

Łódź, dnia 13 listopada 2022r.

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych**

**mgr Marleny Tyneckiej**

**pt: „Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy”**

**wykonanej w**

**Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji**

**Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku**

**pod kierunkiem dr hab. n. med. Andrzeja Eljaszewicza**

Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych. Pomimo uznanych metod terapeutycznych opartych o leki wziewne, a od niedawna leki biologicznymi o właściwościach przeciwcytokinowych, na świecie prowadzone są liczne prace nad opracowaniem nowoczesnych metod leczenia astmy opartych o inne mechanizmy. Mając na uwadze informacje dostępne w literaturze przedmiotu, mgr Marlena Tynecka postanowiła ocenić potencjał ludzkich, mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w ograniczaniu zapalenia w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego.

**Ocena struktury i zawartości merytorycznej dysertacji**

Przedstawiona do oceny rozprawa ma typowy układ i jest niezwykle starannie przygotowanym maszynopisem liczącym 114 stron, uzupełnionym o załączniki: publikacje – jedną pogładową i jedną oryginalną – stanowiące podstawę dysertacji, oświadczenia o wkładzie autorów, niepublikowane dane włączone do rozprawy doktorskiej, uchwałę komisji bioetycznych obejmujących zgody na przeprowadzenia badań oraz oświadczenie o wdrożeniowości prowadzonych badań.

We *Wstępie* Doktorantka dokonuje zwięzłej charakterystyki mezenchymalnych komórek macierzystych ze szczególnym zwróceniem uwagi na mechanizmy ich immunomodulującego działania oraz potencjału ich wykorzystania w regulacji zapalenia dolnych dróg oddechowych w astmie. Tym samym doktorantka przygotowuje doskonały grunt pod zrozumienie licznych aspektów dotyczących komórek macierzystych ujętych w publikacji przeglądowej załączonej do dysertacji pt.: *Tynecka M, et al. Old Friends with Unexploited Perspectives: Current Advances in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies in Asthma. Stem Cell Rev Rep. 2021 Aug;17(4):1323-1342. doi: 10.1007/s12015-021-10137-7*. Ponadto uzasadnia w nim przyjęte założenia i cele pracy przedstawione w kolejnym rozdziale. *Cele* są sformułowane w sposób logiczny i spójny zgodnie z założeniami pracy.

W kolejnym rozdziale *Materiał i metody* Doktorantka z ogromną pieczołowitością opisuje wszystkie metody badawcze zastosowane w badaniach. Należy podkreślić, że do realizacji celów Doktorantka zastosowała podadprzeciętną liczbę metod począwszy od izolacji i hodowli komórek macierzystych w warunkach *in vitro* wraz z indukcją i późniejszą oceną ich właściwości supresyjnych, poprzez zastosowanie modeli mysich astmy oskrzelowej, skończywszy na analizie transkryptomicznej materiału tkankowego. Znajomość tak szerokiego wachlarza metod świadczy o wszechstronności i swobodzie metodologicznej Doktorantki i jej doskonałym przygotowaniu do realizacji postawionych zadań badawczych. Umiejętność analizy i interpretacji uzyskanych za pomocą tych metod wyników wskazuje na niezwykle dynamiczny rozwój naukowy Doktorantki, jaki nastąpił podczas realizacji badań i bogate doświadczenie, które zapewne zaprocentuje w najbliższej przyszłości.

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka zarysowuje uzyskane wyniki, a dokładnej analizy dokonuje w publikacji oryginalnej załączonej do dysertacji pt.: *Tynecka M, et al. The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung. Front Immunol. 2022 Sep 16;13:967487. doi: 10.3389/fimmu.2022.967487. eCollection 2022*. Potwierdza w niej umiejętność pozyskiwania komórek MSC z ludzkiej tkanki tłuszczowej na podstawie oceny ich fenotypu i multipotencjalności. Następnie wykazuje, że podanie ludzkich MSC myszom nie indukuje ostrego stanu zapalnego w drogach oddechowych. Obserwuje jedynie przejściowy wzrost odsetka komórek T CD3+CD4+ produkujących IFN- $\gamma$ . Wyniki badań transkryptomicznych materiału z płuc zwierząt wykazują dodatkowo aktywację genów związanych z procesami oksydacyjnymi, aktywacją makrofagów i receptorów rozpoznających wzorce (PRR). Według Doktorantki uzyskane wyniki wspierają hipotezę „umierającej komórki macierzystej” zaproponowanej przez Thum T. Podsumowując, w przedstawionej publikacji

Doktorantka potwierdziła bezpieczeństwo podawania myszom ludzkich komórek MSC. Wyniki zostały zanalizowane za pomocą właściwie dobranych metod statystycznych.

Dysertacja uzupełniona została o obszerny rozdział *Nieopublikowane dane włączone do rozprawy doktorskiej* zawierający liczne dane nieopublikowane. Staną się one zapewne podstawą kolejnej publikacji, będącej niejako rozwinięciem dotychczas przedstawionych wyników. W tym rozdziale Doktorantka potwierdza immunosupresyjne właściwości MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej w warunkach *in vitro* oraz efekty przenosowego podania MSC w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego. Rozdział bogaty jest w oryginalne wyniki dotyczące wpływu podania MSC w modelu astmy na wyznaczniki zapalenia w drogach oddechowych, ekspresję licznych cytokin zapalnych i genów oraz regulację szlaków sygnałowych.

*Dyskusję* podsumowującą zawarte w dysertacji wyniki przeprowadziła Doktorantka zwięźle na 6 stronach maszynopisu w sposób krytyczny, z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa liczącego 117 pozycji. Dyskusja została przeprowadzona w sposób wielowątkowy, jednakże bardzo przejrzysty, co pokazuje ogromny zasób wiedzy Doktorantki oraz umiejętność właściwego doboru argumentów i danych literaturowych, jak również wskazuje na zrozumienie przez Doktorantkę złożonych i trudnych kwestii dotyczących modulacji zapalenia w drogach oddechowych w przebiegu astmy oskrzelowej w modelu zwierzęcym tej choroby.

Należy podkreślić, że rozdziały opisowe opracowania komponują się doskonale z publikacjami włączonymi do dysertacji. Doktorantka świadomie zawiera w nich tylko te informacje, które są niezbędne do zrozumienia pracy pogładowej i oryginalnej. Świadczy to o dużej dojrzałości i świadomości Doktorantki w przygotowaniu odpowiedniej struktury dysertacji, jak i poruszania się w materii merytorycznej

## **Uwagi**

Proszę o odniesienie się Doktorantki do kilku następujących kwestii:

1. Myszom podawano komórki MSC pochodzące od człowieka, zatem można mówić o formie przeszczepu ksenogenicznego. Czy zaobserwowano u myszy przejawy aktywacji mechanizmów immunologicznych skierowanych wobec ekspozycji na antygenowo obce, ludzkie komórki MSC?
2. Na podstawie wzrostu liczby komórek T produkujących IFN- $\gamma$  wyciągnięto wniosek, że podanie MSC może wywoływać „zapalenie o niskim nasileniu” - czy zbadano poziomy

cytokin typowych dla rozwoju „low grade inflammation” takich, jak IL-6, IL-8 czy IL-1 w celu potwierdzenia tezy, że podanie MSC myszom może indukować „zapalenie o niskim nasileniu”?

3. Z czego wynika arbitralny podział na efekt krótkoterminowy MSC obejmujący okres 3 dni *versus* efekt długoterminowy obejmujący 9 dni po podaniu komórek?
4. Podanie MSC myszom z wyindukowaną astmą ekspozycją na ekstrakt roztocza kurzu domowego spowodowało wzrost stężenia IL-5 w modelu krótkoterminowym bez wpływu na ekspresję innych badanych cytokin. Niniejszy wątek powinien zostać skomentowany, tym bardziej, że IL-5 jest jedną z głównych cytokin zapalenia T2-zależnego obserwowanego immunopatologii astmy (str 78, wykres C).

## **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi rzetelne, wartościowe, oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe aspektów dotyczących wpływu podania komórek macierzystych człowieka na wyznaczniki zapalenia myszom zdrowym, jak również myszom z wyindukowaną astmą za pomocą ekstraktu kurzu domowego. Doktorantka podjęła się niezwykle ambitnego zadania - prawidłowo zaplanowała pracę, uzasadniła podstawę merytoryczną prowadzonych badań, właściwie sformułowała i zrealizowała cele badawcze, a z uzyskanych wyników wyciągnęła szereg interesujących wniosków.

Przedstawioną do oceny dysertację charakteryzuje konsekwencja przyczynowo-skutkowa struktury - począwszy od opisanie wyizolowanych ludzkich MSC, poprzez ocenę bezpieczeństwa podania MSC, ich właściwości immunosupresyjnych oraz skutków dla zapalenia w drogach oddechowych na modelu zdrowych myszy, kończąc na próbie zastosowania terapeutycznego w modelu myszy z astmą oskrzelową. Dysertacja jest wzorcowym przykładem podejścia koncepcyjnego do wybranego problemu naukowego. Istotną wartością rozprawy jest to, że jest ona jednym z pierwszych opracowań dotyczących obranej do badań tematyki. Praca wnosi bardzo duży wkład w dotychczasową wiedzę w badanym zakresie.

Dlatego uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.).

Niniejszym przedkładam Wysokiemu Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Marleny Tyneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoką wartość dysertacji, potencjalne znaczenie aplikacyjne uzyskanych wyników, zastosowanie nowoczesnych metod badawczych i wykonanie dogłębnej, krytycznej analizy nakreślonego tematu, zwracam się do Wysokiego Senatu o uznanie rozprawy doktorskiej mgr Marleny Tyneckiej za wyróżniającą.

Dr hab. n med. Maciej Chałubiński