

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: Kamil Rafał Wartalski.....

Tytuł rozprawy doktorskiej: Domniemane komórki macierzyste izolowane z jajnika niedojrzałej płciowo świni - ich charakterystyka oraz ocena możliwości transformacji nowotworowej

Promotor: dr hab. Małgorzata Duda.....

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany):.....

Recenzent: Prof. dr hab. n. med. Barbara Gawrońska-Kozak.....

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Proces rozwoju/wzrostu organizmu, ciągła wymiana komórek w trakcie życia osobniczego, procesy naprawcze uszkodzonych tkanek i organów, ale także procesy patologiczne związane z nowotworzeniem są ściśle połączone z obecnością komórek macierzystych. Pomimo bardzo intensywnych i szeroko zakrojonych badań wykazujących obecność komórek macierzystych we wszystkich narządach ich identyfikacja, lokalizacja tkankowa a przede wszystkim molekularne podstawy ich funkcji fizjologicznych a także transformacji do nowotworowych komórek macierzystych pozostają niezdefiniowane. W tym kontekście przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Kamila Wartalskiego wpisuje się w nurt badań nad komórkami macierzystymi jajnika oraz ich potencjalnym udziałem w nowotworzeniu. Jakkolwiek izolacja oraz analiza różnicowalności PSCs (ang: putative stem cells; domniemane komórki macierzyste) jajnika była badana przez inne grupy naukowe to oryginalność zawartych w rozprawie badań dotyczy przede wszystkim potencjalnego udziału PSCs w transformacji nowotworowej. Na szczególną uwagę zasługuje nowatorski aspekt badań dotyczący udziału steroidów anabolicznych w transformacji nowotworowej PSCs jajnika do CSCs (ang: cancer stem cells; nowotworowe komórki macierzyste). Pomimo postępu medycyny, zastosowaniu precyzyjnych technik chirurgicznych i nowoczesnych leków cytostatycznych, wyniki leczenia są nadal niezadowolające, a rak jajnika jest jedną z głównych przyczyn zgonów u kobiet chorujących na nowotworowy. W tym aspekcie przedstawiona praca doktorska nie tylko skupia się na badaniach podstawowych w obszarze biologii komórek macierzystych, ale również bada potencjalny udział steroidów anabolicznych w procesie nowotworzenia co w przyszłości może przełożyć się na dalszą drogę kariery naukowej Doktoranta.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Przedstawiona praca doktorska zachowuje typowy dla rozpraw doktorskich układ. Wstęp, podzielony na podrozdziały, w sposób bardzo jasny, czytelny i informatywny przedstawia podłoże prezentowanej pracy doktorskiej w aspekcie: komórek macierzystych, komórek macierzystych jajnika, w tym macierzystych komórek nowotworowych, roli androgenów w żeńskim układzie rozrodczym oraz związków hormonalnie czynnych (steroidy anaboliczne), które podawane jako substancje dopingowe, ale również spożywane w mięsie z hodowli przemysłowych, mogą zwiększać ryzyko nowotworzenia. Ponadto uzasadnia również wybór świni jako modelu badawczego.

Hipotezy, cele i zadania badawcze, stanowią jeden, bardzo rozbudowany rozdział.

Materiały i metody, w sposób bardzo dokładny i wyczerpujący zostały opisane procedury eksperymentalne zastosowane w pracy.

Wyniki, zaprezentowane zgodnie z postawionymi zadaniami badawczymi, zostały zobrazowane w postaci 34 tablic, na które składają się: fotografie z mikroskopu świetlnego (obrazowanie hodowli komórkowych) i fluorescencyjnego (obrazowanie wyników reakcji immunohistologicznych), wyniki analiz ekspresji genów oraz białek, analizy aktywności kanałów jonowych patch clamp, oraz obraz modelowania 3D w kontekście tworzenia naczyń.

Dyskusja, podzielona na trzy główne podrozdziały odpowiadające postawionym na wstępie pracy trzem hipotezom stanowi 19-stronicową część pracy, w której Doktorant krytycznie i ostrożnie ocenia uzyskane wyniki na tle danych literaturowych. Ostatni podrozdział dyskusji stanowi podsumowanie.

Wnioski sformułowane w postaci czterech punktów w sposób adekwatny do uzyskanych wyników przedstawiają osiągnięcia pracy doktorskiej.

Rozprawę kończy *Streszczenie* pracy przedstawione zarówno w języku polskim jak i angielskim oraz bibliografia obejmująca wyczerpującą liczbę 256 pozycji literatury.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Wstęp pracy rozpoczyna się wprowadzeniem zawierającym logicznie usystematyzowany tok narracji odpowiadający przebiegowi badań. Następujące podrozdziały wstępu wprowadzają w tematykę badawczą, umożliwiając zapoznanie się z danymi literaturowymi w prezentownym obszarze.

Hipotezy, cele i zadania badawcze zostały jasno sformułowane i stanowią jeden stosunkowo rozbudowany rozdział. Doktorant w sposób wyczerpujący i skrupulatny opisuje metody badawcze, które zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych zadań.

Wyniki zaprezentowano w usystematyzowany sposób. Wyizolowane z kory jajnika dwie populacje PSCs: SSEA-4- i CD34-pozytywnych komórek zostały scharakteryzowane fenotypowo. Doktorant przeprowadził analizę ekspresji markerów pluripotencjalności i multipotencjalności tych komórek na poziomie ekspresji wybranych genów i białek. Wynik każdej z prezentowanych analiz został zinterpretowany indywidualnie, a następnie zbiorczo (analiza ekspresji markerów na poziomie genów i białek), co pozwoliło Doktorantowi na krytyczne ustosunkowanie się do uzyskanych wyników i prawidłowy wybór jednej populacji komórek PSCs jajnika, komórek SSEA-4- pozytywnych, do dalszych badań. Analizy różnicowości komórek SSEA-4- pozytywnych do komórek układu nerwowego i komórek śródbłonna zostały przeprowadzone w sposób wyczerpujący z zastosowaniem typowych metod jak analizy genów i białek markerowych oraz metod specyficznych. W przypadku różnicowości do komórek nerwowych Doktorant zastosował metodę patch clamp umożliwiającą analizę czynności kanałów jonowych i powstałych prądów generowanych przez zróżnicowane komórki. Komórki zróżnicowane do komórek śródbłonna były analizowane w teście migracji w obecności chemoatraktantu oraz specyficznym dla nich teście tworzenia naczyń. Wyniki zostały zinterpretowane w sposób prawidłowy. W drugiej części pracy przeanalizowany został wpływ steroidów anabolicznych na potencjalną zmianę fenotypu PSCs w kierunku fenotypu CSCs. Logicznie następujące analizy od sprawdzenia obecności i lokalizacji receptora AR (ang. androgen receptor; receptor androgenowy) w komórkach, poprzez analizę ekspresji markerowych genów i białek dla transformacji komórek w CSCs pozwoliły na właściwą i rygorystyczną interpretację wyników. Doktorant podkreślił, iż uzyskane wyniki wskazują na możliwość zwiększenia ekspresji markerów CSCs w stymulowanych steroidami anabolicznymi komórek jajnika, co jednakże nie oznacza ich transformacji nowotworowej.

W 19-sto stronicowym rozdziale *Dyskusja* Doktorant krytycznie i ostrożnie ocenia uzyskane wyniki na tle danych literaturowych. Na uwagę zasługuje umiejętność interpretacji wyników własnych w porównaniu do wyników dostępnych w szeroko cytowanej przez Doktoranta literaturze przedmiotu a uzyskanych na innych, czasem bardzo odległych modelach zwierzęcych. Ponadto dobór piśmiennictwa zarówno w obszarze komórek macierzystych jak i wpływu steroidów anabolicznych oraz umiejętność powiązania ich z wynikami własnymi i na tej podstawie wysnutymi wnioskami świadczy o pracowitości, skrupulatności i dojrzałości Doktoranta. Wnioski zostały sformułowane w sposób jasny, poprawny i krytyczny.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Przedstawiona praca doktorska liczy 187 stron i zachowuje typowy dla rozpraw doktorskich układ. Rozprawa rozpoczyna się wykazem wybranych skrótów i akronimów. Wstęp liczy 27 stron i zawiera 7 rysunków. Hipotezy, cele i zadania badawcze pracy stanowią 4 strony, a następujący bezpośrednio po nich rozdział Materiały i metody obejmuje 52 strony i zawiera 3 rysunki oraz 7 tabel. Rozdział Wyniki liczy 49 stron, na których umieszczono 34 tablice. Dyskusja obejmuje 19 stron, po której następują wnioski stanowiące 1 stronę. W rozprawie umieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim. Zamykająca rozprawę bibliografia ujęta jest na 28 stronach i obejmuje 256 pozycji piśmiennictwa. Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszelkie wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

