

Dr hab. Tomasz Szponder
Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 10 czerwca 2023

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Krzysztofa Buczaka pt: „Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikropęcherzykach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec”

wykonanej w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem Pana Profesora Zdzisława Kielbowicza oraz Pana dr hab. Przemysława Prządki jako promotora pomocniczego

Podstawę formalną wykonania opinii niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi pismo Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu powołujące się na Uchwałę Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 30 maja 2023r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dotyczy wykorzystania komórek macierzystych szpiku kostnego oraz substancji bioaktywnych zawartych w mikropęcherzykach pochodzących z komórek macierzystych szpiku kostnego na gojenie ubytków chrząstki szklistej w stawie kolanowym u owiec oraz w dalszej perspektywie ocena tego sposobu leczenia w odniesieniu do terapii choroby zwyrodnieniowej stawów (DJD) u ludzi i zwierząt.

Praca została przygotowana jako monografia i składa się z 12 rozdziałów: „Wprowadzenie” oraz „Wstęp” obejmujący 5 podrozdziałów poświęconych budowie oraz diagnostyce uszkodzeń chrząstki stawowej, leczeniu ubytków chrząstki oraz wybranym zagadnieniom z medycyny regeneracyjnej; mezenchymalnym komórkom macierzystym oraz mikropęcherzykom błonowym. Kolejne rozdziały pracy to „Założenia i cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja i omówienie wyników”, „Wnioski”, „Streszczenie” w języku polskim i angielskim, „Piśmiennictwo”, oraz „Spis tabel i rycin”. Rozdział Wprowadzenie poprzedza obszerny wykaz skrótów polskich i angielskich używanych w pracy.

Łącznie rozprawa doktorska liczy 115 stron, zawiera 9 tabel, 40 rycin oraz 161 pozycji literaturowych.

W rozdziale Wprowadzenie Autor opisuje poważny problem ortopedyczny, jakim jest choroba zwyrodnieniowa stawów u ludzi i zwierząt. Dotyczy ona znacznej części populacji ludzi i zwierząt, a nieleczona prowadzi do powstania rozległych zmian zwyrodnieniowych, skutkujących trwałą dysfunkcją stawów. Leczenie DJD obejmuje postępowanie zachowawcze wspomagane fizykoterapią oraz w zaawansowanych przypadkach leczenie chirurgiczne. Alternatywą jest wykorzystanie medycyny regeneracyjnej, w szczególności komórek macierzystych oraz ich biologicznych pochodnych (mikropęcherzyków). Wymaga to jednak opracowania sposobu aplikacji komórek macierzystych do stawu oraz wyjaśnienia sposobu działania i monitoringu procesu leczenia aby wykluczyć ryzyko działań niepożądanych. W oparciu o udokumentowane właściwości chondrogenne MSCs pochodzących ze szpiku i tkanki tłuszczowej owiec Doktorant trafnie uzasadnia potrzebę zbadania wpływu komórek macierzystych szpiku kostnego oraz substancji bioaktywnych zawartych w MVs implantowanych na rusztowaniu kolagenowym na regenerację chrząstki stawowej w stawie kolanowym u owiec.

W rozdziale „Wstęp” Autor szczegółowo opisuje strukturę tkanki chrzęstnej szklistej, zwracając uwagę na jej zmiany w trakcie normalnego obciążenia, a także mechanizm powstawania ubytków chrząstki. W kontekście wyjaśnienia mechanizmów rozwoju DJD Doktorant opisuje etiologię powstawania ubytków chrzęstnych, ich rodzaje oraz proces gojenia i regeneracji. Odrębną część tego rozdziału stanowi analiza dostępnych metod diagnostycznych ubytków chrzęstnych, które Autor analizuje pod kątem ich przydatności w części eksperymentalnej pracy. W dalszej części Wstępu Autor przedstawia współczesne metody leczenia ubytków chrząstki stawowej, uwzględniając najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie ortopedii weterynaryjnej. Na zakończenie Doktorant omawia zagadnienie mezenchymalnych komórek macierzystych MCSs, ich wykorzystania w leczeniu zwierząt oraz technologie ich pozyskiwania. Odrębną część rozdziału stanowi charakterystyka mikropęcherzyków błonowych pozyskiwanych z komórek mezenchymalnych.

W rozdziale Założenia i cel pracy Autor przedstawił podstawowe założenia swojej pracy badawczej, dotyczące zbadania wpływu implantacji skafoldu kolagenowego nasączonego autologicznymi BM -MSCs lub autologicznymi mikropęcherzykami MVs pochodzącymi z BM-MSCs do wytworzonego operacyjnie ubytku chrząstki stawowej szklistej stawu kolanowego owcy na proces gojenia chrząstki. Skuteczność tej metody leczenia Autor postanowił ocenić, wykonując następujące procedury badawcze:

- badanie CT struktur operowanego stawu kolanowego

- badanie makroskopowe operowanych stawów kolanowych
- ocenę mikroskopową fragmentu bloczka kości udowej z wytworzonym ubytkiem
- monitorowanie parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi

Na przeprowadzenie badań Autor uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu.

Materiał i metody.

Część badawczą podzielono na 2 etapy:

- 1) prefabrykacja BM-MSCs i MVs,
- 2) wszczepienie implantów

W badaniach implantacyjnych wykorzystano 16 owiec, podzielonych na 4 grupy: grupa I (2 owce, kontrola negatywna), grupa II (2 owce, kontrola pozytywna 0,9% NaCl), grupa III (6 owiec, MVs), grupa IV (6 owiec, BM-MSCs). W pierwszym etapie doświadczenia od 12 owiec śródoperacyjnie pobrano szpik kostny z bliższej nasady kości ramiennej i wykonano prefabrykację BM-MSc oraz MVs. W drugim etapie badania u każdej owcy z grupy II, III i IV wykonano ubytek chrzęstno-kostny o średnicy 6,5 mm i głębokości 10 mm w bloczku prawej kości udowej, które wypełniono skafoldem kolagenowym, a następnie nasączono go odpowiednio 0,9% NaCl, MVs lub BM-MSCs. Obserwacja u operowanych zwierząt trwała 180 dni, w dniu 0, 90 i 180 wykonano kontrolne badanie CT stawów kolanowych. Badania hematologiczne wykonano w dniu 0, 3, 6, i 10 po operacji. Po eutanazji u zwierząt przeprowadzono analizę makroskopową i mikroskopową okolicy ubytku chrzęstno-kostnego.

Wyniki

W oparciu o wyniki badań CT operowanych stawów Autor wykazał, że w grupach doświadczalnych z implantem zawierającym BM –MSCs i MVs widoczne jest lepsze wypełnienie nowopowstałą tkanką ubytku chrzęstno-kostnego w porównaniu do grupy kontrolnej.

W badaniach makroskopowych w grupach eksperymentalnych w grupie III stwierdzono całkowite wypełnienie ubytku tkanką o charakterze łącznotkankowym, podczas gdy w grupie kontrolnej pozytywnej widoczna była zapadnięta powierzchnia ubytku wypełniona tkanką o charakterze łącznotkankowym.

Ocenę histopatologiczną ubytku chrząstki stawowej uzupełniono o ocenę półjakościową opartą na 14-punktowej skali utworzonej i zmodyfikowanej w oparciu o wytyczne ISRS, którą poddano analizie statystycznej. Na podstawie obserwacji mikroskopowych i wyników analizy statystycznej powyższej skali można postawić wniosek, że zastosowania MVs pozwala na lepsze wypełnienie ubytku chrząstki, umożliwia szybsze zastąpienie tkanek pierwotnych ostatecznymi i co za tym idzie powrót do funkcjonalności powierzchni chrzęstnej.

