UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Prof. dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma,
Zakład Biologii Komórki
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 11.08.2026r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Prusek-Kucharek

pt. „Terapeutyczne znaczenie parakrynnego oddziaływania komórek macierzystych w dysfunkcji nabłonka rogówki wywołanej chlorkiem benzalkoniowym"

wykonanej pod kierunkiem

Promotora – prof. dr hab. n. med. Piotra Czekaja oraz Promotora pomocniczego – dr n. med. Bartosza Sikory

w Zakładzie Cytofizjologii Katedry Histologii i Embriologii

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Komórki macierzyste (KM), w tym KM mezenchymalne/ stromalne (z ang. *mesenchymal stem/ stromal cells; MSCs*) pozyskiwane z różnych źródeł tkankowych, jak również inne populacje komórek wczesnych rozwojowo rezydujących w tkankach dojrzałych i płodowych, stanowią od wielu lat przedmiot intensywnych badań, mających na celu nie tylko poznanie ich potencjału biologicznego i rozwojowego, ale przede wszystkim mechanizmów ich pro-regeneracyjnego działania w uszkodzonych tkankach, co umożliwiłyby ich lepsze zastosowania kliniczne.

Badania ostatnich lat coraz dobitniej wskazują, że obok mechanizmów polegających na bezpośrednim różnicowaniu się KM do komórek danej tkanki w miejscu uszkodzenia, komórki macierzyste działają również za pomocą tzw. mechanizmów parakrynnych, które polegają na wydzielaniu przez nie tzw. „sekretomu", czyli szeregu bioaktywnych czynników działających lokalnie na komórki uszkodzonej tkanki po ich przeszczepieniu. Sekretom komórek macierzystych zawiera nie tylko rozpuszczalne cząsteczki o działaniu m.in. immunomodulacyjnym, proangiogennym, cytoprotekcyjnym, czy też regulujących inne ważne funkcje komórek w miejscu przeszczepienia, ale zawiera także tzw. pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. *extracellular vesicles; EVs),* czyli biologiczne nanocząstki, które w swoim składzie zawierają szereg biologicznie aktywnych cząsteczek

o działaniu pro-regeneracyjnym w tkankach, działając jak swego rodzaju „nośniki" tych substancji pomiędzy komórkami. Rosnące zainteresowanie badaczy wykorzystaniem mechanizmów parakrynnych KM w regeneracji tkanek, zwraca tym samym uwagę badaczy w kierunku praktycznego, klinicznego wykorzystania ich sekretomu w terapii i praktyce klinicznej. Tym samym uwaga badaczy zwraca się w kierunku różnych populacji KM i komórek wczesnych rozwojowo oraz wydzielanego przez nie sekretomu, których właściwości pro-regeneracyjne mogą różnić się w zależności od potencjału biologicznego danej populacji KM oraz ich pochodzenia, co jest obecnie intensywnie badane w różnych ośrodkach na świecie, również pod kątem ich wykorzystania klinicznego w leczeniu ostrych oraz przewlekłych uszkodzeń tkankowych o różnej etiologii.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Agnieszki Prusek-Kucharek w pełni wpisuje się w powyższą tematykę badań, koncentrując się na ocenie wpływu sekretomu wydzielanego przez różne populacje ludzkich KM oraz komórek wczesnych rozwojowo, na potencjał funkcjonalny komórek istotnych z punktu widzenia zachowania homeostazy i regeneracji rogówki oka ludzkiego - tj. komórek macierzystych rąbka rogówki (LSC), w obecności czynnika cytotoksycznego mogącego prowadzić do uszkodzenia tkanek oka. W swoich badaniach Doktorantka skupiła się na zbadaniu aktywności sekretomu pochodzącego z ludzkich komórek MSCs tkanki tłuszczowej (hADSC), komórek nabłonka owodni (hAEC) oraz mieszanej populacji wczesnych komórek owodniowych (hAC). Jako model *in vitro* do badań ich aktywności wybrała komórki pierwotne LSC wyizolowane z ludzkiego rąbka rogówki, które poddawane były działaniu czynnika chemicznego stanowiącego składnik konserwujący stosowany m.in. w preparatach płynnych/ kroplach stosowanych w okulistyce – tj. chlorku benzalkoniowego (BAC), któremu przypisuje się uboczne działanie uszkadzające na rogówkę przy długoterminowym zastosowaniu takich preparatów leczniczych. W swoich badaniach Doktorantka poruszyła zatem istotny problem o charakterze klinicznym oraz podjęła próbę oceny potencjalnego wykorzystania sekretomu komórkowego w terapii „ochronnej" i pro-regeneracyjnej tkanek oka ludzkiego, co nadaje przeprowadzonym badaniom oraz uzyskanym wynikom rozprawy istotny walor translacyjny.

W skład przedstawionej mi do recenzji rozprawy wchodzą dwa (2) spójne tematycznie oryginalne artykuły naukowe, opublikowane w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach naukowych o średnich współczynnikach oddziaływania, w tym w *Scientific Reports* (IF=4,900) – Publikacja 1 oraz *Cells* (IF=6,000) – Publikacja 2, co świadczy o uznanym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów.
W wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, ze znaczącym jej udziałem w opracowaniu koncepcji i projektu badań, opracowaniu wymaganej do badań metodologii, przeprowadzeniu badań eksperymentalnych oraz analizie uzyskanych wyników i ich przygotowaniu

do publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy, na co wskazują Oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów w/w publikacji (załączone do rozprawy). W Publikacji 1 Doktorantka jest pierwszym współautorem wraz z jej Promotorem pomocniczym, co pozwala potwierdzić, że Doktorantka wykonywała swoją pracę eksperymentalną w ścisłej kooperacji ze swoim Promotorem pomocniczym. Obie prace zostały wykonane pod merytoryczną opieką prof. dr hab. n. med. Piotra Czekaja, wpisując się w wieloletnią tematykę badawczą jego zespołu, a dotyczącą m.in. badań właściwości biologicznych i wykorzystania terapeutycznego populacji ludzkich komórek macierzystych, w tym MSCs oraz komórek pochodzących z owodni.

Podsumowując, istotny wkład Doktorantki w przedstawione mi do oceny prace naukowe nie budzi zatem wątpliwości i został przy każdej z publikacji wykazany stosownym Oświadczeniem, potwierdzonym także przez pozostałych współautorów wspomnianych artykułów naukowych.

Ocena formalna pracy:

Rozprawę doktorską rozpoczyna spis treści, szczegółowy spis skrótów oraz wykaz publikacji wchodzących w skład pracy, a także wykazy tabel i rycin ujętych w pracy.

Po nich następuje 9-o stronicowy Wstęp, w którym Doktorantka zwięźle, ale konkretnie wprowadza czytelnika w tematykę jej rozprawy doktorskiej, której dotyczy cykl jej publikacji. Doktorantka omawia m.in. problem związany ze składem preparatów płynnych stosowanych w okulistyce, które zawierają często konserwanty (jak wspomniany BAC) mogące uszkadzać komórki oka i wpływać niekorzystnie na potencjał regeneracyjnych KM rąbka rogówki (LSC), przedstawiając także możliwe niekorzystne mechanizmy działania BAC w komórkach tkanek oka, w tym w LSC. Zwraca następnie także uwagę na rolę LSC w regeneracji rogówki oka, dobrze naświetlając problem związany z uszkodzeniem tych właśnie komórek na skutek działania konserwantów stosowanych w preparatach medycznych/ leczniczych, co badała w swojej pracy. W tym kontekście Doktorantka przedstawiła także koncepcję możliwego wykorzystanie sekretomu wydzielanego przez inne populacje KM (o znanym już potencjale regeneracyjnym i cytoprotekcyjnym) w naprawie rogówki, przedstawiając także możliwe mechanizmy działania takich czynników parakrynnych wydzielanych przez KM, w tym komórki ADSC oraz komórki owodni, które badała następnie w swojej pracy. Przedstawiła także charakterystykę w/w frakcji KM oraz przykłady wykorzystania tych komórek oraz ich sekretomu w leczeniu chorób oczu, znane z badań przedklinicznych na zwierzętach (co ujęła w trzech (3) uporządkowanych, informatywnych tabelach).

W kolejnej części rozprawy, poprzedzającej przedstawione do oceny artykuły naukowe, Doktorantka przedstawiła główne Założenia i Cele pracy obejmujące weryfikację hipotezy o niekorzystnym działaniu BAC na komórki LSC, prowadzącym do zaburzeń podstawowych funkcji tych komórek, co mogłoby zostać zahamowane lub odwrócone dzięki działaniu czynników zawartych w tzw. sekretomie

wydzielanym przez komórki MSCs (konkretnie ADSC) oraz komórki owodni. W tej części Doktorantka rozwinęła także cel główny definiując trzy (3) cele szczegółowe swojej pracy, które odpowiadają opublikowanym badaniom zamieszczonych w dalszej części rozprawy.

Kolejną część pracy stanowi obszerny, 13-o stronicowy rozdział Materiały i Metody, w którym Doktorantka w języku polskim, szczegółowo opisała materiał badawczy oraz aspekty metodyczne wykorzystane w jej badaniach, które znalazły się również w przedstawionych artykułach naukowych. Ta część stanowi uporządkowane kompendium metodyczne, pomocne w dalszej analizie uzyskanych wyników. Tę część Doktorantka uzupełniła trzema (3) rycinami przedstawiającymi schematy prowadzonych badań oraz dwiema (2) tabelami obejmującymi odpowiednio wykorzystane w badaniach przeciwciała oraz sekwencje starterów wykorzystanych w relacjach PCR.

W dalszej części rozprawy Doktorantka na 16 stronach opisała w języku polskim najważniejsze Wyniki uzyskane w swoich badanych, które mają także odzwierciedlenie w obu publikacjach wchodzących w skład rozprawy (umieszczonych dalej w pracy), koncentrując się na ocenie toksycznego wpływu środka chemicznego BAC na funkcje komórek LSC w warunkach *in vitro* (Publikacja 1) oraz na dalszym zbadaniu wpływu sekretomów (a konkretnie pożywek kondycjonowanych; CM) pozyskanych z badanych ludzkich komórek ADSC oraz AEC i AC na komórki LSC poddane działaniu BAC, co mogłoby mieć znaczenie terapeutyczne (Publikacja 2). W tym rozdziale Doktorantka logicznie i przejrzyście przedstawiła koncepcję, chronologię oraz spójność przeprowadzonych badań, zawartych w obu przedstawionych publikacjach. W tej części swoje wyniki zaprezentowała na dziesięciu (10) złożonych, informatywnych rycinach, przygotowanych bardzo starannie.

Po tej części następuje 9-o stronicowy rozdział Dyskusja, w języku polskim, w którym Doktorantka omawia przedstawione w obu publikacjach wyniki na tle wybranej literatury światowej. Wskazuje także na możliwości wykorzystania uzyskanych wyników w przyszłej praktyce klinicznej, jak również - co oceniam także wysoko, wskazuje na pewne ograniczenia i braki swojej pracy, nad którymi warto byłoby się w przyszłości pochylić w kolejnych badaniach.

Po tej części Doktorantka umieściła w punktach Wnioski płynące z jej pracy, które stanowią *de facto* podsumowanie najważniejszych wyników i obserwacji uzyskanych w jej badaniach, po czym następuje rozdział Piśmiennictwo (obejmujący 108 pozycji), po których Doktorantka umieściła Streszczenia pracy w języku polskim oraz w języku angielskim.

Kolejną istotną częścią pracy są Załączniki, które stanowią cykl dwóch w/w artykułów naukowych oraz Oświadczenia współautorów o merytorycznym udziale w przedstawionych badaniach i publikacjach, które zamykają rozprawę.

Wymienione wyżej części pracy w języku polskim zostały napisane poprawnym, syntetycznym językiem naukowym. W tekście można znaleźć nieliczne błędy interpunkcyjne i ortograficzne, nie mające wpływu na wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, od strony formalnej rozprawa spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, stanowiącym cykl artykułów poświęconych danej tematyce i stanowi spójne dzieło zawierające omówienie wyników badań eksperymentalnych Doktorantki, przedstawione w kontekście dotychczasowej wiedzy w tym obszarze.

Ocena merytoryczna:

Ze względu na to, że zasadniczą część rozprawy stanowią opublikowane już w czasopismach o zasięgu międzynarodowym artykuły naukowe, które były już poddane wcześniejszej szczegółowej recenzji przez międzynarodowych ekspertów recenzujących artykuły naukowe przed ich opublikowaniem - w tym w zakresie m.in. jakości prowadzonych badań, interpretacji i znaczenia prezentowanych wyników badań oraz stosowanej metodyki - moja ocena jako recenzenta ma jedynie charakter uzupełniający. Biorąc pod uwagę powyższe oraz po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawioną rozprawą, opisami wyników badań przedstawionymi w rozprawie, a przede wszystkim z przedstawionymi w rozprawie publikacjami Doktorantki, zaprezentowane wyniki badań oraz ich znaczenie oceniam wysoko.

Należy podkreślić, że Doktorantka w swoich eksperymentach wykorzystała liczne populacje komórkowe izolowane z ludzkich tkanek dawców, w tym unikatową populację komórek macierzystych rąbka rogówki (LSC), których właściwości funkcjonalne badała w różnych modelach eksperymentalnych, w obu publikacjach.

W Publikacji 1 potwierdziła m.in. cytotoksyczny wpływ związku BAC (w stężeniu działającym na rogówkę, tj. 0,0002%) na komórki LSC, przejawiający się znamiennym obniżeniem ich żywotności oraz aktywności proliferacyjnej, w porównaniu do komórek kontrolnych. Wykazała, że może mieć to związek m.in. z regulacją genów proapoptotycznych oraz zapalnych w tym komórkach, co stanowi istotną informację w kontekście długoterminowego stosowania leków zawierających ten konserwant u pacjentów z chorobami oczu.

Doktorantka wykorzystała także w swoich badaniach różne frakcje ludzkich KM oraz wczesnych rozwojowo, jak komórki ADSC, AEC i AC, które charakteryzowała na poziomie funkcjonalnym i molekularnym, a następnie wykorzystała do pozyskania ich sektetomu, w postaci „pożywki kondycjonowanej" (CM) z ich hodowli.

W Publikacji 2 wykonała szereg istotnych badań eksperymentalnych – w dwóch (2) różnych modelach podawania środka cytotoksycznego BAC oraz badanych CM, w których potwierdziła istotny wpływ

badanych sekretomów komórkowych m.in. na żywotność oraz proliferację komórek LSC poddanych działaniu BAC, co stanowi istotny wkład w opracowaniu potencjalnych przyszłych podejść terapeutycznych mających na celu zahamowanie lub zniesienie niekorzystnego efektu takich czynników jak BAC na tkanki oka.

W swoich badaniach Doktorantka uzyskała zatem szereg ważnych wyników mających potencjalne znaczenie praktyczne dla rozwoju przyszłych podejść w terapiach chorób oczu u ludzi, z zastosowaniem nie tylko samych komórek macierzystych, w tym MSCs - co już ma miejsce w niektórych ośrodkach badawczych, ale także z zastosowaniem ich bezkomórkowych biopochodnych, czyli tzw. sekretomu zawierającego czynniki o działaniu parakrynnym.
Uzyskane wyniki badań opublikowane przez Doktorantkę oraz zespół, w którym pracuje, uważam zatem za istotne i aplikacyjne.

W czasie lektury pracy nasunęło mi się kilka wątpliwości metodycznych i pytań merytorycznych, które mogą być także przyczynkiem do dyskusji na temat m.in. znaczenia uzyskanych przez Doktorantkę wyników w czasie obrony jej pracy:

1) Pytanie metodyczne: Jak były przygotowywane pożywki do hodowli komórek, z których pozyskiwano CM, biorąc pod uwagę, że pożywki z surowicą (jako suplementem) zawierają istotną ilość np. EVs pochodzenie egzogennego.
2) Która subpopulacja komórek wchodzących w skład badanej frakcji LSC może być szczególnie podatna na działanie skeretomu badanych w pracy komórek? Czy Doktorantka badała może wpływ CM na różne subpopulacje LSC w swoich wcześniejszych lub późniejszych eksperymentach? Czy coś na ten temat wiadomo z badań innych zespołów? Jak można byłoby zaplanować taki eksperyment, który sprawdziłby wrażliwość różnych subpopulacji LSC na badane frakcje sekretomowe?
3) Czy Doktorantka może już coś więcej powiedzieć na temat składu badanych skeretomów/ CM, pod względem zawartości np. różnych czynników rozpuszczalnych oraz zawartości EVs, które mogłyby mieć znaczenie dla zaobserwowanej aktywności badanych CM na komórki LSC? Czy Doktorantka przeprowadziła już lub planuje takie badania? Jakie typy eksperymentów mogłaby zaproponować, aby dokładniej przeanalizować składniki aktywne w badanych skeretomach komórkowych?
4) Czy Doktorantka miała szansę zweryfikowania swoich wyników na większej liczbie izolatów komórek LSC (tj. pozyskanych od kilku różnych dawców), aby potwierdzić, że obserwowane efekty są powtarzalne, a nie są wynikiem odpowiedzi indywidualnej komórek jednego dawcy?

5) W jaki sposób Doktorantka planuje/ wyobraża sobie dalsze praktyczne wykorzystanie badanych preparatów opartych o sekretom komórek w leczeniu chorób/ uszkodzeń oka? Jak zastosowane modele metodyczne (1 i 2), w których badała wpływ sekretomu na komórki rogówki mogą przełożyć się na ew. przyszłe podejścia terapeutyczne? Niech odpowiedź na to pytanie stanowi też Wnioski płynące z pracy, których nieco mi zabrakło w samej rozprawie (na str. 63).

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr Agnieszki Prusek-Kucharek wpisuje się w ważny aspekt badań biomedycznych z zakresu medycyny regeneracyjnej, koncentrując się na potencjalnym wykorzystaniu bioaktywnych pochodnych komórkowych wchodzących w skład ich sekretomu - pozyskiwanych tu z komórek macierzystych MSCs i komórek owodni - w celu poprawy funkcjonalnej i regeneracji rogówki oka, w tym po uszkodzeniach o różnej etiologii. Jest to nowy i istotny obszar badawczy, a wyniki uzyskane przez Doktorantkę mogą z pewnością stanowić przyczynek dla rozwoju nowych podejść terapeutycznych i mogą mieć w przyszłości istotne znaczenie praktyczne. Biorąc pod uwagę powyższe, całościowo pracę doktorską oceniam wysoko.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Prusek-Kucharek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

Podpisano przez/ Signed by:
EWA
ZUBA-SURMA
Data/ Date: 21.08.2026 15:08
mSzafir

Prof. dr hab. Ewa Zuba-Surma