



UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

Zakład Genetyki Klinicznej Katedry Genetyki Medycznej

ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

tel./fax. 81 448 61 10; email: janusz.kocki@umlub.pl

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

Lublin, dnia 19. 02. 2022 r.

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**pt. „Optymalizacja procedur wytwarzania preparatów
mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej
dla potrzeb regeneracji kostno-chrzęstnych ubytków stawów”**

mgr Agnieszki Szkaradek

z Zakładu Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie we współpracy z Jagiellońskim Centrum

Innowacji Sp. z o. o. w Krakowie

W odpowiedzi na prośbę prof. dra hab. Andrzeja Kozika, Przewodniczącego Rady Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, przedstawiam recenzję rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szkaradek.

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie we współpracy z Jagiellońskim Centrum Innowacji Sp. z o. o. w Krakowie pod kierunkiem promotora rozprawy prof. dr hab. Ewy Zuby-Surmy oraz promotora pomocniczego dr Anny Łabędź-Masłowskiej.

Praca została zrealizowana w ramach projektu pt.: „Opracowanie zoptymalizowanych metod leczenia uszkodzeń tkankowych w oparciu o innowacyjne kompozyty oraz mezenchymalne komórki macierzyste i ich pochodne u pacjentów z chorobami cywilizacyjnymi” (BioMiStem) kierowanego przez prof. dr hab. Ewę Zubę-Surmę, finansowanego ze środków programu strategicznego Strategmed III przez NCBiR

(Strategmed3/303570/7/NCBR/2017) oraz I edycji programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt. „doktorat wdrożeniowy”, którego celem jest wdrażanie wyników prowadzonej działalności naukowej doktoranta do przedsiębiorstwa. Przedsiębiorca biorący udział w programie to Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o. o. w Krakowie a opiekunem ze strony Firmy był dr Łukasz Kutrzeba.

Rozprawa doktorska jest napisana poprawnie w języku polskim i jest przedstawiona w formie wydruku komputerowego. Rozprawa liczy 238 stron, jest podzielona na następujące rozdziały - typowe dla tego rodzaju opracowań: *Wykaz skrótów* str. 6 - 9, *Streszczenie* str. 10 - 13, *Streszczenie w języku angielskim* str. 14 - 16, *Wstęp* str. 17 - 50, *Cele pracy* str. 51 - 52, *Materiały i metody* str. 53 - 97, *Wyniki* str. 98 - 171, *Dyskusja* str. 172 - 200, *Podsumowanie wyników i wnioski końcowe* str. 201 - 202, *Spis piśmiennictwa* str. 203 - 231 i *Załączniki* str. 232 - 238.

Na podkreślenie zasługuje bardzo czytelne opracowanie *Wykazu skrótów* z poprawnymi tłumaczeniami polskimi, co znacznie ułatwia czytanie manuskryptu.

Umieszczenie kopii formalnych załączników na końcu pracy potwierdza prawne podstawy prowadzenia badań w wysokich standardach laboratoryjnych i klinicznych, zgodnych ze stosownymi systemami jakości – co jest wysoką i unikalną wartością Tej rozprawy doktorskiej.

Podjęty przez Doktorantkę temat rozprawy doktorskiej jest bardzo ważny klinicznie w rozwijającej się dziedzinie medycyny regeneracyjnej w Polsce i na świecie. Jest to również ważny temat społeczny – szeroko dyskutowany w różnych gremiach i promowany w kampaniach społecznych w kontekście rozbudzanych nadziei na wyleczenie pacjentów przewlekle chorych. *Europejska Agencja Leków* z dużą ostrożnością podchodzi do stosowania niesprawdzonych terapii komórkowych, stanowiących wręcz zagrożenie dla pacjentów. Różne zespoły eksperckie przestrzegają również przed stosowaniem niepotwierdzonych rzetelnymi badaniami przedklinicznymi i klinicznymi zabiegów z wykorzystaniem komórek macierzystych. Promocja komercyjnych zabiegów o nieustalonym bezpieczeństwie może narazić pacjentów na nieprzewidywalne powikłania i dalsze koszty leczenia. Terapie komórkowe o niepotwierdzonej skuteczności mogą podważać zaufanie społeczne wprowadzania innowacyjnych metod leczenia. W tym kontekście, na podkreślenie zasługuje

odważne podjęcie tematu rozprawy doktorskiej, a co najważniejsze, zaplanowanie realizacji badań wg najwyższych standardów badań naukowych i klinicznych.