4. Uwagi krytyczne

Wstęp

- a). Pomimo bardzo dobrze napisanego wstępu po każdym rozdziale (a przynajmniej po tych rozdziałach, które bezpośrednio dotyczą pracy doktorskiej) brakuje naprowadzenia czytelnika na potrzebę przeprowadzenia badań ujętych w pracy doktorskiej i wskazanie, że takich badań nie ma w dostępnej literaturze. Wówczas przejście od wstępu do rozdziału Hipotezy, cele i zadania badawcze byłoby bardziej płynne i jednoznacznie uzasadniało postawienie tych właśnie hipotez.
- b). Odkrycie komórek macierzystych i nadanie im nazwy „stem cells” jest przypisywane badaczom rosyjskim: Alexandrowi Maximov i jego następcy Alexandrowi Friedenstein. Nazwa stem cells została wprowadzona przez Aleksandra Maximov w 1908 roku.
- c). Doktorant charakteryzując komórki macierzyste ze względu na ich lokalizację tkankową powołuje się na prace kontynuatorów, a nie odkrywców. Myślę, że w pracy doktorskiej jako pierwszej pracy na drodze naukowej wskazane jest odwołanie się do pierwszych odkrywców zjawiska (w tym przypadku np. komórek macierzystych tkanki tłuszczowej czy komórek macierzystych skóry), a następnie cytowanie badaczy, którzy te badania kontynuowali.
I tak na przykład pierwsza praca dotycząca komórek macierzystych tkanki tłuszczowej została opublikowana w 2001 roku:
Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.
Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH
Tissue Eng. 2001 Apr; 7(2):211-28.
Podobnie wykazanie obecności markera CD44 w komórkach MSCs było stwierdzone dużo wcześniej niż w roku 2012.
- d). Kontrowersyjne jest stwierdzenie, że „Przytoczone ograniczenia uniemożliwiają hodowlę ASCs na dużą skalę i powszechne zastosowanie”. Jakkolwiek brak specyficznych markerów komórek macierzystych uniemożliwia ich jednoznaczną identyfikację to zastosowanie np. komórek ASCs jest ogromne i w obecnej pandemii otyłości dostęp do nich oraz łatwość hodowli pozwalają na hodowlę

na dużą skalę. Ponadto coroczne, odbywające się od 2003 roku konferencje IFATS (International Federation of Adipose Therapeutics and Science), w których uczestniczą zarówno naukowcy jak i lekarze stosujący ASCs w terapiach, świadczy o skali zjawiska.

Hipotezy, cele i zadania badawcze.

Doktorant w swojej pracy postanowił zweryfikować trzy hipotezy badawcze. Hipoteza pierwsza zakłada występowanie w jajnikach niedojrzałych płciowo loszek komórek PSCs o charakterze mezenchymalnym, co generalnie wskazuje na ich możliwość różnicowania się do linii pochodzenia mezodermalnego: miocytów, adipocytów, chondrocytów, osteocytów. Jednocześnie hipoteza druga zaprzecza w pewien sposób hipotezie pierwszej zakładając, iż PSCs różnicują się do komórek pochodzenia ektodermalnego (neurony) czyli są zdolne do przekroczenia bariery swojego pochodzenia (mezodermalnego) lub też stanowią mieszaninę komórek macierzystych. Uważam, że byłoby wskazane ograniczenie hipotezy pierwszej do: „W jajniku niedojrzałych płciowo świń występują multipotencjalne PSCs”. Ponadto tak postawiona hipoteza w pewien sposób uzasadnia brak podjęcia przez Doktoranta zbadania różnicowości PSCs to typowych linii mezodermalnych. Hipoteza trzecia jest samodzielną i bardzo dobrze postawioną hipotezą.

Cele i zadania badawcze stanowią jeden bardzo rozbudowany rozdział. Uważam, że następujący po każdym zadaniu badawczym bardzo obszerny opis stosowanych metod należałoby umiejscowić w rozdziale Materiały i Metody.

