym bioinformatyczny. Mgr Katarzyna Stefańska wykazała się również umiejętnością konfrontacji swoich wyników z doniesieniami innych grup badawczych, co potwierdzają bardzo dobrze przeprowadzone dyskusje w publikacjach oryginalnych włączonych do dysertacji. Wskazane przeze mnie drobne błędy stanowią jedynie element kosmetyczny pracy i nie mają najmniejszego wpływu na jakość merytoryczną rozprawy.

Na uwagę zasługuje również dorobek naukowy Doktorantki. Jest współautorem 44 publikacji naukowych o sumarycznym współczynniku $IF = 73.494$ i 2275 punktów wg MEiN (obecnie MNiSW). Ponadto, zgodnie z informacją zawartą w rozdziale „Aktywność naukowa osoby ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora wraz z opisem dorobku naukowego”, na dzień 7 grudnia 2023 r. liczba cytowań prac naukowych wg bazy Web of Science wynosiła 120 (w tym 117 bez autocytowań), a indeks Hirscha – 7. Potwierdza to widoczność prac naukowych współautorstwa mgr Katarzyny Stefańskiej oraz istotność podejmowanych przez nią przedsięwzięć badawczych. Pokazuje to również wysoką pozycję naukową zespołu, którego jest członkiem, a także wysoki mentorski charakter opiekuna naukowego i promotora – prof. dr hab. n. med. Bartosza Kempistego.

Jako kolejną istotną informację z punktu widzenia realizacji badań w ramach finansowania z programu MEiN (obecnie MNiSW) pn. „Doktorat Wdrożeniowy” uważam współautorstwo w 2 patentach zgłoszonych przez Cellivia 3 Spółka Akcyjna:

- Pat.243367 pt. „Sposób krioprechowывania nieembrionalnych, mezenchymalnych komórek macierzystych i egzosomów z dźwięsła oraz krioprechowывania komórek macierzystych dźwięsła i egzosomów”
- Pat.242801 pt. „Sposób przechowывania multipotencjalnych mezenchymalnych komórek macierzystych z miazgi zęba”.

W związkuz z powyższym, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Stefańskiej pt. „Opracowanie metody izolacji i hodowli pierwotnej oraz badanie zdolności do różnicowania się komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona” 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.). Dodatkowo jest ona spójna z



zakresem równoległej działalności naukowej w firmie biotechnologicznej Cellivia 3 Spółka Akcyjna. Dlatego wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Stefańskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość poznawczą pracy wyrażoną w międzynarodowych i wysokopunktowanych publikacjach naukowych, jakością przeprowadzonych badań w oparciu o sekwencjonowanie RNA, współpracę międzynarodową, a także aplikacyjność otrzymanych wyników wnioskuję do Kapituły Kolegium Nauk o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Katarzyny Stefańskiej pt. „Opracowanie metody izolacji i hodowli pierwotnej oraz badanie zdolności do różnicowania się komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona”.

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