

prof. dr hab. Anita Franczak
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Ocena rozprawy doktorskiej Pana mgr. Kamila Rafała Wartalskiego pt. "Domniemane komórki macierzyste izolowane z jajnika niedojrzalej płciowo świni - ich charakterystyka oraz ocena możliwości transformacji nowotworowej"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Rafała Wartalskiego została wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem Pani dr hab. Małgorzaty Dudy, prof. UJ. Przeprowadzone badania zrealizowano w ramach Grantu Preludium 11 nr UMO-2016/21/N/NZ9/01205, którego Doktorant był kierownikiem oraz Grantu OPUS 5 nr UMO-2013/09/B/NZ9/00226, kierowanego przez Promotora i trzech grantów DSC, przeznaczonych na zadania służące rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UJ. Doktorant był kierownikiem tych grantów.

W ostatnich latach udowodniono, że w jajniku dorosłych samic występują tzw. dorosłe, domniemane komórki macierzyste (PSC). W warunkach fizjologicznych komórki te mogą służyć do regeneracji narządu a także mieć zdolność do różnicowania się w różne linie komórkowe. Jednakże, w warunkach patologicznych, mogą wykazywać tendencję do niekontrolowanego wzrostu, przyczyniając się do rozwoju nowotworów. Odkrycie takich komórek w jajniku dorosłej samicy, który jeszcze do niedawna był uważany za narząd składający się z komórek już w pełni zróżnicowanych, uzasadnia potrzebę prowadzenia badań w celu poznania rzeczywistego potencjału tych komórek, Skłania to również do poszukiwania metod izolacji i hodowli *in vitro* takich komórek w celu ewentualnego, ale przede wszystkim bezpiecznego ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Wykonane, w ramach ocenianej rozprawy, badania są również próbą zmierzenia się z wciąż niejasną i nieujednoliconą charakterystyką fenotypową populacji komórek macierzystych, określanych jako domniemane komórki macierzyste, pochodzące z jajników niedojrzałych płciowo loszek. Biorąc pod uwagę powyższe dane, należy uznać, że podjęty w ramach rozprawy doktorskiej temat jest bardzo interesujący.

Głównym celem rozprawy było zbadanie czy w jajniku niedojrzałych płciowo loszek występują multipotencjalne, domniemane komórki macierzyste, mające zdolność do różnicowania się *in vitro* w komórki układu nerwowego i komórki śródbłonna naczyń, ale

mogące również podlegać transformacji nowotworowej w obecności steroidów anabolicznych. W celu weryfikacji postawionych hipotez Doktorant podjął się realizacji dwóch głównych zadań badawczych. W zadaniu pierwszym, w celu przeprowadzenia charakterystyki PSCs, wyizolowanych z kory jajnika niedojrzałych płciowo świń, Doktorant dokonał analizy ekspresji markerów pluripotencji i multipotencji, w tym markerów charakterystycznych dla mezenchymalnych komórek macierzystych. Badał również plastyczność uzyskanych komórek PSCs i wykazał możliwość ich różnicowania w komórki układu nerwowego i komórki śródbłónka naczyń. Stwierdzam, że Doktorant prawidłowo i klarownie uzasadnił celowość podjętych badań oraz wybrał właściwe metody badawcze, które pozwoliły na zweryfikowanie postawionych hipotez.

Rozprawa składa się z rozdziałów charakterystycznych dla tego typu prac. We Wstępie rozprawy Doktorant zawarł przekonujące dane i przesłanki, które skłoniły Autora do podjęcia badań. Dokonał też przeglądu piśmiennictwa, dotyczącego aktualnego stanu wiedzy, obejmującego charakterystykę komórek macierzystych oraz metody ich pozyskiwania, opisał markery pluripotencji i multipotencji dorosłych komórek macierzystych jajnika i nowotworowych komórek macierzystych, a także możliwości różnicowania domniemanych komórek macierzystych w komórki układu nerwowego i komórki śródbłónka. W rozdziale tym Autor przedstawił także wiedzę o roli androgenów w układzie rozrodczym samicy oraz dane o możliwych konsekwencjach działania związków endokrynnie aktywnych i steroidów anabolicznych. Substancje takie mogą zaburzać prawidłowe procesy fizjologiczne w organizmie i przyczyniać się do wystąpienia zmian nowotworowych. Wstęp pracy dowodzi, iż Doktorant dobrze opanował umiejętność dokonywania selekcji oraz analizy wiedzy z zakresu badanych problemów.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant skrupulatnie przedstawił wykorzystywane metody badawcze. Dokonał precyzyjnych opisów wykonanych czynności laboratoryjnych i dodatkowo przedstawił schematy, które obrazują przeprowadzone procedury. Opisy stosowanych przez Autora metod pozwalają na ich wierne odtworzenie. Jednakże zauważyłam w tej części rozprawy kilka nieścisłości, np. str. 68 podrozdz. 3.4.6. Detekcja (czego?), błonę (jaką?) inkubowano w odczynniku (jakim?) lub np. opis podrozdziału 3.4.7., str. 69 – „Usuwanie związanych z błoną przeciwciał”.

Rozdział Wyniki, na podkreślenie zasługuje klarowny i rzetelny opis uzyskanych wyników. Rozdział Dyskusja, jest napisany w logiczny sposób, umożliwiający czytelnikowi ustosunkowanie się do uzyskanych przez Autora wyników. Układ Dyskusji, która składa się z podrozdziałów, odzwierciedlających kolejne cele badawcze i zadania badawcze, znacznie ułatwia śledzenie poruszanych zagadnień. Uwzględnione są tutaj interesujące rozważania, dotyczące wszystkich cech komórek macierzystych, badanych przez Doktoranta. Autor dokonał wyczerpującej analizy fenotypu PSCs izolowanych z kory jajnika, w tym ich morfologii podczas hodowli *in vitro*, występowania markerów pluripotencji i multipotencji, różnicowania PSCs w kierunku komórek układu nerwowego, a następnie w kierunku komórek śródbłónka naczyń, wpływu steroidów anabolicznych na zmianę fenotypu PSCs i obecności receptora androgenowego w PSCs, a także wpływu steroidów anabolicznych na

prolifrację PSCs i ich fenotyp. Końcowym rozdziałem dysertacji jest Podsumowanie uzyskanych wyników oraz Wnioski. W ocenianej rozprawie Autor przedstawił również Streszczenie, w języku polskim i angielskim oraz Bibliografię, na którą złożyło się 256 pozycji piśmiennictwa.

Przeprowadzone eksperymenty wymagały od Doktoranta ogromnego nakładu pracy. Jak wspomniano, na podkreślenie zasługuje fakt, iż wszystkie zastosowane w badaniach metody opisano precyzyjnie i prawidłowo, a Doktorant zapewnił stosowne kontrole prowadzonych analiz. Można by jednak uwzględnić uzasadnienie dla zastosowanej metody izolacji komórek z wykorzystaniem trawienia enzymatycznego. Proszę zatem o ustosunkowanie się do ewentualnego problemu związanego z przeżywalnością komórek po zastosowaniu metody ich izolacji z kory jajnika za pomocą trawienia enzymatycznego, a także przeżywalności komórek podczas długotrwałej, trwającej 14 dni, hodowli *in vitro*. Czy zatem rozważono zastosowanie innej metody izolacji komórek, np. metody *fragment seeding*, która nie wymaga stosowania enzymów?