Doktorantka podjęła się trudnego zadania wykonania badań w celu optymalizacji procedur izolacji oraz ekspansji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej z uwzględnieniem zasad *Dobrej Praktyki Wytwarzania* (GMP), w celu dalszego przygotowania klinicznych preparatów komórkowych dla regeneracji chrzęstnych ubytków stawów u pacjentów - preparatów będących produktami leczniczymi wg ustawodawstwa polskiego i Unii Europejskiej. Doktorantka postawiła sobie również cel zbadania wpływu natywnych i modyfikowanych podłoży grafenowych jako rusztowań do chrzęstno- i kościotwórczego różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (hAT-MSCs), co miało służyć weryfikacji hipotezy, że hAT-MSCs w połączeniu z wybranymi podłożami grafenowymi wykazują zwiększony potencjał chondrogeny i tym samym promują procesy regeneracji uszkodzeń chrzęstno-kostnych. Wyniki badań miały posłużyć do potencjalnego wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Szczegółowe cele pracy zostały przedstawione na str. 51-52.

We wstępie Doktorantka szeroko opisała definicję, klasyfikację i właściwości komórek macierzystych; przedstawiła przegląd biomateriałów stosowanych w inżynierii tkankowej w regeneracji, zastosowanie terapii komórkowych w medycynie regeneracyjnej oraz znaczenie zasad *Dobrej Praktyki Wytwarzania* w projektowaniu i wytwarzania produktu leczniczego terapii zaawansowanej. Na pokreślenie zasługuje szczegółowa wiedza Doktorantki w zakresie wymogów prawodawstwa polskiego i Unii Europejskiej do wdrożenia produktu leczniczego dla zastosowań klinicznych, w tym opracowanie stosownych procedur walidacyjnych, formularzy i instrukcji w ramach *Systemu Zapewnienia Jakości*, przygotowania dokumentacji wg wymogów *Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek* oraz przygotowania dokumentacji do *Głównego Inspektora Farmaceutycznego*.

We wstępie zostały umieszczone liczne kolorowe schematy, ilustracje i tabele – doskonale podsumowujące aktualny stan wiedzy i bardzo dobrze wprowadzające czytelnika w metodykę badawczą.

Dzięki dobrze zaplanowanym procedurom operacyjnym, Doktorantka przeprowadziła walidację procesu wytwarzania produktu leczniczego terapii zaawansowanej – wyjątku szpitalnego (ATMP-HE), zawierającego hAT-MSCs. Doktorantka przedstawiła stosowną

zgodę GIF i wcześniejsze specjalne pozwolenie Ministerstwa Zdrowia na gromadzenie, przechowywanie oraz dopuszczenie do obiegu podskórnej tkanki tłuszczowej. Badania prowadzono w laboratorium pracującym zgodnie z wymogami GMP we współpracy z firmą JCI w Krakowie.

Materiałem badawczym były aspiraty ludzkiej tkanki tłuszczowej i ludzkiego płynu stawowego, pobrane na podstawie protokołów zaakceptowanych przez komisję bioetyczną. W pracy opracowano i wykorzystano podłoża pokryte tlenkiem grafenu i użyto materiałów i odczynników certyfikowanych do zastosowań klinicznych. Wykonywane były również badania na szczurach, na które uzyskano zgodę komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach. Wszystkie etapy badań zostały przeprowadzone wg standardów GMP

Doktorantka zastosowała w rozprawie doktorskiej liczne metody analiz komórkowych i molekularnych, dzięki którym opracowała i zoptymalizowała protokół wytwarzania preparatów komórkowych w warunkach GMP, dokonała oceny fenotypu i właściwości biologicznych hAT-MSCs hodowanych w warunkach GMP, przeanalizowała skład wybranych czynników w płynie stawowym, dokonała oceny wpływu wybranych podłoży grafenowych na właściwości biologiczne hAT-MSCs w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Wyniki badań zostały opracowane wg obowiązujących metod statystycznych. Stwierdzam, że projekt rozprawy doktorskiej został właściwie zaplanowany a właściwy dobór metod badawczych pozwolił na bardzo dobrą realizację założeń pracy. Świadczy też o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań naukowych na bardzo wysokim poziomie.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka bardzo dobrze udokumentowała wyniki swoich badań w sposób przystępny dla czytelnika. Doktorantka na każdym etapie prac badawczych wykonywała wiele procedur walidacyjnych, które przełożyły się na praktyczne wskazówki, np. zdecydowano, aby nie włączać kroku związanego lizą RBC do protokołu izolacji frakcji SVF. Wyniki badań są bogato ilustrowane licznymi fotografiami, wykresami i tabelami. Należy podkreślić doskonałą i bardzo rzadko spotykaną jakością fotografii komórek wykonanych za pomocą kamery mikroskopowej. Szczególnie podkreślam otrzymaną wysoką jakością wyników w obszarach: badań oceny aktywności chemotaktycznej hAT-MSCs, analiz morfologicznych hAT-MSCs hodowanych na podłożach modyfikowanych tlenkiem grafenu, analiz morfologicznych różnicowania chondrogenego i osteogenego hAT-MSCs na różnych podłożach *in vitro*, oceny zmian ekspresji genów na poziomie transkryptów oraz oceny potencjału proregeneracyjnego hAT-MSCs różnicowanych na wyselekcjonowanych

podłożach grafenowych w modelu uszkodzenia chrząstki stawu kolanowego *in vivo* u szczurów.

Szczegółowy, wieloetapowy i skomplikowany plan pracy oraz jego doskonałe wykonanie umożliwiło opracowanie zoptymalizowanych protokołów wytwarzania preparatów hAT-MSCs, z uwzględnieniem wymagań GMP dla produktów ATMP-HE. Bardzo wysoko oceniam oryginalność planu badań, oryginalność zastosowanych metod badawczych i trud pracy włożony w ich wykonanie.

Uważam również, że przedstawiona dyskusja wyników badań w kontekście doniesień literaturowych jest wysokim osiągnięciem Doktorantki.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała wnioski i osiągnięcia, które przedstawiła na str. 201-202. Stwierdzam, że wszystkie założenia badań zostały w pełni wykonane.

Doktorantka przedstawiła 311 pozycji piśmiennictwa, które są dobrze dobrane w kontekście tematyki pracy.

Autorka nie uniknęła kilku drobnych błędów edytorskich jak np. niezręczne określenie „układ chrzęstno-kostny” (powinno być: układ ruchu czy układ kostno-stawowo-mięśniowy a fizjologicznie narząd ruchu), „niepożądany” (str. 232) - prawidłowo napisane na str. 8; Przedstawione powyżej moje uwagi, jako recenzenta, nie zmniejszają w żaden sposób wartości pracy.

W podsumowaniu podkreślam, że Doktorantka zrealizowała badania zgodnie z wytyczonymi celami, z zastosowaniem właściwych metod badawczych, a uzyskane wyniki poprawnie zinterpretowała na podstawie wykonanych analiz i danych literaturowych.

Rozprawa jest znaczącym osiągnięciem Doktorantki i Jej Promotora wraz z Promotorem Pomocniczym i ponadstandardowo spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej *Ustawie* (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) została przygotowywana pod opieką promotora i stanowi oryginalne rozwiązanie przez Autorkę problemu naukowego. Doktorantka wykazała dużą, ogólną wiedzę teoretyczną w określonej dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter badań, staranność i dbałość w przygotowaniu manuskryptu rozprawy oraz potencjalne znaczenie dla przyszłych praktycznych aplikacji klinicznych, rozprawę oceniam pozytywnie i bardzo wysoko, stawiając wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Agnieszki Szkaradek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Rozprawa doktorska została napisana jako doktorat wdrożeniowy w ramach I edycji programu MNiSW po uzyskaniu stosownych recenzji. Przygotowanie tego typu rozprawy doktorskiej daje szansę doktorantce na zatrudnienie Jej jako najlepszego specjalisty z danej branży, usprawnia działanie przedsiębiorstwa, które zyskuje przewagę rynkową przez prowadzenie z uczelnią prac B+R. Należy podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia podwójne wysokie standardy: klasycznej rozprawy doktorskiej oraz doktoratu wdrożeniowego. Mogła być zrealizowana tylko dzięki unikalnym i bardzo wysokim kwalifikacjom Ośrodka kierowanego przez Promotora, Panią prof. dr hab. Ewę Zubę-Surmę.

Biorąc pod uwagę powyższe podsumowanie, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Szkaradek pt. „Optymalizacja procedur wytwarzania preparatów mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej dla potrzeb regeneracji kostno-chrzęstnych ubytków stawów”



Janusz Kocki

Prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki