



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Barbara Bilińska
Uniwersytet Jagielloński

**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Katarzyny Stefańskiej
pt. *Opracowanie izolacji i hodowli pierwotnej oraz badania zdolności do
różnicowania komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona***

Rozprawa mgr Katarzyny Stefańskiej powstała w oparciu o trzy publikacje, w tym jeden artykuł przeglądowy i dwie oryginalne prace badawcze. Badania wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii Instytutu Biostrukturalnych Podstaw Medycznych, Kolegium Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Bartosza Kempistego.

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR, a Doktorantka jest ich pierwszym autorem. Wyniki badań wraz z dokumentacją dla każdego z artykułów oryginalnych, zostały zweryfikowane przez minimum dwóch zagranicznych recenzentów, powołanych przez redakcje czasopism. Artykuł przeglądowy, opublikowany w czasopiśmie specjalistycznym, również został oceniony przez co najmniej dwóch ekspertów. Zatem moja ocena, w dużej mierze, będzie dotyczyć polskojęzycznego opracowania, w którym Doktorantka, poza włączeniem skanów trzech publikacji przygotowała staranny komentarz w języku polskim dla każdej z nich, mający na celu uzupełnienie anglojęzycznych artykułów i zwieńczenie pracy w całość. Ponadto, w rozprawie znajduje się wykaz skrótów, informacje o aktywności naukowej Doktorantki, wstęp, założenia i cele badań, oraz wnioski i streszczenia w języku polskim i angielskim. Stosowne oświadczenia współautorów, załączone w końcowej części rozprawy, wskazują na wiodący udział Doktorantki w opracowaniu, realizacji i przygotowaniu manuskryptów wieloautorskich prac, stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie „nauki o zdrowiu”.

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Dane bibliograficzne publikacji przedstawiam poniżej:

1. Stefańska *et al.* Human Wharton's Jelly - Cellular Specificity, Stemness Potency, Animal Models, and Current Application in Human Clinical Trials. *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9(4): 1102. (IF: 4,240; punkty MEiN: 140)
2. Stefańska *et al.* Apoptosis Related Human Wharton's Jelly-Derived Stem Cells Differentiation into Osteoblasts, Chondrocytes, Adipocytes and Neural-like Cells - Complete Transcriptomic Assays. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(12): 10023 (IF: 5,600; punkty MEiN: 140)

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

3. Stefańska *et al.* 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. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(16): 12939. (IF: 5,600; punkty MEiN: 140)

Wysoko oceniam wartość naukową rozprawy, której przedmiotem była analiza transkryptomyczna macierzystych komórek pozyskiwanych z galarety Whartona, nie zróżnicowanych i podlegających zróżnicowaniu do chondrocytów, adipocytów, osteoblastów i komórek typu nerwowego, co pozwoliło na zidentyfikowanie genów, m.in. związanych z apoptozą, zaangażowanych w różnicowanie komórek *in vitro* i wykazanie nowych markerów różnicowania.

W dobrze i zwięźle napisanym *Wstępie* Doktorantka przedstawia znaczenie komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej, zwracając uwagę na różne źródła ich pozyskiwania, m.in. szpik kostny, tkanka tłuszczowa, łożysko. Koncentruje się na sznurze pępowinowym wraz z galaretą Whartona, omawiając zalety komórek macierzystych z niej pozyskanych i podkreśla, że sznur pępowinowy jako odpad medyczny uzyskiwany podczas porodu, stanowi łatwo dostępne źródło wysoce proliferujących komórek macierzystych, a galareta Whartona stanowi obiecującą alternatywę dla szpiku kostnego jako źródło komórek o dużym potencjale. Uważam, że *Wstęp* wystarczająco argumentuje założenia i cel pracy oraz podjęcie się charakterystyki izolowanych i hodowanych komórek macierzystych. W tym miejscu pragnę podkreślić merytoryczną wartość artykułu przeglądowego, w którym na podstawie najnowszego, światowego piśmiennictwa, przedstawiono histologiczną strukturę sznura pępowinowego i dokonano charakterystyki komórek w nim zawartych, a w oparciu o badania immunohistochemiczne, wnikliwie omówiono cechy komórek macierzystych z galarety Whartona, ich właściwości immunomodulacyjne i możliwości ich wykorzystania w badaniach przedklinicznych i klinicznych, jako alternatywy dla przeszczepów allo- i ksenogenicznych w terapiach komórkowych. Wyniki tych badań zebrano w niezwykle informatywnych tabelach, co stanowi dodatkowy atut publikacji.

