

## **Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych**

**pani mgr Wioletty Lech**

**pt: "Ocena właściwości neuroprotektoryjnych i regeneracyjnych komórek WJ-MSC w warunkach kontrolnych i modelach uszkodzenia OUN *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*"**

**wykonanej pod kierunkiem pani prof. dr hab. med. Leonory Bużańskiej**

Rozprawa doktorska zawarta jest na 201 stronach formatu A4, napisana jest w klasycznym układzie podziału na "wstęp", "opis hipotezy badawczej", "cele pracy", rozdziałów "materiał", "metody badań", "wyniki", "dyskusja", "podsumowanie" i "wnioski". Wykaz zastosowanych w tekście skrótów, streszczenie w językach polskim i angielskim oraz uzasadnienie innowacyjności rozprawy umieszczono na samym początku (przed wstępem, co ułatwia zrozumienie kolejnych rozdziałów. Rozprawę kończy wykaz bibliografii zawierający 190 aktualnych pozycji piśmiennictwa uszeregowanych w kolejności alfabetycznej.

Obszarem zainteresowań doktorantki jest medycyna regeneracyjna, a w szczególności poszukiwanie nowych metod terapii komórkowych. Badała ona efekty tzw. mezenchymalnych komórek macierzystych (w tym przypadku pozyskiwanych z galarety Whartona sznura pępowinowego), zwanych też mezenchymalnymi komórkami zrębu (Mesenchymal Stem/Stromal Cell). Mają one zdolność zarówno do regulacji lokalnej naprawy tkanek, jak też różnicowania się w wybrane tkanki. Komórki te wielokrotnie badane były (włącznie z badaniami klinicznymi) w aspekcie neuroprotekcji i wspomaganie regeneracji struktur OUN (stwardnienie zanikowe boczne, stwardnienie rozsiane, udary mózgu), jednym z wiodących ośrodków badawczych w skali światowej w tej dziedzinie jest macierzysty Instytut doktorantki. Innowacyjnym podejściem naukowym doktorantki jest wprowadzenie elementu potencjalnie zwiększającego terapeutyczny efekt MSC w udarach mózgu w postaci "prekondycjonowania" MSC poprzez ich hodowlę *in vitro* w środowisku obniżonego ciśnienia parcjalnego tlenu (5% składu mieszaniny gazowej, ciśnienie atmosferyczne). Na pochwałę zasługuje nazwanie przez doktorantkę obniżonego (w porównaniu do składu atmosfery) odsetkowego stężenia tlenu "fizjologiczną normoksją" a nie, jak to z reguły piszą wszyscy "hipoksją". Innymi elementami nowatorstwa pracy są: hodowla MSC w hydrożelowych skafoldach z białek ludzkiego osocza w układzie 3D oraz rozszerzenie oceny o efekty badane poza okolicą uszkodzenia, jakimi były zmiany składu płynu mózgowo-rdzeniowego. W podsumowaniu wartości naukowej autorka pisze: "W niniejszej rozprawie dowiedziono, że dzięki zastosowaniu określonych warunków biomimetycznych do hodowli i późniejszej transplantacji WJ-MSC (stała fizjologiczna

normoksja, skafoldy hydrożelowe), otrzymano komórki o najkorzystniejszym profilu neuroprotekcijnym i przeciwzapalnym. Odpowiednie przygotowanie *in vitro* komórek macierzystych przed przeszczepem ma kluczowe znaczenie dla opracowania nowych, skutecznych rozwiązań w medycynie regeneracyjnej. Jest to szczególnie istotne w związku ze zwiększającym się zapotrzebowaniem społecznym leczenia chorób OUN o niskim wskaźniku sukcesu terapeutycznego".

Autorka dysponuje dużą wiedzą w zakresie tematyki badawczej i potrafi ją umiejętnie przekazać czytelnikom. Przypuszczam, że nawet czytelnik odległy zainteresowaniami od tematyki medycyny regeneracyjnej bez trudu przyswoi sobie informacje przekazane zarówno w obszernym wstępie, jak też w bardziej specjalistycznych opisach wyników pracy doświadczalnej. Zarówno obszerny opis przedmiotu badań, zawarty we wstępie, jak pozostałe rozdziały pracy są adekwatnie wsparte aktualnymi danymi bibliograficznymi.

Mam formalno-edytorskie zastrzeżenie do rozdziału zatytułowanego "Cele pracy". Zajmuje on półtorej strony tekstu, z czego pierwsze 36% to powtórzenie wstępu, ostatnie 53% to metody/dyskusja, a definicja celu zajmuje jedynie środkowe 11% rozdziału.

Rozdziały opisujące materiał i metody wykorzystane w badaniach są bardzo szczegółowe i bez trudu umożliwią czytelnikowi powtórzenie każdego etapu pracy doświadczalnej. W badaniach zastosowano obszerny, kompletny i bardzo nowoczesny panel metod badawczych, nie byłbym w stanie niczego dodać do repertuaru metodycznego. Opisy metodyczne są uzupełnione czytelnymi i estetycznymi schematami, dodatkowo ułatwiającymi zrozumienie i interpretację warsztatu metodycznego. Z drobnych uwag - założenie, że stężenie procentowe tlenu we frakcji gazowej inkubatorów do hodowli komórek wynosi 21% jest równie powszechne, jak błędne (jest ono obniżone na skutek rutynowego dodawania CO<sub>2</sub> do mieszaniny gazowej, z moich doświadczeń nie przekracza 18%). Dokładniejsze wyniki można uzyskać stosując urządzenia mierzące tlen (stężenie wagowe lub procentowe) bezpośrednio w hodowlach komórkowych.

