



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt

Szczecin, 25 maja 2023 roku

Dr hab. inż. Agnieszka Herosimczyk, prof. ZUT
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Kamili Bujko

**pt. „Rola receptorów P2X w procesach zasiedlania szpiku kostnego oraz
farmakologicznej mobilizacji komórek macierzystych”**

Podstawą formalną przygotowania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 19 kwietnia 2023 roku.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska Pani mgr Kamili Bujko została wykonana w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Instytucie Komórek Macierzystych (Stem Cell Institute) w James Graham Brown Cancer Center Uniwersytetu w Louisville (University of Louisville) pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Kuci.

Przedłożona do recenzji dysertacja została przedstawiona w formie jednolitej, liczącej 136 stron monografii, podzielonej na rozdziały i podrozdziały. Jej układ redakcyjny obejmuje kolejno: Spis treści (strony 5-6), Spis rycin i tabel (strony 7-8), Wykaz stosowanych skrótów (strony 9-11), Streszczenia w języku polskim (strony 13-14) oraz angielskim (strony 15-16), Wstęp (strony 17- 45), który można potraktować jako „Przegląd piśmiennictwa”, Cel pracy (strona 46), Materiał i metody (strony 47-56), Wyniki (strony 57-87), Dyskusja (strony 88-102), Podsumowanie (strony 103-104), Wnioski (strona 105) oraz Piśmiennictwo (strony 106-131). Pracę doktorską dopełnia załącznik w postaci kopii zgód Komisji Etycznych do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (strony 132-136). Rozprawa zawiera bogate piśmiennictwo

(w sumie 276 pozycji literatury), 31 rycin oraz 2 tabele, które swoją poglądowością niewątpliwie uatrakcyjnają lekturę tekstu. Warto również zaznaczyć, że została ona napisana jasnym i czytelnym językiem naukowym, który ułatwia zrozumienie omawianych zagadnień. Stronę formalną pracy oceniam jako prawidłową, odpowiadającą wymogom stawianymi rozprawom doktorskim.

Ocena merytoryczna pracy

1. Oryginalność tematyki pracy i wartość poznawcza

Należy podkreślić, że tematyka, którą zaproponowała Doktorantka w swojej pracy, jest bardzo ambitna i znakomicie wpisuje się w ugruntowane zagadnienia naukowe jej macierzystej jednostki. Podjęte badania są bowiem próbą zmierzenia się z niezwykle istotnym zagadnieniem związanym z oceną udziału wybranych receptorów purynergicznych (P2X1 oraz P2X4) w procesie farmakologicznej mobilizacji krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) oraz określeniem ich roli w procesach zasiedlania szpiku oraz rekonstytucji hematologicznej po ich przeszczepieniu. W moim przekonaniu, Pani mgr Kamila Bujko dokonała trafnego wyboru problemu badawczego. Jednocześnie sposób jego rozwiązania jest interesujący i nowatorski, a uzyskane na tej drodze wyniki badań wnoszą istotne wartości merytoryczne zarówno pod względem poznawczym, metodycznym, jak i empirycznym do dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

2. Uzasadnienie podjętych badań

Uzasadnienie wyboru przedmiotu badań i problemu badawczego zostało przedstawione w rozdziale „Wstęp”. Ta część dysertacji liczy 29 stron i została dodatkowo podzielona na trzy główne podrozdziały, co pozwoliło na przejrzyste przedstawienie zawartych w nim informacji. Autorka w sposób wnikliwy dokonała charakterystyki występujących zależności między krwiotwórczymi komórkami macierzystymi (KKM) a mikrośrodowiskiem nisz szpikowych oraz procesów wpływających na regulację ich proliferacji, różnicowania i migracji, jak również mechanizmów mobilizacji KKM i wszczepiania do szpiku kostnego. Doktorantka w obszerny sposób omówiła również zagadnienia związane z rolą nukleotydów purynowych w szeroko pojętej regulacji procesu krwiotworzenia, a w szczególności ich wpływu na same KKM oraz procesy uwalniania tych komórek ze szpiku kostnego do krwi obwodowej podczas mobilizacji farmakologicznej. Informacje przedstawione w niniejszym rozdziale zostały poparte licznym i właściwie dobranym piśmiennictwem, co z kolei stanowi bardzo dobre tło dla stawianych celów badawczych oraz pozwala na zaznajomienie czytelnika z obecnym stanem wiedzy w tym zakresie. W tym miejscu należy podkreślić, że Pani mgr Kamila Bujko dysponuje bogatą wiedzą w obszarze poruszanej tematyki. Jednakże, muszę też wspomnieć o pewnych drobnych mankamentach, które występują w tej części pracy. Pierwsza uwaga dotyczy niekonsekwencji w podawaniu informacji dotyczących oprogramowania użytego do tworzenia ilustracji.