Charakterystyka fenotypowa uzyskanych komórek PSC SSEA-4+ wykazała ekspresję markerów multipotencjalnych, mezenchymalnych komórek macierzystych i brak specyficznej ekspresji kluczowych markerów pluripotencji. W badaniach wykorzystano jajniki pochodzące od niedojrzałych płciowo samic, u których występuje bardzo duża rezerwa jajnikowa (pęcherzykowa), warunkująca ogromny i tak naprawdę, nigdy w życiu osobniczym samicy po osiągnięciu dojrzałości płciowej, nie wykorzystany potencjał rozrodczy. Oczywiście wiadomo, że wraz z wiekiem samicy rezerwa jajnikowa znacznie maleje, co skutkuje obniżeniem potencjału rozrodczego starszych samic. Wykazano również odwrotną zależność między wiekiem kobiety, a ekspresją genów kodujących syntezę markerów pluripotencji i markerów mezenchymalnych komórek macierzystych, a także potencjałem do dyferencjacji tych komórek. Można zatem założyć, że jajniki samic młodych są lepszym źródłem komórek macierzystych. Czy jednak można by również założyć, że jajniki samic tuż po osiągnięciu dojrzałości płciowej byłyby lepszym, bogatszym a przede wszystkim bezpieczniejszym źródłem komórek macierzystych wykazujących wyższy potencjał do dyferencjacji niż komórki wyizolowane z jajników samic niedojrzałych płciowo? Warto również rozważyć, czy i w jaki sposób, w opinii Doktoranta, obecność w hodowli *in vitro* oocytów, np. dojrzałych lub podczas wznawiania przez nie mejozy, może determinować fenotyp i zdolność do dyferencjacji komórek PSC występujących w jajniku? Wykazano przecież, że oocyty ssaków mają fascynującą zdolność do przeprogramowywania komórek, w tym również komórek somatycznych. Czy zatem współhodowla komórek PSC z oocytami nie pozwoliłaby na "odkrycie" rzeczywistych możliwości tych komórek? Proszę Doktoranta o wyrażenie własnej opinii na ten temat i ustosunkowanie się do powyższych rozważań.

Wysoko oceniam interpretację wyników własnych, dotyczących wpływu steroidów anabolicznych, o potencjalnym działaniu rakotwórczym, na fenotyp PSCs. Doktorant wykazał, że boldenon i nandrolon zwiększają ekspresję CD44 i CD133 w PSCs, które bardzo łatwo różnicują się w śródbłonek naczyń. To bardzo interesujące odkrycie wskazuje na potencjalną rolę badanych komórek w inicjowaniu rozwoju naczyń krwionośnych, również podczas

procesu nowotworzenia w jajniku. Zważywszy, że PSCs posiadają AR, a więc mają zdolność do reakcji na działanie androgenów - czy i w jaki sposób inne produkowane w jajniku i macicy endogenne hormony steroidowe, głównie np. estrogeny i progesteron, mogą warunkować fenotyp i właściwości badanych komórek? Czy komórki PSCs izolowane od samic dojrzałych płciowo, np. tuż po osiągnięciu przez nie dojrzałości płciowej, nie wykazywałyby większej zdolności do bezpiecznego różnicowania się?

Przedstawiona do oceny praca jest bardzo interesująca nie tylko z powodu dużej aktualności podjętej tematyki dotyczącej zagadnień związanych z potencjalnym zastosowaniem komórek macierzystych, określanych jako domniemane komórki macierzyste (PSCs), ale również z powodu wykazania, że pod wpływem steroidów anabolicznych komórki te mogą być kierowane na drogę kancerogenezy. W rozprawie stawiane są pytania i otwierane są nowe możliwości poszukiwania komórek, które mogłyby różnicować się w wiele typów innych komórek, pozwalając na ich bezpieczne wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej. Doktorant wykazał się dobrym przygotowaniem do interpretacji uzyskanych wyników oraz umiejętnością prowadzenia rzeczowej dyskusji. Dyskusja jest inspirująca, wielowątkowa i ciekawa z powodu trafnych spostrzeżeń i bogactwa odniesień do najnowszej literatury. Tę część pracy oceniam wysoko. Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dostarczyła wielu interesujących danych. Wprawdzie Doktorant nie uniknął drobnych błędów i niedociągnięć, jednak zważywszy na rodzaj i zakres przeprowadzonych badań, które świadczą o ogromnym wkładzie pracy Doktoranta - należy je usprawiedliwić.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. "Domniemane komórki macierzyste izolowane z jajnika niedojrzałej płciowo świni - ich charakterystyka oraz ocena możliwości transformacji nowotworowej" autorstwa Pana mgr. Kamila Rafała Wartalskiego spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Kamila Rafała Wartalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Proszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy stosowaną nagrodą.



prof. dr hab. Anita Franczak

Olsztyn, dnia 03 czerwca 2019 r.