

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Anny Sylwii Figiel-Dąbrowskiej

„Przedtransplantacyjna optymalizacja funkcji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Sylwii Figiel-Dąbrowskiej została napisana w oparciu o wyniki badań przeprowadzonych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. n. med. Anna Sarnowska Prof. IMDiK.

Doktorantka podjęła próbę oceny bezpieczeństwa i skuteczności terapii z wykorzystaniem mezenchymalnych/zrębowych komórek macierzystych pozyskanych z tkanki tłuszczowej, w wybranych trzech schorzeniach układu nerwowego: w padaczce lekoopornej o podłożu autoimmunologicznym, stwardnieniu zanikowym bocznym oraz wtórnym uwolnieniu nerwu po uszkodzeniu i nieudanej próbie rekonstrukcji. Zastosowanie komórek macierzystych w praktyce klinicznej zostało poprzedzone szczegółowymi badaniami przedklinicznymi, pozwalającymi na ocenę i porównanie właściwości multipotencjalnych wybranych frakcji pozyskanych z tkanki tłuszczowej komórek mezenchymalnych (ASC oraz DFAT), hodowanych w różnych warunkach tlenowych. Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie ogólnego wniosku o możliwości utrzymania komórek w stanie wysokiej aktywności proliferacyjnej z zachowaniem stabilności genetycznej, co determinuje ich bezpieczne zastosowanie kliniczne.

Układ rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Sylwii Figiel – Dąbrowskiej przedstawiona została w formie liczącego 52 strony opracowania, będącego omówieniem powiązanych tematycznie sześciu artykułów naukowych, opublikowanych w okresie od 2016 do 2022r. Zbiór artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z informacją dotyczącą finansowania badań, został umieszczony na początku opracowania. Badania będące przedmiotem publikacji zostały przeprowadzone w ramach projektów naukowo-badawczych,

we współpracy z różnymi ośrodkami naukowo-badawczymi, również zagranicznymi. Doktorantka jest pierwszą autorką dwóch publikacji i współautorką w pozostałych czterech. Wszystkie publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, z wysokim współczynnikiem impact factor.

Przejrzysta forma **SPISU TREŚCI** i kolejno **WYKAZ SKRÓTÓW** (z drobnym błędem redakcyjnym), w znacznym stopniu ułatwiają czytanie pracy.

Tekst główny rozprawy jest poprzedzony **STRESZCZENIEM** w języku polskim i angielskim, zawierającym krótkie uzasadnienie wybranego tematu pracy, przedstawienie w przystępnej, syntetycznej formie całości zagadnienia, z podkreśleniem wytyczonych celów, przebiegu kolejnych etapów badań z omówieniem podstawowych zasad metodologii. Zawiera również zebranie uzyskanych wyników, oraz sformułowanie podstawowych wniosków, będących wskazaniem dla prowadzenia kolejnych badań w tym zakresie.

ORYGINALNOŚĆ ROZPRAWY rozpoczyna syntetyczny zbiór podstawowych wniosków z przeprowadzonych badań. Pozostaje pytanie o zasadność umieszczenia go w tym miejscu opracowania.

Zasadnicza część pracy obejmuje następujące rozdziały: WSTĘP, CEL PRACY, MATERIAŁY I METODY, PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW, WNIOSKI, BIBLIOGRAFIA, KOPIE PUBLIKACJI, OŚWIADCZENIA. Omówienie kolejnych rozdziałów:

1. **WSTĘP** – W podrozdziale 1.1 Autorka definiuje podstawowe pojęcia, z omówieniem różnic nomenklaturowych, niejednolitego nazewnictwa, będącego przedmiotem konsultacji zespołu ekspertów z międzynarodowych towarzystw naukowych i skutkującego zmianami w tym zakresie w kolejnych latach. Uzasadnia tym samym zastosowanie różnych określeń tych samych frakcji komórkowych w prezentowanych publikacjach. W celu uniknięcia wątpliwości dotyczących interpretacji uzyskanych wyników, w każdej pracy przedstawiono szczegółowo metodykę badań z uwzględnieniem aktualnej nomenklatury. Kolejno Autorka przedstawia rys historyczny dotyczący początków badań nad komórkami macierzystymi; omawia różne metody ich pozyskiwania, ze szczególnym uwzględnieniem tkanki tłuszczowej jako ich źródła. W tym miejscu zastosowano odnośnik do pracy Gimble i wsp z 2007r, natomiast w BIBLIOGRAFII znajduje się praca tych autorów z 2017r. Autorka szczegółowo charakteryzuje różne frakcje komórek macierzystych, zarówno niehodowane, świeżo wyizolowane jak i namnożone w warunkach *in vitro*, w oparciu o kryteria fenotypowe, profil białek powierzchniowych, oraz analizę wskaźników proliferacji, ze szczególnym uwzględnieniem metod pozyskiwania i namnażania dwóch wybranych do dalszych badań frakcji mezenchymalnych komórek zrębowych / macierzystych ASC i DFAT. Uzasadnia wybór tych frakcji w oparciu o ich właściwości oraz związane z tym potencjalne efekty kliniczne oraz stopień bezpieczeństwa podczas ich stosowania. W podrozdziale 1.2 omówiono aspekty bezpieczeństwa stosowania ASC, związane z

heterogennością tej populacji komórkowej, zależną od wielu czynników. Uzyskanie względnie jednolitej frakcji komórkowej umożliwiło zastosowanie tzw. hodowli sufitowej. Tak uzyskane komórki charakteryzują się wyższym niż typowe MSC, potencjałem do wielokierunkowego różnicowania. W tym miejscu znajduje się odnośnik do pracy Morikawa i in z 2016, a w BIBLIOGRAFII jest praca tych autorów z 2009r, oraz do pracy Niibe i in. z 2016r, a w BIBLIOGRAFII jest praca tych autorów z 2017r. Tekst jest uzupełniony schematem ilustrującym heterogenność komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. W podrozdziale 1.3 Autorka omawia wpływ warunków środowiska na właściwości hodowli komórkowej, z podkreśleniem zastosowania zbliżonego do fizjologicznego stężenia tlenu w hodowlach, co stymuluje proliferację, migrację, utrzymanie ich macierzystego charakteru. Cechy te zostały potwierdzone oceną ekspresji genów odpowiedzialnych za utrzymanie MSC w stanie macierzystym. Warunki fizjoksji stymulują komórki do szybszego wzrostu z wytwarzaniem licznych centrów proliferacyjnych. W omawianym podrozdziale wskazano odnośnik do pracy Pan i in. z 2019, natomiast w BIBLIOGRAFII jest uwzględniona praca tych autorów z 2020r. W podrozdziale 1.4 Autorka omawia właściwości terapeutyczne komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej, z wyraźnym podkreśleniem właściwości wydzielniczych, głównie cytokin, czynników wzrostu i bioaktywnych cząsteczek, zależnych od sygnałów mikrośrodowiska. Wydzielane czynniki warunkują właściwości antyapoptotyczne, proangiogenne, immunomodulacyjne, w tym przeciwzapalne, immunosupresyjne i inne. W tym miejscu zamieszczono dwukrotnie odnośnik do pracy Li, Ma i Sun z 2019, której to pracy nie ma w spisie BIBLIOGRAFIA. Podsumowaniem rozdziału jest wskazanie właściwości przeciwzapalnych, protekcyjnych i troficzych ASC w ocenie efektu klinicznego ASC w wybranych, na potrzeby prezentowanej pracy doktorskiej, chorobach układu nerwowego.

2. **CEL PRACY** – w rozdziale Doktorantka przejrzyszcie sformułowała zasadniczy cel pracy, którym była optymalizacja warunków hodowli *in vitro* mezenchymalnych komórek zrębowych/macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, zapewniająca efektywne namnożenie z jednoczesnym utrzymaniem właściwości terapeutycznych tych komórek. Autorka określiła także 5 istotnych celów szczegółowych dotyczących wybranych do dalszych badań frakcji komórek macierzystych pozyskanych z tkanki tłuszczowej: mezenchymalnych komórek zrębowych/macierzystych (ASC) otrzymywanych metodą enzymatyczną oraz odróżnicowanych komórek tłuszczowych otrzymywanych metodą tzw. hodowli sufitowej (DFAT), obejmujących:
 1. określenie wpływu różnych stężeń tlenu, fizjologicznego 5% i atmosferycznego 21%, na cechy warunkujące skuteczność i bezpieczeństwo klinicznego zastosowania ASC;
 2. charakterystykę wybranych populacji komórek macierzystych ASC i DFAT podczas hodowli *in vitro* potwierdzającą mezenchymalny charakter DFAT oraz

porównując właściwości pluripotencjalne obu wybranych frakcji komórkowych;

3. ocenę potencjału terapeutycznego ASC i DFAT, z uwzględnieniem I/ właściwości neuroprotektoryjnych w modelu hodowli skrawków hipokampa szczura czasowo pozbawionej glukozy i tlenu; II/ zdolności do neuralnego różnicowania indukowanego obecnością zdrowej lub uszkodzonej tkanki nerwowej w modelu hodowli skrawków hipokampa szczura czasowo pozbawionej glukozy i tlenu;
4. określenie profilu sekrecyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych odpowiadającego za ich immunomodulacyjne, regeneracyjne właściwości: I/ *in vitro/ex vivo* z analizą czynników wzrostowych, cytokin, chemokin w pożywkach po współhodowli ASC i DFAT ze zdrową i uszkodzoną tkanką nerwową, oraz II/ *in vivo* z analizą płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów po podaniu komórek mezenchymalnych wyizolowanych z tkanki tłuszczowej;
5. ocenę bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania ADSC/ADRC w leczeniu wybranych chorób neurologicznych: stwardnieniu zanikowym bocznym, autoimmunologicznej padaczce lekoopornej i pourazowym uszkodzeniu nerwów obwodowych;

3. **MATERIAŁ I METODY** – Autorka we wstępie ponownie wyjaśnia szereg aspektów związanych z niejednoznaczną nomenklaturą dotyczącą różnych populacji komórek macierzystych, sposobu ich pozyskiwania. Tłumaczy stosowanie różnych określeń w odniesieniu do tych samych frakcji komórkowych w kolejnych pracach, co jest związane z różnym czasem ich publikowania, w zależności od proponowanych kolejnych zmian nazewnictwa wprowadzanego przez towarzystwa naukowe ISCT, IFATS. Podkreślono również ograniczenia dotyczące stosowania komórek macierzystych, przede wszystkim ze względu na ich heterogenność, zależną od metody pozyskiwania, ale także cechy osobnicze dawcy, takie jak m.in. wiek, płeć, ogólny stan zdrowia. Badania będące przedmiotem prezentowanej pracy zostały starannie zaplanowane w oparciu o dane z dostępnych danych z literatury przedmiotu. W podrozdziałach przedstawiono szczegółowe elementy metodologii kolejnych etapów badań dotyczących: prowadzenia hodowli komórkowej (3.1), cytometrycznej analizy powierzchniowych markerów komórkowych (3.2), analizy proliferacji ASC i DFAT (3.3), oceny senencji (3.4), analizy kariotypu (3.5), oceny potencjału ASC i DFAT do tworzenia kolonii (3.6), różnicowania mezodermalnego (3.7), barwień immunocytochemicznych (3.8), hodowli organotypowej z oceną neuroprotektoryjnego działania ASC i DFAT (3.9), oceny potencjału do różnicowania w trzy listki zarodkowe (3.10), oznaczenia poziomu ekspresji wybranych genów metodą qPCR (3.11), oznaczenia wybranych czynników wydzielanych przez ASC do pożywki lub PMR (3.12) oraz analizy statystycznej (3.13).