Chociaż w przypadku Rycin 2 i 3 zaznaczono, że zostały one wykonane przy użyciu programu BioRender, nie zamieszczono stosownych informacji przy opisie pozostałych rysunków. Ponadto, na stronach 30, 32, 36, 38, 40 oraz 44 Autorka powołuje się na wyniki badań innych autorów, jednak brakuje odnośników do spisu piśmiennictwa.

3. Zdefiniowanie celów badawczych

Pani mgr Kamila Bujko w sposób rzeczowy sformułowała cztery cele szczegółowe pracy. Pierwszym z nich było oszacowanie poziomu ekspresji receptorów purynergicznym obecnych na powierzchni ludzkich oraz mysich krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM). W tym miejscu sugerowałbym dokładniejsze sprecyzowanie pierwszego celu poprzez dopisanie "receptorów purynergicznym P2X". Kolejne dwa cele dotyczyły oceny roli receptorów P2X1 oraz P2X4 w procesach farmakologicznej mobilizacji KKM, zasiedlania szpiku oraz rekonstrukcji hematologicznej po przeszczepie. Ostatni z nich obejmował identyfikację mechanizmów efektorowych zależnych od prawidłowego działania układu purynergicznego. Przytoczone powyżej cele badawcze nie zostały jednak uzupełnione o hipotezy. Można to uznać za pewną lukę w pracy, ponieważ trafnie postawione hipotezy pozwalają na precyzyjne sformułowanie oczekiwanych wyników i odpowiedzi na stawiane wcześniej pytania. Warto więc rozważyć w przyszłości uzupełnienie dysertacji o ten element w celu wzmocnienia jej merytorycznego fundamentu.

4. Metodyka badań

Badania Pani mgr Kamili Bujko zostały częściowo wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego z Narodowego Centrum Nauki (OPUS nr. UMO-2018/29/B/NZ4/01470) za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (nr zezwolenia WAW2/124/2019 i WAW2/125/2019) oraz Institutional Animal Care and Use Committee in Louisville (nr zezwolenia IACUC 19617). W celu realizacji założeń rozprawy doktorskiej, wykorzystano materiał badawczy pochodzący od 6-8 tygodniowych myszy typu dzikiego (C57BL/6) oraz szczepów myszy z rekombinacją homologiczną receptora P2X7 (P2X7 KO) oraz P2X4 (P2X4 KO). W badaniach wykorzystano również ludzkie komórki jednojądrzaste (MKC) i krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM), pobrane z krwi pępowinowej, oraz komórki mysie MKC i KKM, wyizolowane ze szpiku kostnego. W tej części pracy Doktorantka dokonała szczegółowej charakterystyki procedur analitycznych, które zostały starannie przemyślane i odpowiednio dobrane dla realizacji zaplanowanych celów. Na szczególną uwagę zasługuje szeroki zakres prowadzonych badań oraz różnorodność zastosowanych wysokospecjalistycznych metod analitycznych, co wskazuje na ogrom włożonej pracy oraz wysokie umiejętności Pani mgr Kamili Bujko w zakresie posługiwania się nowoczesnym warsztatem badawczym, włączając w to również umiejętność statystycznego opracowywania otrzymanych wyników. Z nałożonego na mnie obowiązku

recenzenta, stwierdzam, że w tej części dysertacji występują pewne elementy, które wymagałyby uzupełnienia. W rozdziale tym brakuje bowiem istotnych informacji dotyczących między innymi liczebności poszczególnych grup eksperymentalnych, rodzaju i producenta podawanej paszy oraz dokładnej charakterystyki przebiegu procesu eutanazji. Ponadto nie uwzględniono opisu odnośnie sposobu pobierania oraz ilości prób wykorzystanych do izolacji monokariocytów (MKC) i krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) z ludzkiej krwi pępowinowej. Umieszczenie tych informacji bezpośrednio po opisie warunków utrzymania zwierząt laboratoryjnych, pozwoliłoby na bardziej klarowne przedstawienie poszczególnych etapów przeprowadzonych doświadczeń.