Metodyka badań została szczegółowo opisana w oryginalnych publikacjach i przedstawiona w polskojęzycznym opracowaniu. Materiał badawczy był pozyskiwany podczas zdrowych porodów w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym w Poznaniu, a prowadzenie całości badań zostało pozytywnie zaopiniowane (zgody nr 237/19 oraz nr 199/21) przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Doktorantka opisała warunki izolacji komórek macierzystych z galarety Whartona i ich hodowli wraz z podaniem badanych markerów powierzchniowych (CD44, CD105 i CD73 służyły jako markery pozytywne, a CD34, CD31

i CD45 jako negatywne) i czasem różnicowania komórek do chondrocytów, adipocytów, osteoblastów i komórek typu nerwowego. Każde docelowe różnicowanie było potwierdzone odpowiednim, specyficznym dla danego typu komórek, barwnikiem. Izolację RNA i jego sekwencjonowanie prowadziła dla komórek zróżnicowanych i nie-zróżnicowanych, które służyły jako kontrola. Analiza bioinformatyczna i statystyczna pozwoliła na identyfikację genów związanych z apoptozą. Doktorantka wykazała zmiany transkryptomyczne podczas różnicowania badanych komórek. Przykładowo, w komórkach zróżnicowanych do chondrocytów, adipocytów i osteoblastów, geny *ZBTB16*, *FOXO1* i *SEPTIN4* wykazywały podwyższoną ekspresję w stosunku do kontroli, podczas gdy ekspresja *IGF1* była wyższa w komórkach zróżnicowanych do chondrocytów, osteoblastów i komórek typu nerwowego, a genów *CNR1* i *FRZB*, tylko w tych, zróżnicowanych do adipocytów. Dalsza analiza wykazała, iż we wszystkich grupach komórek zróżnicowanych zwiększonej ekspresji ulegają geny zaangażowane w proces apoptozy, większość z nich związana jest z pozytywną regulacją tego procesu, co pozwoliło na stwierdzenie zależności pomiędzy czasem hodowli komórek macierzystych *in vitro* i ich różnicowaniem, a nasileniem apoptozy. Wyniki powyższych badań zostały szczegółowo udokumentowane i przedyskutowane w drugiej publikacji.

Kolejnym celem badań było poznanie mechanizmów molekularnych biorących udział w różnicowaniu komórek macierzystych z galarety Whartona. Poddano analizie pięć genów o najsilniej podwyższonej ekspresji w każdej ze zróżnicowanych grup. Doktorantka wykazała odmienny zestaw genów o podwyższonej ekspresji w komórkach zróżnicowanych do chondrocytów, adipocytów i osteoblastów, a inny w tych, zróżnicowanych do komórek typu nerwowego, wskazując, iż te ostatnie różnią się w zakresie genów od komórek zróżnicowanych do chondrocytów, adipocytów i osteoblastów, które cechuje szereg podobieństw. Istotnym poznawczo wynikiem było również zidentyfikowanie nowych markerów, których wcześniej nie wiązano z procesem różnicowania. Wyniki tych badań zostały opracowane i udokumentowane w trzeciej publikacji.

Należy podkreślić, że opisane powyżej rezultaty badań wchodzące w skład rozprawy doktorskiej należą do znaczących i nowatorskich. Analiza całości wyników pozwoliła Doktorantce na sformułowanie poprawnych, uzasadnionych badaniami, wniosków.

Warto także dodać, że na ujęte w publikacjach badania, Doktorantka uzyskała środki przyznane przez Ministerstwo Edukacji i Nauki w ramach programu „Doktorat Wdrożeniowy”.

Jednym z elementów oceny jest zwrócenie uwagi recenzenta na braki czy nieścisłości. Muszę przyznać, że rozprawę Pani mgr Katarzyny Stefańskiej cechuje szczególna staranność w przygotowanie całości i jej edytorska poprawność. Zarówno pod względem merytorycznym jak i metodologicznym nie znajduję uchybień. Doktorantka, co należy do rzadkości, ustrzegła się całkowicie wyrażen żargonowych w polskojęzycznym opracowaniu, co sprawia, że nie mam uwag krytycznych. Proszę jednak o doprecyzowanie czy stosowane barwienia w celu potwierdzenia ścieżki różnicowania komórek macierzystych oparła Pani na danych literaturowych? Nie znalazłam bowiem w pracach oryginalnych odniesienia do stosownego piśmiennictwa. Kolejne, czysto techniczne pytanie dotyczy użycia kolagenazy. Czym uzasadnia Pani wybór kolagenazy I, a nie np. kolagenazy NB6 o czystości GMP?

Natomiast uwaga o charakterze dyskusyjnym dotyczy pierwszego wniosku. W mojej opinii jego treść nie powinna być opatrzona cyfrą 1, co oznacza wniosek nr 1, ponieważ informacje w nim zawarte pochodzą z danych literaturowych, a nie z badań własnych, tak, jak pozostałe dwa wnioski. Ten pierwszy, bardzo potrzebny w tym miejscu, potraktowałabym jedynie jako „wstęp” do wniosków.

W tym miejscu pragnę raz jeszcze podkreślić wagę artykułu przeglądowego w całości rozprawy. Opracowanie zagadnienia w oparciu o ponad 100 pozycji światowego piśmiennictwa świadczy o zgłębieniu problematyki i merytorycznym przygotowaniu do , badań, którymi Doktorantka podjęła się zająć. Ryciny w artykule przeglądowym zasługują na podkreślenie, zostały starannie wykonane i dobrze opisane, dzięki czemu stanowią cenne źródło informacji dla czytelnika.

Podsumowując, bardzo pozytywnie oceniam przedłożoną do recenzji dysertację i stwierdzam, że Pani mgr Katarzyna Stefańska w pełni zasługuje na nadanie stopnia doktora. Doktorantka nie tylko wykazała przygotowanie i umiejętność pracy nowoczesnymi technikami, ale prawidłowo je wykorzystywała. Pokazała doskonałą znajomość problematyki, a postawione w oryginalnych publikacjach cele badawcze pokazują systematyczne dążenie do rozwiązania zadania, co jest zasługą odpowiedniego przygotowania i pokierowania Doktorantki przez Promotora, prof. dr hab. Bartosza Kempistego, którego doświadczenie naukowe z zakresu badań *in vitro* jest cenione w środowisku badaczy wykorzystujących techniki izolacji komórek i ich hodowli.

Całość rozprawy pokazuje dużą wiedzę Doktorantki i umiejętność dyskusji wyników własnych. Pragnę zaznaczyć, iż Pani mgr Katarzyna Stefańska, bardzo dobrze włączyła się w nurt aktualnej i ważnej klinicznie problematyki, pracując najnowszymi technikami biologii molekularnej stosowanymi w badaniach biomedycznych, z wykorzystaniem

mm

analizy bioinformatycznej. Atutem niniejszej rozprawy jest wartość poznawcza badań, które przyczyniają się do rozpoznania i wykorzystania w przyszłości źródła komórek macierzystych jakim jest galareta Whartona.

Wniosek końcowy

W świetle powyższych danych stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Stefańskiej spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Wnoszę zatem do Kapituły Kolegium Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Stefańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na walory poznawcze badań, których wyniki zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Web of Science, wnioskuję o jej wyróżnienie w formie przewidzianej regulaminem macierzystej Uczelni.



25/1/2024

Prof. dr hab. Barbara Bilińska
członek korespondent PAN