4. **PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW** – w rozdziale zostały syntetycznie przedstawione wyniki przeprowadzonych badań, będące punktem wyjścia do sformułowania wniosków końcowych. Podczas omawiania kolejnych wyników, umieszczono wielokrotnie odnośniki do publikacji będących przedmiotem pracy doktorskiej, w których zostały one zawarte. W krótkim wstępie dotyczącym omówienia warunków tlenowych do prowadzenia hodowli, zawarto skrótowe omówienie danych z doniesień literaturowych. W tym zakresie ponownie zwraca uwagę pewna nieścisłość, związana z umieszczeniem w podrozdziale 4.1 odnośnika do pracy Drela i in z 2014r, natomiast w BIBLIOGRAFII jest praca z 2016r.

Pierwszą część badań (podrozdział 4.1) dedykowano opracowaniu optymalnych warunków tlenowych hodowli uzyskanych komórek macierzystych, umożliwiających przygotowanie pożądanej liczby komórek o oczekiwanej i potwierdzonej jakości. Podkreślono istotne znaczenie zastosowania 5% stężenia tlenu w hodowli ASC, mieszczącego się w zakresie stężeń charakterystycznych dla niszy mezenchymalnych komórek macierzystych, dla uzyskania efektywnego namnożenia materiału komórkowego, a także odpowiadającego za wolniejszy proces starzenia się i mniejsze ryzyko transformacji nowotworowej komórek. Efektem końcowym jest wyższy potencjał terapeutyczny ASC. Wyniki tej części badań zostały zebrane i przedstawione w publikacji I „**Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy**” (2016). W pracy przedstawiono bardzo szczegółowo metodologię przeprowadzanych eksperymentów, z omówieniem różnych metod izolacji komórek i warunków ich hodowli, oraz ocenę jakości uzyskanych w kolejnych pasażach komórek, z omówieniem wskaźników proliferacji i starzenia się komórek, a także ich zdolności do różnicowania. Praca zawiera bogatą dokumentację w postaci szeregu zdjęć i wykresów, w jasny sposób ilustrujących uzyskane wyniki. Publikacja jest uzupełniona bibliografią w postaci 33 aktualnych pozycji literatury przedmiotu.

Druga część badań (podrozdział 4.2) dotyczyła porównania wybranych frakcji komórek macierzystych ASC i DFAT w aspekcie ich właściwości immunomodulacyjnych, możliwości różnicowania w kierunku neuralnym oraz potencjału repopulacyjnego. Uzyskane wyniki wskazują na podobne właściwości multipotencjalne, profil białek powierzchniowych, potencjał proliferacyjny, dynamikę starzenia, właściwości klonogenne w obu frakcjach komórkowych. Natomiast w komórkach DFAT stwierdzono wyższy poziom czynników transkrypcyjnych oraz wyższą ekspresję genu związanego z procesem różnicowania ektodermalnego, sugerujących większą plastyczność z możliwością różnicowania neuralnego (podrozdział 4.3). Cechy te zostały potwierdzone w badaniach immunocytochemicznych komórek niezależnie dla obu frakcji wykorzystanych we współhodowli ze skrawkami hipokampa poddanymi czasowemu pozbawieniu tlenu i glukozy. Doktorantka wskazuje, że wzajemne oddziaływanie między komórkami macierzystymi i tkanką jest związane z właściwościami wydzielniczymi obu komponentów. W opisanym modelu eksperymentalnym zauważono również właściwości neuroprotektoryjne komórek obu