5. Wyniki i dyskusja

Opis uzyskanych wyników został przedstawiony na 31 stronach wydruku i dodatkowo poparty 24 rycinami. Rozdział ten, z uwagi na dużą liczbę przeprowadzonych analiz, został podzielony na trzy odrębne części, co zwiększyło przejrzystość przedstawionych w nim treści. Doktorantka po wstępnej ocenie profilu ekspresji receptorów P2X na ludzkich oraz mysich KKM do dalszych badań wytypowała dwa z nich, a mianowicie P2X4 oraz P2X7. Ich wysoka wrażliwość na ATP oraz szybkie przewodnictwo sygnałów, które sugeruje potencjalne zaangażowanie w szereg kluczowych funkcji związanych z mobilizacją oraz wszczepianiem KKM, stanowią pełne uzasadnienie dla tego wyboru. Według mojej oceny do najważniejszych, pionierskich wyników badań należy wykazanie, że zablokowanie prawidłowej funkcji tych receptorów, poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów, istotnie obniża odpowiedź KKM na czynniki chemotaktyczne, redukuje skuteczność farmakologicznej ich mobilizacji, jak również powoduje upośledzenie ich wydajności wszczepiania oraz zasiedlania niszy szpikowej, co z kolei skutkuje wydłużeniem czasu potrzebnego do pełnej odnowy hematologicznej po ich przeszczepieniu. Po lekturze tej części rozprawy można stwierdzić, że Autorka w pełni odniosła się do zaproponowanych celów badawczych, a rzetelny opis wyników dowodzi wysokich umiejętności Doktorantki w zakresie kompleksowej analizy tak dużej ilości danych.

W rozdziale "Dyskusja", który obejmuje aż 15 stron, Pani mgr Kamila Bujko bardzo szczegółowo odniosła się do uzyskanych wyników własnych w oparciu o najnowsze piśmiennictwo naukowe. Ten fragment pracy doktorskiej jest napisany wartkim językiem naukowym, który sprawia, że narracja jest klarowna i niewątpliwie ułatwia czytelnikowi lekturę tekstu. Powyższe świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia polemiki naukowej oraz potwierdza jej dojrzałość naukową. W dalszej części pracy Autorka przedstawiła syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników badań oraz wskazała potencjalne możliwości ich zastosowania w kontekście zastosowań klinicznych. Rozprawę doktorską wieńczą „Wnioski”, które wnoszą istotne wartości poznawcze do wiedzy w zakresie roli sygnałowania purynergicznego w procesach mobilizacji oraz zasiedlania nisz szpikowych

przez krwiotwórcze komórki macierzyste. Autorka sformułowała 5 wniosków końcowych. Moje zastrzeżenia budzi trzeci wniosek w którym Autorka podaje, że „Inhibitory receptorów P2X1 oraz P2X4 mogą znaleźć zastosowanie w transplantologii hematologicznej poprawiając efektywność procesu farmakologicznej mobilizacji i wszczepienia komórek po przeszczepieniu”. Treść tego wniosku nie jest zgodna z uzyskanymi wynikami badań i w mojej ocenie powinna zostać zmieniona. Rozdział „Piśmiennictwo” liczący 26 stron, zawiera bogaty zbiór literatury, który obejmuje najważniejsze pozycje z omawianej dziedziny. Mam dwie drobne uwagi do tej części rozprawy. Pierwsza z nich dotyczy braku ujednolicenia w sposobie opisu cytowanych źródeł bibliograficznych. W niektórych przypadkach podawani są wszyscy autorzy, a w innych Doktorantka wymienia tylko trzech pierwszych autorów, po czym używa angielskiego skrótu „et al.”. Z uwagi na to, że praca doktorska jest napisana w języku polskim, zamiast używania terminu „et al.”, należałoby zastosować polski odpowiednik, na przykład „i wsp.”. Ponadto widniejąca w spisie literatury pozycja 201 (Luo i wsp. 2018) nie została przytoczona w treści rozprawy. Pojawiające się w tekście drobne błędy językowe zostały zaznaczone w manuskrypcie.

Jednocześnie chciałabym podkreślić, że wymienione przez mnie uwagi w żaden sposób nie umniejszają bardzo wysokiej wartości merytorycznej niniejszej dysertacji.

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Kamili Bujko pt: „Rola receptorów P2X w procesach zasiedlania szpiku kostnego oraz farmakologicznej mobilizacji komórek macierzystych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). **W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Kamili Bujko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na znakomity poziom badań, ponadprzeciętną innowacyjność, ogrom włożonej pracy oraz obszerną wiedzę i umiejętności posługiwania się nowoczesnym warsztatem badawczym, pragnę złożyć wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Kamili Bujko.

dr hab. inż. Agnieszka Herosimczyk, prof. ZUT