Opis wyników zajął autorce 64 strony tekstu, obfitującego w zestawienia, ryciny i tabele zawierające potężną ilość danych doświadczalnych. Ta obfitość analizowanych obserwacji, pozyskanych przy zastosowaniu pełnego panelu metod (od morfologii, cytokinetyki przez biochemię, immunochemię do analizy molekularnej) świadczy o świetnym przygotowaniu warsztatowym doktorantki, doskonałej umiejętności doboru narzędzi badawczych, ale również jej niesamowitej pracowitości. Analiza wyników i wysnucie z nich właściwych wniosków była przy tej obfitości wyzwaniem, któremu doktorantka w pełni sprostała.

Dyskusja stanowi komentarz i interpretację wyników kolejnych zagadnień składających się na sprawdzenie tez naukowej doktorantki. Autorka interpretuje prawidłowo wyniki badań, pozostawiając miejsce na krótkie podsumowania w kolejnym rozdziale właśnie tak zatytułowanym ("Podsumowanie"). W sumie "Dyskusja" i "Podsumowanie" wzajemnie się uzupełniają i mogłyby stanowić jeden rozdział.

Autorka sformułowała 9 wniosków, z których dwa pierwsze i ostatni nie są wnioskami, a obserwacjami. Proponuję ograniczyć liczbę wniosków poprzez przeniesienie obserwacji do działu "Wyniki" (one tam już właściwie są) i scalenie pozostałych w mniejszą ich liczbę, (wnioski 3, 4, 6 i częściowo 8 dotyczą warsztatu komórkowego, wniosek 5 i 7 terapeutycznej interakcji MSC z uszkodzoną tkanką mózgu).

Praca jest bardzo dobrze opracowana edytorsko, przy znikomej ilości błędów literowych itp. drobiazgów, które i tak będą wymagały przeredagowania pod kątem języka i wymogów edytorskich czasopisma (czasopism) w których wyniki będą publikowane. Praca doktorska zasługuje na wyróżnienie zarówno za walory merytoryczne (innowacyjność projektu, planowanie i realizacja badań, interpretacje wyników), jak świetny warsztat edytorski. Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie planować i realizować skomplikowane, nowatorskie projekty badawcze oraz interpretować i publikować ich wyniki i spełnia wszelkie wymogi uwarunkowane prawem oraz dobrą tradycją naukową, niezbędne dla uzyskania stopnia doktora nauk medycznych w oparciu o przedstawioną dysertację. Drobne uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Wioletty Lech spełnia wymagania Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) "o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki".

Z prawdziwą satysfakcją składam na ręce Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN wniosek o dopuszczenie doktorantki, pani mgr Wioletty Lech, do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Warszawa, 30 sierpnia 2022 r.

KIEROWNIK  
Zakładu Medycyny Regeneracyjnej  
  
prof. dr hab. n. med. Zygmunt Pojda

**Zakład Medycyny Regeneracyjnej**  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zygmunt Pojda

Warszawa, 30 sierpnia 2022 r.

**Rada Naukowa**  
**Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN**  
**im. M. Mossakowskiego**

Zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Wioletty Lech pt. "Ocena właściwości neuroprotektoryjnych i regeneracyjnych komórek WJ-MSC w warunkach kontrolnych i modelach uszkodzenia OUN *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*", przygotowanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. med. Leonory Bużańskiej.

Projekt, będący przedmiotem rozprawy doktorskiej, jest nowatorski i mieści się w zakresie wiodących badań z dziedziny medycyny regeneracyjnej i inżynierii komórkowej. Doktorantka badała możliwości indukowania mechanizmów neuroprotektoryjnych i stymulowania lokalnej regeneracji ośrodkowego układu nerwowego szczura po doświadczalnym udarze mózgu. Istotnymi elementami nowatorskimi w pracach autorki są: zastosowanie autorskiej metody prekondycjonowania komórek (MSC) z wykorzystaniem opracowanego przez siebie nowego składu ich mikrośrodowiska w układzie 3D *in vitro*, oraz stymulacja komórek efektorowych poprzez ich wstępną hodowlę *in vitro* w środowisku o obniżonym stężeniu tlenu.

Praca jest, jak na doktorat, wyjątkowo obszerna, jej metodologia uwzględnia cały dostępny panel metod badawczych. Doktorantka wykazała, że potrafi stworzyć koncepcję nowoczesnego projektu badawczego w oparciu o swoją wiedzę i pomysły oraz rzetelną znajomość problemu badawczego, zrealizować badania, właściwie zinterpretować uzyskane wyniki i przedstawić je w postaci publikacji naukowej. Część doktoratu została już przez doktorantkę opublikowana, pozostałe dane są pewnym materiałem na kolejną (co najmniej jedną) publikację w wysoko impaktowanym czasopiśmie naukowym.

Z wyrazami poważania  
KIEROWNIK  
Zakładu Medycyny Regeneracyjnej  
prof. dr hab. n. med. Zygmunt Pojda

(recenzent)