badanych frakcji, na podstawie znacząco niższego odsetka komórek martwych w rejonie CA1 hipokampa w porównaniu z kontrolą. Badania szczegółowe wykazały różnice między ASC i DFAT w odniesieniu do wydzielanych cytokin, czynników neurotroficzných (podrozdział 4.4). Uzyskane wyniki zostały bardzo szczegółowo i przejrzysto przedstawione w publikacji II **„Neurogenic and Neuroprotective Potential of Stem/Stromal Cells Derived from Adipose Tissue” (2021)**. Bogata dokumentacja fotograficzna, wykresy, zbiorcze tabele oraz schematy ilustrujące procesy eksperymentalne uzupełniają znacząco wartość pracy. Autorzy podkreślili, że do tej pory nie były publikowane wyniki analiz porównawczych właściwości neurogennych i neuroprotektoryjnych komórek ASC i DFAT, a prezentowana praca jest w tym aspekcie innowacyjną. Bibliografia obejmuje 69 pozycji aktualnego piśmiennictwa.

W podrozdziale 4.5 Autorka uzasadnia celowość wykorzystania komórek macierzystych w chorobach o podłożu autoimmunologicznym w oparciu o wyniki prowadzonych wcześniej badań, wskazujących na właściwości immunomodulujące i hamujące proces zapalny komórek.

Kolejne etapy pracy doktorskiej dotyczyły zastosowania komórek macierzystych w praktyce klinicznej w wybranych trzech schorzeniach układu nerwowego: lekoopornej padaczce ogniskowej o podłożu autoimmunologicznym, stwardnieniu zanikowym bocznym oraz uszkodzeniu nerwów obwodowych.

W publikacji III **„Intrathecal Infusion of Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells in Autoimmune Refractory Epilepsy: Evaluation of Safety and Efficacy” (2020)**, Autorka omawia efekty kliniczne obserwowane u 6 pacjentów z rozpoznaną padaczką lekooporną o potwierdzonym podłożu autoimmunologicznym, u których po nieskutecznej terapii farmakologicznej podjęto próbę zastosowania komórek macierzystych. Były one podawane dokanałowo. Uzyskano pozytywny efekt w zakresie poprawy funkcji poznawczych u wszystkich pacjentów, natomiast zmniejszenie częstości napadów, co było głównym celem terapii, uzyskano tylko w jednym przypadku w postaci całkowitego ich ustąpienia. Był to jednak przypadek szczególny w tej grupie ze względu na wcześniej zastosowane intensywne leczenie immunosupresyjne. W tym miejscu nasuwa się pytanie, w jakim czasie przed terapią komórkową prowadzono leczenie immunosupresyjne, i w jakim stopniu wpłynęło ono na efekt końcowy; czy można sugerować przedłużający się efekt działania immunosupresji, widoczny dopiero po podaniu dodatkowo komórek macierzystych. Autorka podejmuje próbę wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów takiego efektu. Z pewnością więcej pozostaje pytań niż jednoznacznych odpowiedzi w tym zakresie. U kolejnych trzech pacjentów z badanej grupy uzyskano częściową poprawę w zakresie częstości napadów, z podkreśleniem określić „łagodne i okresowe”, natomiast w dwóch przypadkach nie było żadnego efektu klinicznego w odniesieniu do napadów. Mała grupa pacjentów nie pozwala oczywiście na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Nasuwa się pytanie, czy planowane są kolejne próby kliniczne dotyczące tej grupy chorych?

Drugą grupą pacjentów poddanych terapii komórkami macierzystymi stanowili 4 chorzy z rozpoznaniem stwardnieniem zanikowym bocznym. Autorka przyjęła założenie, że oczekiwane efekty miałyby być wynikiem właściwości wydzielniczych, w zakresie czynników przeciwzapalnych, troficznych, regeneracyjnych (dwóch pacjentów, podanie dokanałowe) oraz potencjału do różnicowania neuronalnego z nadzieją na zastąpienie uszkodzonych komórek nerwowych (dwóch pacjentów, podanie dordzeniowe). Zauważalne efekty kliniczne dotyczyły zmniejszenia napięcia mięśni, co powodowało mniejsze problemy z poruszaniem się, a także mniej nasilone uczucie męczliwości; u jednego chorego obserwowano ponadto zwiększenie zakresu ruchu ramion i poprawę mowy. Efekty były widoczne tylko po podaniu dordzeniowym komórek. Autorka podjęła próbę wyjaśnienia mechanizmu działania komórek ADRC w ALS oraz, na podstawie oceny stężenia wybranych cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym, określenia czasu przeżycia komórek macierzystych. Metodyka badań, kolejne etapy eksperymentu oraz szczegółowe wyniki zostały przedstawione w publikacji IV **„Intraspinal Transplantation of the Adipose Tissue-Derived Regenerative Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis in Accordance with the Current Experts' Recommendations” Choosing Optimal Monitoring Tools” (2018)**. Ze względu na bardzo ograniczoną liczebność grupy badanej, uzyskane wyniki mogą być jedynie wstępem do dalszych badań. Podkreślone aspekty związane z bezpieczeństwem, dobrą tolerancją zastosowanej metody, mogą budzić nadzieję i uzasadniać prowadzenie dalszych badań u chorych z tą nieuleczalną, postępującą chorobą neurodegeneracyjną. Podkreślany przez Autorkę wydłużony okres przeżycia u pacjentów objętych eksperymentem wymaga, jak się wydaje, ostrożności w sformułowaniu wniosku o działaniu komórek ADRC w tym zakresie. Może warto w tym miejscu dodać dane z literatury dotyczące liczby pacjentów z dłuższym okresem przeżycia po rozpoznaniu choroby. Pracę uzupełnia bibliografia obejmująca 60 aktualnych pozycji literatury przedmiotu.

Właściwości regeneracyjne ADSC zostały wykorzystane również w kolejnym modelu eksperymentalnym u 3 pacjentów, w ramach innowacyjnej terapii wspomagającej uszkodzonych w następstwie urazu nerwów obwodowych, po nieskutecznym odtworzeniu ciągłości nerwów pośrodkowego i łokciowego. Komórki zrębowe/macierzyste były podawane mikroiniekcyjnie wzdłuż pęczków i wokół przylegających tkanek. Uzyskano stopniową poprawę czuciową i funkcjonalną u tych chorych. Wyniki ukazały się w publikacji V **„Secondary release of the peripheral nerve with autologous fat derivatives benefits for functional and sensory recovery” (2021)**. Cykl szczegółowo zaplanowanych i przeprowadzonych badań eksperymentalnych, podsumowuje praca przeglądowa VI **„Critical factors responsible for the therapeutic effect of mesenchymal stem/stromal cells in central nervous system disorders” (2022)**. Doktorantka i współautorzy przedstawili w niej przegląd danych z literatury, dotyczących poszczególnych aspektów związanych z bezpieczeństwem stosowania terapii komórkowej oraz rozpoznanych ograniczeń dotyczących możliwości

wykorzystania tej metody w praktyce klinicznej. Omówiono szczegółowo szereg elementów, takich jak metody izolacji, heterogenność frakcji komórkowych, metody hodowli/namnażania, droga podania, powtarzalność kolejnych aplikacji, mogących mieć wpływ na skuteczność efektów oraz potencjalne ryzyko objawów niepożądanych zastosowanej terapii. Na tle opublikowanych danych z badań międzynarodowych, Autorka umieściła skrótowo wyniki przeprowadzonych badań własnych będących przedmiotem recenzowanej pracy. W podsumowaniu po raz kolejny zwrócono uwagę na konieczność ostrożnego formułowania wniosków dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa stosowania różnych frakcji komórek macierzystych w praktyce klinicznej oraz podkreślono, że obecnie podstawowe cechy MSC, wpływające na efekty ich działania w określonych chorobach są związane ze stymulacją procesów regeneracji, głównie w następstwie działania aktywnie wydzielanych czynników z grupy cytokin, czynników wzrostu i szeregu innych. Mechanizm działania MSC, który nie budzi wątpliwości, jest związany z właściwościami adjuwantowymi. Pozostałe mechanizmy wciąż wymagają dalszych badań.

WNIOSKI - w rozdziale uwzględniono syntetycznie ujęte wnioski, odpowiadające postawionym we wstępie celom. Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na sformułowanie pięciu zasadniczych wniosków:

1. Fizjologiczne (5%) stężenie tlenu w hodowli komórek mezenchymalnych izolowanych z tkanki tłuszczowej warunkuje ich efektywne namnażanie w warunkach in vitro oraz utrzymanie w hodowli cech młodych fenotypowo komórek;
 2. Analizowane frakcje komórek (ASC i DFAT) posiadają mezenchymalne i multipotencjalne właściwości, oraz spełniają kryteria umożliwiające ich zastosowanie w praktyce klinicznej;
 3. Obie frakcje komórek (ASC i DFAT) wykazują potencjał terapeutyczny w oparciu o właściwości neuroprotektoryjne i repopulacyjne;
 4. Mechanizmy odpowiedzialne za terapeutyczny potencjał DFAT i ASC/ADSC/ADRC są związane z immunomodulacyjnymi/regeneracyjnymi właściwościami wydzielanych czynników: wzrostowych (BDNF, EGF, FGF), przeciwzapalnych (TNF-alfa, IL-1beta, i INF-gamma) i wzrostowych/remodelujących (bFGF, MMP-9);
 5. Zastosowanie ADSC/ADRC w wybranych chorobach neurologicznych i pourazowym uszkodzeniu nerwów obwodowych jest bezpieczne i wymiennie skuteczne;
5. **BIBLIOGRAFIA** – opracowanie jest uzupełnione o listę 54 pozycji aktualnej literatury przedmiotu, obejmującą prace publikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Ma przejrzysty układ, w kolejności alfabetycznej. Zwracają uwagę pewne nieścisłości, które zostały już wcześniej wypunktowane podczas omawiania rozdziałów WSTĘP i

PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW. Ponadto w zestawieniu publikacji są umieszczone prace: Sarnowska A i wsp. z 2009 oraz Yamashita i wsp. z 2021r, których nie uwzględniono w tekście rozprawy.

6. **KOPIE PUBLIKACJI** – w rozdziale dołączono kopie sześciu publikacji będących przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej. W publikacji trzeciej, omyłkowo wklejono dodatkowo strony 4-5 przed stronami 2-3, co chwilowo mogło utrudnić płynne czytanie pracy. Publikacje składające się na przedstawiony cykl, są bardzo dobrze i starannie przygotowane, zawierają przejrzystą, właściwie dobraną do prezentowania określonego typu wyników dokumentację graficzną, w tym dokumentację fotograficzną, szereg schematów, wykresów, tabel znacząco podnoszących wartość przedstawionych prac. Cały materiał graficzny został wyczerpująco opisany, a większość wyników została dokładnie przeanalizowana statystycznie.
7. **OŚWIADCZENIA** – w rozdziale umieszczono oświadczenia współautorów publikowanych prac ze szczegółowym określeniem zakresu wkładu indywidualnego w ich powstanie oraz wyrażeniem zgody na wykorzystanie w przewodzie doktorskim mgr Anny Sylwii Figiel-Dąbrowskiej. Umieszczono także zakres udziału klinicystów związany z opieką, przeprowadzaniem procedur oraz analizą badań diagnostycznych u pacjentów uczestniczących w eksperymentach.

We wszystkich publikacjach, składających się na cykl będący podstawą rozprawy, Doktorantka, zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, miała znaczący udział w ich tworzeniu, na każdym etapie badań doświadczalnych i klinicznych. Wskazuje to na bardzo dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, świadczy o zaangażowaniu i samodzielności Autorki, ale również umiejętności współpracy zespołowej. Wszystkie prezentowane prace powstały dzięki zaangażowaniu wielu specjalistów, naukowców będących współautorami publikacji. W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że Doktorantka jest współautorką łącznie 11 prac naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach, o łącznym IF 50,494, MEN 930, wielokrotnie cytowanych.

PODSUMOWANIE

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Sylwii Figiel – Dąbrowskiej jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje bardzo duża syntetyczność, systematyczność wynikające z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Przejrzysty sposób ujęcia wyników przeprowadzonych badań eksperymentalnych wskazuje na zasadność i konsekwencję w zaplanowaniu i realizacji kolejnych etapów prac badawczych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwym osiągnięciem jest bardzo aktualny, ważny w codziennej praktyce klinicznej temat pracy, z którego wynikały założone cele, główny i uzupełniające. Uzyskane wyniki

pozwoły na sformułowanie odpowiadających celom wniosków. Mogą one i powinny być wstępem do kontynuowania pracy w oparciu o zastosowanie komórek macierzystych w kolejnych grupach pacjentów. Wysoka jakość opublikowanych prac będących podstawą rozprawy doktorskiej wskazuje, że Doktorantka doskonale opanowała techniki mikrobiologiczne, biochemiczne, molekularne i inne, których zastosowanie pozwoliło na pełne wywiązanie się z zadań, jakie zostały postawione w celach pracy.

Recenzowana praca napisana została w sposób wskazujący na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, dążenie do rozwiązywania problemów, umiejętność interpretacji wyników, ich syntetycznego przedstawienia oraz wnikliwą, twórczą dyskusję. Doktorantka wykazuje rozsądny dystans do uzyskanych pozytywnych wyników przeprowadzonych badań. Postawione cele i hipotezy badawcze były konsekwentnie realizowane w podjętych eksperymentach badawczych. Dobór literatury jest odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w badanej tematyce i umiejętności korzystania ze źródeł literaturowych. Doktorantka potrafi krytycznie analizować i umiejętnie interpretować wyniki wykonanych eksperymentów, przeprowadzić dyskusję w oparciu o dane z cytowanego piśmiennictwa oraz poprawnie formułować wnioski.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej nasuwają się też pewne uwagi i pytania:

1. Wykazano, że istnieje konieczność kolejnych podań komórek w celu utrzymania efektu terapeutycznego w odstępie czasowym nie dłuższym niż 3 miesiące – czy w związku z tym byłoby uzasadnione kontynuowanie terapii komórkami macierzystymi w takim schemacie przez dłuższy? Jak długi czas? Na ile efekt osiągnięty po 3 podaniach można uznać za wystarczający, utrwalony?
2. Warto byłoby uzupełnić informacje dotyczące prób zastosowania komórek macierzystych w innych jednostkach klinicznych, z uwzględnieniem publikowanych wyników. W jakim zakresie klinicznym podejmowano próby zastosowania komórek macierzystych. Jakie inne grupy pacjentów mogłyby być brane pod uwagę w celu zastosowania terapii komórkami macierzystymi.
3. W rozdziale BIBLIOGRAFIA uwzględnione publikacje są zebrane w kolejności alfabetycznej nazwiska pierwszego autora; wydaje się, że dodatkowo numeracja pozycji literatury ułatwiłaby z nich korzystanie.
4. Drobne uwagi w postaci krótkich komentarzy/sugestii/pytań zostały zawarte bezpośrednio w omówieniu rozprawy.

Powyższe uwagi, mają charakter marginalny i nie umniejszają zupełnie wartości rozprawy. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Sylwii Figiel – Dąbrowskiej wskazuje na posiadanie przez Autorkę szczegółowej wiedzy teoretycznej w wybranej dyscyplinie naukowej, potwierdza umiejętność i przygotowanie Doktorantki do dalszej samodzielnej pracy naukowej.

OCENA KOŃCOWA

Uważam, że recenzowana praca Pani mgr Anny Sylwii Figiel – Dąbrowskiej „Przedtransplantacyjna optymalizacja funkcji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w celu zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego”, spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z obowiązującą ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r., poz 882, 1311, z 2017r. poz. 859).

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Anny Sylwii Figiel - Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy Autorki wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Sylwii Figiel - Dąbrowskiej stosowną nagrodą.

dr n.med. Ewa Nagańska