Wyniki:

- a). Obszernie i bardzo szczegółowo opisane wyniki można by przedstawić w formie bardziej skondensowanej, ułatwiającej porównania pomiędzy populacjami komórek, a ekspresją badanych w nich markerów np. Tabele X, XI i XII powinny być zestawione w jednej tabeli. Podobnie tabele XVIII, XIX i XX, a także tabele XXIV i XXV oraz tabele XXXIII i XXXIV.
- b). Zastanawiające jest dlaczego Doktorant w swoich badaniach jako kontroli pozytywnej dla obecności markerów pluripotencji użył: „kory jajnika stanowiącej rodzaj kontroli pozytywnej”, a nie zastosował oczywistej kontroli pozytywnej „porcine ovarian embryonic stem cells obtained from the foetal - 50 days post coitum ovaries; oESCs”, która została już przez Doktoranta użyta w opublikowanej pracy: Wartalski et al., 2016.
- c). Wydaje się również dyskusyjnym zastosowanie skóry jako kontroli negatywnej tłumacząc to faktem obecności w skórze przede wszystkim komórek zróżnicowanych. Myślę, że duża grupa naukowców między innymi: Elaine Fuchs, Fiona Watt, Justyna Drukała nie zgodziłyby się z Doktorantem. Ponadto wyszukiwarka PUBMED pod hasłem „skin stem cells” przynosi ponad 10 tysięcy publikacji.
- d). Dezorientującym jest umieszczenie dwóch tablic: VIII i IX, które wydają się przynajmniej w części przedstawiać te same wyniki.
- e). Tablica XVI zawiera stwierdzenie iż: „kontrolę pozytywną dla nestyny, jaką stanowił lizat komórek, który ją zawierał”. Właściwym byłoby podanie jakie są to komórki.
- f). Celowym również byłoby zastosowanie dodatkowych analiz na przykład cytometrii przepływowej, która pozwoliłaby nie tylko na dodatkową charakterystykę PSCs ale także na oszacowanie czystości/jednorodności populacji komórek wyizolowanych metodą nanokulek magnetycznych.

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Rozprawę doktorską autorstwa Pana mgr Kamila Wartalskiego oceniam pozytywnie zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Na szczególne podkreślenie zasługuje systematyczna, logiczna i krytyczna analiza uzyskanych wyników oraz konstruktywne wnioski. Uzyskane wyniki stanowią wartościowy dorobek uzyskany przez Doktoranta. Uwagę zwracają przede wszystkim wyniki dotyczące potencjalnego udziału steroidów anabolicznych w transformacji nowotworowej PSCs jajnika. Mogą one wskazywać na początek ciekawej drogi badawczej Doktoranta.

Pytania i wątpliwości oraz sugestie, które postawiłam w niniejszej recenzji w żadnym stopniu nie wpływają na pozytywną ocenę całej pracy, a mogą zostać jak sądzę zweryfikowane w kolejnych badaniach Doktoranta.

Przedstawiona mi do oceny praca autorstwa Pana mgr Kamila Wartalskiego spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

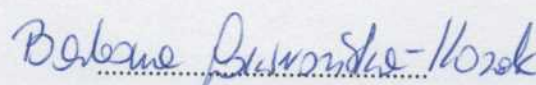
Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Pana mgr Kamila Rafała Wartalskiego** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Pana mgr Kamila Rafała Wartalskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK

Ja, niżej podpisany wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

NIE

.5.06.2019.....
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta

INFORMACJE DLA RECENZENTA:

1. Informacja o wymogach Rady jednostki dotycząca konstrukcji rozprawy doktorskiej [link do strony: http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty](http://www.wb.uj.edu.pl/stopnie-tytuly/doktoraty)
2. Po obronie rozprawy doktorskiej Komisja doktorska przedstawia Radzie jednostki organizacyjnej przeprowadzającej przewód doktorski ocenę publicznej obrony oraz projekt uchwały w sprawie nadania kandydatowi stopnia doktora.

3. Proszę o przesłanie elektronicznej wersji recenzji na adres:

wydzial.biologii@uj.edu.pl

Równocześnie proszę przesłać podpisany oryginał recenzji na adres:

**Dziekanat Wydziału Biologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków**