Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; [redacted]
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR. AGNIESZKI PRUSEK-KUCHAREK PT. „TERAPEUTYCZNE ZNACZENIE PARAKRYNNEGO ODDZIAŁYWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH W DYSFUNKCJI NABŁONKA ROGÓWKI WYWOŁANEJ CHLORKIEM BENZALKONIOWYM."

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu Pani mgr Agnieszki Prusek-Kucharek została przygotowana w formie 78-stronicowej monografii w języku polskim, uzupełnionej o odbitki dwóch publikacji stanowiących dodatkową, niezależną część rozprawy.

Pracę wykonano w Zakładzie Cytofizjologii Katedry Histologii i Embriologii Wydziału Nauk Medycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach pod kierunkiem Pana prof. dr hab. n. med. Piotra Czekaja oraz Pana dr n. med. Bartosza Sikory, który pełnił rolę promotora pomocniczego.

Część monograficzna rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Prusek-Kucharek ma układ typowy dla tego typu opracowań. Zawiera ona spis treści, spis skrótów, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, wykaz tabel, wykaz rycin, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu zamieszczono załączniki zawierające publikacje wchodzące w skład doktoratu oraz oświadczenia współautorów o udziale w ich powstaniu. Do treści rozprawy nie dołączono kopii zezwoleń z lokalnej komisji bioetycznej; szczegółowa informacja o takiej zgodzie znalazła się natomiast zarówno w części monograficznej, jak i w obu załączonych publikacjach.

Załączone, poniżej wymienione publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej mgr Prusek-Kucharek to dwie spójne tematycznie prace oryginalne opublikowane w ubiegłym roku w renomowanych międzynarodowych czasopismach o łącznym IF 9,1.

1. **Prusek A**, Sikora B, Skubis-Sikora A, Czekaj P. Assessment of the toxic effect of benzalkonium chloride on human limbal stem cells. Sci Rep. 2025 Apr 10;15(1):12295. doi: 10.1038/s41598-025-96919-2. PMID: 40210649; PMCID: PMC11986071.
2. **Prusek-Kucharek A**, Sikora B, Czekaj P. Potential Therapeutic Effects of Epithelial and Mesenchymal Stem Cell Secretome in Benzalkonium Chloride-Induced Limbal Stem Cell Dysfunction. Cells. 2025 Nov 14;14(22):1790. doi: 10.3390/cells14221790. PMID: 41294843; PMCID: PMC12651294.

Do czasu przygotowania niniejszej recenzji obie prace były cytowane łącznie 13 razy, co wskazuje na zainteresowanie i uznanie ze strony środowiska naukowego. W obu publikacjach doktorantka jest pierwszą autorką. Z oświadczeń doktorantki oraz współautorów wynika również, że jej udział był kluczowy zarówno na etapie badań, oceny wyników, jak i przygotowania manuskryptów. Biorąc pod uwagę fakt, że rozprawa została przygotowana również w formie monografii, można z pełnym przekonaniem uznać przedstawioną mi do oceny rozprawę za samodzielne dzieło mgr Prusek-Kucharek.

Ostatnie dekady przyniosły ogromny postęp w badaniach nad komórkami macierzystymi oraz ich potencjalnym znaczeniem w fizjologii, a także w medycynie regeneracyjnej i odtwórczej. W tym kontekście szczególnie interesująca wydaje się rola tych komórek w utrzymaniu homeostazy w oku, zwłaszcza w rogówce. Rogówka jest narządem szczególnie narażonym na szkodliwe działanie czynników biologicznych, mechanicznych i chemicznych. Jej regeneracja zależy głównie od komórek macierzystych zlokalizowanych w rąbku rogówki oraz produkowanych przez nie czynników. Dlatego uważam, że tematyka badań, które stały się podstawą niniejszej rozprawy, jest nie tylko ciekawa z poznawczego punktu widzenia, ale także ma istotne znaczenie praktyczne.

Jak zaznaczyłem wcześniej, rozprawa mgr Agnieszki Prusek-Kucharek składa się z części monograficznej oraz „spinki" opublikowanych prac. Muszę przyznać, że pierwszy

raz mam do czynienia z oceną rozprawy łączącej obie formy, co w pierwszym momencie wywołało u mnie pewną konfuzję. Zwyczajowo, doktoranci wybierają jedną z nich. Nie wiem, co kierowało doktorantką przy wyborze takiej formy dysertacji, ale uważam, że jest to godne polecenia rozwiązanie. Z jednej strony, pisząc monografię, doktorantka udowodniła swoją samodzielność i umiejętności przygotowania tekstu naukowego, z drugiej, jej praca w postaci publikacji została już oceniona i przedstawiona światowemu środowisku naukowemu. Prace na etapie publikacji zostały już poddane wnikliwej recenzji przez członków komitetów redakcyjnych czasopism. Stanowi to ważną wskazówkę dla recenzenta rozprawy i w pewnym stopniu zwalnia go z obowiązku szczegółowego recenzowania założeń prac, poprawności metodyki oraz uzyskanych wyników, a także sposobu ich interpretacji. Tym samym, w mojej ocenie niniejszej rozprawy kierowałem się bardziej przesłankami formalnymi i wartością merytoryczną wyników dla rozwoju badań nad rolą komórek macierzystych w okulistyce.

Zarówno część monograficzna, jak i publikacje zawierają stosowny wstęp, z którego wynika cel podjętych badań. Doktorantka skupiła się tu głównie na problemie powikłań związanych ze stosowaniem konserwantów w lekach okulistycznych o działaniu nawilżającym i przeciwzapalnym, szczególnie chlorku benzalkoniowego (BAC). Opisała mechanizmy działania BAC i konsekwencje jego długotrwałego działania. Wyczerpująco opisała mechanizmy regeneracji rogówki oraz możliwości jej wspierania poprzez zastosowanie produktów pochodzących z komórek macierzystych. Doktorantka podsumowała również dotychczasową wiedzę dotyczącą potencjału regeneracyjnego komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł. Na podstawie tej wiedzy wysunęła hipotezę, że BAC jest toksyczny dla komórek rąbka rogówki (LSC) *in vitro*, co można ograniczyć poprzez zastosowanie czynników uwalnianych przez różne rodzaje komórek macierzystych. Aby zweryfikować tę hipotezę, postawiła sobie trzy cele badawcze.

1. Charakterystyka fenotypowa LSC i określenie optymalnej szkodliwej dawki BAC.
2. Ocena wpływu supernatantów z hodowli różnych typów komórek macierzystych na funkcje LSC eksponowanych na działanie BAC.

3. Ocena wpływu supernatantów z hodowli różnych typów komórek macierzystych na odnowę i funkcje LSC uszkodzonych przez BAC.

Powyższe badania przeprowadzono na hodowlach ludzkich LSC izolowanych z płatków rogówkowo-twardówkowych oczu dawców rogówki oraz na ludzkich liniach mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ADSC), komórek owodniowych (hAC) i nabłonkowych komórek owodniowych(hAEC). Komórki zostały scharakteryzowane na podstawie ekspresji markerów powierzchniowych metodami cytofotometrycznymi z zastosowaniem swoistych przeciwciał. Posłużyły one jako źródło czynników uwalnianych do środowiska hodowlanego, które następnie wykorzystano do traktowania komórek LSC. Fenotyp i funkcje LSC były badane na podstawie zmian ekspresji panelu wybranych genów metodą qRT-PCR. Ponadto doktorantka badała żywotność i apoptozę oraz proliferację i migrację LSC stosując dedykowane metody badawcze. Przedmiotem badań był również cykl komórkowy LSC i ekspresja genów związanych z reakcjami zapalnymi. Założenia badawcze oraz dobór wyżej wymienionych metod uważam za właściwe.

W pierwszej publikacji (Prusek A i wsp. Assessment of the toxic effect of benzalkonium chloride on human limbal stem cells. Sci Rep. 2025 Apr 10;15(1):12295) kandydatka przedstawiła wyniki dotyczące charakterystyki i wpływu BAC na komórki LSC. Ustaliła hamującą dawkę BAC na proliferację i migrację komórek i jej wpływ na ekspresję genów regulujących podstawowe funkcje komórek. Badania te dowiodły, że BAC hamuje klonogenny potencjał LSC i wywiera na nie efekt cytotoksyczny, ograniczając ich zdolności regeneracyjne.

Druga publikacja (Prusek-Kucharek A i wsp. Potential Therapeutic Effects of Epithelial and Mesenchymal Stem Cell Secretome in Benzalkonium Chloride-Induced Limbal Stem Cell Dysfunction. Cells. 2025 Nov 14;14(22):1790.) dotyczyła protekcyjnego wpływu nadsączu z hodowli (conditioned medium, CM) różnych komórek macierzystych na LSC. Doktorantka dowiodła, że CM uzyskane z hodowli ADSC, hAC lub hAEC zwiększają żywotność LSC i modulują ich odpowiedź zapalną oraz wpływają na ich cykl komórkowy, proliferację i migrację. CM, szczególnie CM z ADSC, neutralizowały toksyczny efekt BAC. Lepszy efekt uzyskano przed dodanie BAC co

świadczy o protekcyjnych właściwościach czynników obecnych w CM z mezenchymalnych komórek macierzystych.

Biorąc pod uwagę, że BAC jest powszechnie używany jako konserwant w lekach okulistycznych, przytoczone wyżej badania doktorantki mają ogromne znaczenie, nie tylko poznawcze, ale również praktyczne.

Uzyskane wyniki zostały wyczerpująco przedyskutowane w świetle aktualnej wiedzy. Na ich podstawie doktorantka sformułowała cztery zasadnicze wnioski, przytoczone poniżej, które zamieściła na zakończenie części monograficznej rozprawy.

1. BAC w stężeniu 0,0002% ma toksyczny wpływ na LSC, hamuje ich metabolizm, proliferację i migrację, modyfikuje cykl komórkowy, ogranicza zdolność klonogenną oraz indukuje apoptozę, pozostając bez wpływu na parametry reakcji zapalnej.
2. Czynniki (sekretomy) zawarte w nadsączach z hodowli ADSC, hAC lub hAEC chronią przed toksycznym wpływem BAC na LSC.
3. Efekt badanych CM był lepszy, gdy podawano je razem z BAC, niż po podaniu tego konserwanta.
4. Największy potencjał protekcyjny wykazywały nadsącza z hodowli ADSC.

W tym miejscu, z obowiązku recenzenta zmuszony jestem stwierdzić, że wyżej wymienione wnioski nie są wnioskami, tylko podsumowaniem wyników. Dlatego oczekuję, że doktorantka w trakcie publicznej obrony pokusi się o prawidłowe sformułowanie wniosków, szczególnie w kontekście praktycznego znaczenia uzyskanych wyników.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Prusek-Kucharek jest przykładem oryginalnej, bardzo rzetelnej pracy naukowej. Doktorantka wykazała się umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na bardzo nowoczesnej metodologii badań laboratoryjnych. Na uwagę zasługuje też fakt, że badania mają istotny aspekt praktyczny, a ich wyniki mogą zostać wykorzystane przy opracowywaniu nowych, bezpieczniejszych składów leków okulistycznych, szczególnie tych stosowanych przewlekle.

Uważam, że mgr Agnieszka Prusek-Kucharek osiągnęła stopień dojrzałości naukowej uprawniający ją do ubiegania się o stopień doktora, a przedstawiona przez nią rozprawa spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu określone w art. 187. ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie mgr Agnieszki Prusek-Kucharek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Warszawa, 06/09/2026 Jacek Malejczyk