Ocena parametrów morfologicznych krwi wykazała przejściowy wzrost liczby leukocytów bezpośrednio po zabiegu, który do 10 dnia wrócił do wartości referencyjnych. W badaniach biochemicznych Autor zaobserwował również przejściowe zmiany.

W rozdziale Dyskusja i omówienie wyników Autor omówił otrzymane wyniki i porównał je z dostępną literaturą. Zaprezentowane wyniki pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Zastosowanie autologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) i mikropęcherzyków (MVs) w leczeniu doświadczalnie wykonanego krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego zwiększa odbudowę tkanki łącznej wypełniającej ubytek. Spośród nich najbardziej korzystny wpływ wykazują MVs.
2. Doświadczalne wykonanie krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego na powierzchni bloczka kości udowej nie powoduje rozwoju zmian zapalno-zwyrodnieniowych dostrzegalnych w badaniu tomografem komputerowym i makroskopowym.
3. Zastosowanie kolagenowego skafoldu nasączonego autologicznymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) i mikropęcherzykami (MVs) w leczeniu doświadczalnie wykonanego krytycznego ubytku chrzęstno-kostnego nie skutkuje zwiększoną odpowiedzią zapalną organizmu odzwierciedloną w parametrach morfologicznych krwi.
4. Zastosowanie dostawowe mikropęcherzyków (MVs) jest bezpieczne i nie powoduje negatywnej reakcji miejscowej i ogólnej organizmu.

Wnioski końcowe zawarte w rozdziale 8 są zgodne z postawionymi celami. Praca jest spójna tematycznie, bogato ilustrowana, załączone materiały graficzne są bardzo dobre jakościowo i ułatwiają zrozumienie prezentowanych wyników i treści.

Uzupełnieniem monografii jest wykaz piśmiennictwa obejmujący 116 pozycji, odpowiednio dobranych, pochodzących w dużej mierze z ostatnich lat.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma dużą wartość poznawczą, wnosi nowe dane do jednej z najnowszych dziedzin terapii jaką jest medycyna regeneracyjna w leczeniu ludzi i zwierząt. Jako praca eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, z uwzględnieniem zasad 3R oraz dobrostanu zwierząt eksperymentalnych. Wykonanie badań na owcach jako zwierzętach doświadczalnych pozwoliło na wykorzystanie sprawdzonych i co ważne

powtarzalnych technologii uzyskiwania MSCs i MVs, a uzyskane wyniki będą użyteczne zarówno w ortopedii ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Podobnie wykorzystanie standardowych metod diagnostycznych i uzyskanie wysokiej jakości materiału badawczego pozwala na porównywanie otrzymanych wyników z innymi publikacjami z zakresu medycyny regeneracyjnej.

Wywiązując się z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na kilka niewielkich uchybień nie umniejszającej wartości pracy. Jakość ryciny 1 na stronie 19 znacząco odbiega od pozostałych rycin w pracy. Poddaję też pod rozwagę uwzględnienie w tytule pracy części dotyczącej implantacji BM-MSCs. We wnioskach proponuję do wniosku nr 2 dodać informację „po 180 dniach od urazu”, a do wniosku nr 4 można dodać „na podstawie wykonanych badań”.

Pracę lek. wet. Krzysztofa Buczaka pt: „Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikropecherzykach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec” oceniam bardzo wysoko. Jest to ambitna praca eksperymentalna dotycząca nowatorskiego sposobu leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów, która w dalszej perspektywie może być wykorzystywana w leczeniu ludzi i zwierząt. Należy też podkreślić niezaprzeczalne walory dydaktyczne pracy, zwłaszcza wstęp, w którym Autor omawia zagadnienia diagnostyki i terapii DJD.

Podsumowując, stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Krzysztofa Buczaka pt: „Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikro pecherzykach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec” spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.)

Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Krzysztofa Buczaka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy, motywując to jej wysoką wartością poznawczą oraz znacznym zaangażowaniem badawczym Doktoranta.

Sepandhe Tamara