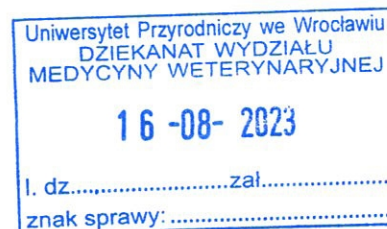


Olsztyn, 07 sierpnia 2023 r.

Dr hab. Waldemar Sienkiewicz prof. UWM  
Katedra Anatomii Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie



Recenzja rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza

pt. „Izolacja, hodowla i charakterystyka mezynchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej” wykonanej na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Katedrze Biostruktury i Fizjologii Zwierząt pod kierunkiem Promotora Pana prof. dr hab. Macieja Janeczka, oraz Promotora pomocniczego Pana dr Tomasza Gębarowskiego.

Podstawą formalną wykonania recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 30. 05. 2023 roku.

Rogówka jest częścią błony włóknistej gałki ocznej, która stosunkowo często ulega różnym schorzeniom, a ponieważ jest to struktura przezierna przez którą przechodzi światło w drodze do siatkówki, jej uszkodzenia prowadzą do ograniczenia możliwości widzenia a nawet do jej całkowitej utraty. Schorzenia rogówki powodowane są czynnikami zakaźnymi, chemicznymi, fizycznymi i prowadzą one do jej uszkodzeń, często o trwałym charakterze. Zmniejszenie przezierności rogówki powodować mogą też zmiany związane z wiekiem. Uszkodzenia tego narządu stanowią ważny problem natury klinicznej. Stosowane są zróżnicowane metody ich leczenia takie jak zabiegi chirurgiczne czy farmakoterapia ale niestety nie zawsze przynoszą one pożądanego efekt. Wraz z rozwojem zastosowania w leczeniu komórek macierzystych zaczęto stosować je w medycynie ludzkiej i w weterynarii, w tym również w okulistyce w leczeniu schorzeń rogówki. Pozyskanie komórek macierzystych może napotkać pewne trudności i ograniczenia (np. natury prawnej czy etycznej). Tak więc podjęcie próby uzyskania komórek macierzystych z niewielkiego fragmentu rąbka rogówki a następnie namnożenie ich w celu wykorzystania do terapii schorzeń tego narządu, szczególnie do przeszczepów autogenicznych najmniej narażonych na

komplikacje pooperacyjne, jak też porównanie różnych metod ich pozyskiwania, uzasadnia celowość podjętych badań.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza została przygotowana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku na 183 stronach formatu A4. Układ pracy jest tradycyjny i zawiera: spis treści, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, listę użytych w pracy skrótów, piśmiennictwo i w rozdziale suplement skany protokołów pobranego materiału.

W niezwykle obszernym wstępie zawartym na 50-ciu stronach manuskryptu doktorant poruszył 12 zagadnień zawartych w 12-tu podrozdziałach. Zagadnienia te obejmują anatomie, histologię, fizjologię, histopatologię, gojenie uszkodzeń, procesy starzenia, leczenie farmakologiczne i chirurgiczne oraz użycie komórek macierzystych pochodzących z macierzy zrębu, śródbłonna i rąbka oraz egzostomy rogówki. Omówiono też znaczenie kliniczne mezynchymalnych komórek macierzystych pnia rąbka rogówki oraz sposoby ich implantacji.

Przeprowadzona analiza obecnego stanu wiedzy pozwoliła Doktorantowi na zaprojektowanie badań i sformułowanie celów pracy a mianowicie: opracowanie bezpiecznego procesu pozyskiwania rąbka rogówki od psa i kota domowego, opracowanie powtarzalnej metody izolacji i hodowli komórek rąbka rogówki i opracowanie metody wytwarzania prototypu produktu inżynierii tkankowej przeznaczonego do regeneracji struktur rogówki uszkodzonych na skutek skomplikowanych wrzodów rogówki oraz do leczenia nieprzeziernych blizn po zakończeniu procesu gojenia.

W następnym rozdziale zawartym na 32-óch stronach manuskryptu Doktorant przedstawia informację dotyczącą zgody na pobranie rąbka rogówki do badań oraz opisuje etapy realizacji pracy doktorskiej. Nie zamieszczono informacji o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej na wykorzystanie zwierząt i tkanek użytych w badaniach, ale w przypadku użycia tkanek pochodzących od zwierząt poddawanych rutynowym procederom medycznym w zakładach leczniczych taka zgoda nie jest wymagana.

Autor w tym rozdziale opisuje dwie części: kliniczną i laboratoryjną. W pierwszej opisuje dawców w formie tabeli zawierającej dane poszczególnych zwierząt (gatunek, wiek, rasę, płeć, występujące choroby okulistyczne bądź ogólne, stosowane leczenie powód enukleacji bądź śmierci) oraz miejsce i czas pobrania materiału. Badania przeprowadzono na 20-tu zwierzętach (8-miu kotach i 12-tu psach). Zwierzęta w trakcie leczenia poddane były badaniom diagnostycznym (morfologia - 16 parametrów i badania biochemiczne krwi - 16

parametrów) i wyniki te są podane w manuskrypcie. Pozwala to na ocenę stanu zdrowia poszczególnych pacjentów. Następnie Doktorant opisuje technikę pobierania rąbka rogówki oraz sposób zabezpieczenia pobranego materiału na czas transportu. Opis jest zaopatrzonej w bogatą dokumentację fotograficzną co znacząco ułatwia prześledzenie i zrozumienie poszczególnych kroków. W części laboratoryjnej opisywanych metod Autor dokładnie przedstawia użyte odczynniki i materiały. Podaje również skład pożywki transportowej, roztworu do dekontaminacji, enzymatycznej izolacji komórek, roztworu do opłaszczania oraz pożywki wzrostowej stosowanej po izolacji komórek. Transport pobranych fragmentów rąbka rogówki odbywał się w ciągu maksymalnie 72h do laboratorium. Część pobranego materiału przeznaczano do oceny histologicznej. Autor opisuje technikę utrwalania i wykonania skrawków i barwień histologicznych.

Następnie Doktorant opisuje bardzo dokładnie zastosowane sposoby izolacji komórek. Dane te zostały również przedstawione w formie schematów blokowych co ułatwia prześledzenie poszczególnych etapów. Opisano także przydatność różnych odczynników do opłaszczania powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek, sposób oceny czasu podwojenia komórek izolowanych z rąbka rogówki, sposób oceny przyżyciowego badania żywotności komórek, metodę różnicowania tych komórek z użyciem różnych pożywek hodowlanych i sposób oceniony ekspresję kilku (4) antygenów powierzchniowych. Przedstawiono też metodykę oceny ekspresji antygenów powierzchniowych w cytometrii przepływowej. Sporo miejsca Autor poświęcił na dokładny opis metodyki wytworzenia prototypu produktu inżynierii tkankowej po postacią płatków kolagenowych opłaszczonych komórkami. W wielu miejscach opis metodyki wzbogacony jest o schematy blokowe i tabelaryczne zestawienia poszczególnych etapów wykonanych badań. Ten bardzo dokładny opis procedur pozwoli na odtworzenie przeprowadzonych badań.

W następnym rozdziale zawartym na 34-ch stronach manuskryptu Doktorant szczegółowo opisuje uzyskane wyniki. Przedstawia szczegółowo charakterystykę dawców oraz wyniki ich badań klinicznych: morfologicznych krwi i biochemicznych surowicy. Wyniki przedstawiono w tabelach z zaznaczeniem wartości, które wykraczały poza normy. Pozwala to szybko zorientować się w stanie zdrowia dawców. Następnie przedstawiono wyniki badań histologicznych rąbka rogówki. Uzyskane wyniki zobrazowano kilkoma dobrej jakości mikrofotografiami.

Następnie Doktorant przedstawił wyniki izolacji komórek. Oceniono wpływ czasu od pobrania na izolację komórek i stwierdzono, że przeprowadzenie skutecznej izolacji możliwe jest do 72h od pobrania rąbka rogówki. Przedstawiono też wyniki różnych metod izolacji i

stwierdzono, że najlepsze wyniki uzyskano stosując izolacje mechaniczną przez pocięcie tkanek z późniejszym trawieniem enzymatycznym. Określono najlepszą pożywkę hodowlaną dla komórek rąbka rogówki z pośród 6-ciu badanych. Wszystkie te wyniki zebrano i przedstawiono w formie tabeli. Następnie Autor przedstawił wyniki opłaszczania powierzchni wzrostowej dla poprawy izolacji komórek oraz wyniki oceny czasu podwojenia komórek. Uzyskane wyniki udokumentował fotografiami. W następnym podrozdziale Autor przedstawił wyniki charakterystyki komórek wyizolowanych z rąbka rogówki. Przy użyciu barwień histologicznych (Alizarin Red, Oil Red O i Alcian Blue potwierdzono potencjał różnicowania uzyskanych komórek. Wyniki udokumentowano fotografiami. W celu odróżnienia komórek macierzystych od innych komórek rąbka rogówki wykonano barwienia ICC, które pozwoliły ocenić ekspresję antygenów takich jak ABCG2, P63, cytokeratyna 3/2p, cytokeratyna 12. Obecność licznych komórek immunoreaktywnych dla ABCG2 i P63 potwierdziła skuteczność izolacji komórek macierzystych. Wyniki udokumentowano fotografiami. Badania z użyciem cytometru przepływowego potwierdziły, że wyizolowane komórki spełniają kryteria dla komórek macierzystych. Opisano też uzyskanie płatka kolagenowego zasiedlonego przez liczne komórki macierzyste, który wykorzystano w terapii eksperymentalnej w leczeniu przewlekłego zapalenia rogówki u kota. Uzyskane wyniki potwierdza dokumentacja fotograficzna.

W rozdziale "Dyskusja" zawartym na 15-stu stronach manuskryptu Autor przedstawił zastosowanie komórek macierzystych wyizolowanych z różnych narządów w leczeniu schorzeń rogówki jak też inne metody z zastosowaniem przeszczepów. Poruszył też kwestie terapii eksperymentalnych i związanych z nimi kwestii etycznych.

Następnie Autor sformułował 5 wniosków podsumowujących przeprowadzone badania i uzyskane wyniki:

1. Opracowano protokół pobierania materiału pozwalający na wykorzystanie go do hodowli komórkowych.

2. W toku przeprowadzonych badań ustalono, że możliwe jest namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym komórek LMSC pobranych z rąbka rogówki psa i kota.

3. Wykazano, że możliwe jest pobranie, namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym LMSC pozyskanych również od pacjentów w zaawansowanym wieku oraz od pacjentów, których oko donorowe objęte było procesem chorobowym jak jaskra i rozległy wrzód rogówki.

4. Na jakość pozyskanego od dawcy materiału komórkowego nie miały istotnego wpływu także choroby poza okulistyczne występujące u dawców w chwili obrania fragmentu rąbka.

5. Opracowano w pełni powtarzalną metodę przygotowania materiału nośnikowego z jednorodną warstwą komórek macierzystych pochodzących z rąbka rogówkowego (LMSC), który może być implantowany na rogówkę.

Manuskrypt zawiera też streszczenie pracy w języku polskim i angielskim zawarte na trzech stronach każde.

Autor w pracy cytuje bardzo bogate piśmiennictwo w liczbie 302 pozycji. Publikacje te pochodzą w większości z okresu pomiędzy rokiem 2000-nym a 2023-tym. Z jednej strony świadczy to dużej wiedzy Doktoranta i znajomości najnowszej literatury dotyczącej badanego zagadnienia z drugiej o aktualności podjętych badań.

Z obowiązku recenzenta chciałbym podzielić się kilkoma uwagami krytycznymi, które nasunęły mi się w trakcie przygotowywania niniejszej recenzji.

W bardzo dokładnym opisie budowy histologicznej rogówki Autor przywołuje klasyczny opis 5-cio warstwowej budowy rogówki, pomijając niedawne odkrycia w tej materii. Mianowicie w 2017 roku Harminder Dua z Uniwersytetu w Nottingham odkrył nową warstwę rogówki (na jego cześć nazwano ją warstwą Duy). Jest to stosunkowo cienka błona zlokalizowana między istotą właściwą a blaszką graniczną tylną. Mimo że ma zaledwie 15 mikrometrów grubości, jest bardzo twarda i wytrzymała - wytrzymuje ciśnienia rzędu 1,5-2 barów. Budzi ona duże zainteresowanie badaczy i tak np. według autorów artykułu z pisma *Ophthalmology*, zniszczeniem warstwy Duy można wyjaśnić m.in. ostry obrzęk rogówki ze stożkiem rogówki.

Doktorant w swojej pracy nie ustrzegł się drobnych błędów i tak na stronie 48 na której opisano sposób regeneracji nabłonka rogówki w linii 8 kierunek utraty komórek określono jako Y a powinno być Z. Rozdział "Wstęp" jest niezwykle obszerny, autor podzielił się z czytelnikami swoją ogromną wiedza na temat rogówki opisując jej budowę, fizjologię i patologię tego narządu. Uważam, że ten rozdział można znacząco skrócić koncentrując się na zagadnieniach bezpośrednio związanych z tematem pracy. Jestem też przekonany, że nastąpi to w trakcie przygotowywania pracy do druku.

Najwięcej jednak uwag mam do metodyki zastosowanej w pracy a szczególnie do metodyki barwień ICC. Na str. 83 autor opisuje metodykę blokowania niespecyficznych wiązań z użyciem BSA. Roztwór blokujący powinien być wzbogacony o normalną surowicę gatunku,

na którym uzyskano przeciwciała wtórne, w tym przypadku surowice kozią, co pozwoli wyeliminować niespecyficzne wiązanie przeciwciał wtórnych a tym samym poprawić jakość uzyskanych barwień.

Następna dość istotna sprawa, która może mieć duże znaczenie w trakcie publikacji uzyskanych wyników to brak wzmianki na temat prób specyficzności reakcji immunohistochemicznych. Należy wykonać co najmniej próby ominięcia i zastąpienia, co potwierdzi specyficzność wykonanych barwień. Osobiście jestem przekonany, że uzyskane wyniki są specyficzne o czym świadczą prezentowane fotografie, niemniej jednak w trakcie przygotowania pracy do druku należy tą kwestię uzupełnić.

W trakcie zapoznawania się z manuskrytem nasunęło mi się kilka pytań związanych z uzyskanymi wynikami.

Po pierwsze, skoro najlepszy wzrost komórek stwierdzono w przypadku użycia pożywki NutriSteam, to dlaczego do dalszych badań wybrano pożywkę  $\alpha$ -minimum Essential Medium. Na stronie 105 zamieszczono tabelę nr 13. W pozycji 2 dostrzegłem pewną nieścisłość a mianowicie ilość komórek powinna wynosić 10 milionów albo 0,1 na ampulkę.

Na stronie 121 opisano przeszczep wytworzonego prototypu skafoldu u jednego kota. Niestety nie pisano przebiegu procesu leczenia, nie wiadomo czy przeszczep się przyjął i jaki był efekt leczenia, a budzi to wielką ciekawość u czytelnika, bo w pewnym sensie stanowi to ukoronowanie przeprowadzonych badań.

Nasuwa mi się również pewna uwaga dotycząca przeprowadzonej dyskusji. Autor przytacza informacje dotyczące zastosowania komórek macierzystych różnego pochodzenia ale nie konfrontuje tych rezultatów z uzyskanymi w niniejszej dysertacji. Bardzo brakowało mi tego aspektu dyskusji.

Ostatnia uwaga dotyczy cytowanej literatury. Niektóre pozycje zamieszczone w spisie literatury są niekompletne i brak jest najczęściej roku publikacji, numeru woluminu i stron a czasem nawet tytułu czasopisma. Dotyczy to np. pozycji 54, 216, 219, 220, 225, 268. Jeśli są to czasopisma wydawane w internecie to należy zamieścić przynajmniej nr doi.

Dostrzeżono też drobne potknięcia stylistyczne i błędy językowe. Wszystkie te uwagi nie umniejszają wartości naukowej opracowania Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza, które oceniam bardzo wysoko. Co więcej będzie stosunkowo łatwo skorygować te niedociągnięcia w trakcie redagowania pracy do druku.

Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z dysertacją Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza stwierdzam, że Autor posiada w stopniu więcej niż zadowalającym umiejętność planowania badań, znajomość warsztatu metodycznego, potrafi uzyskane wyniki przelać na papier i w sposób właściwy interpretować.

Chciałbym również, ze względu na ogrom włożonej w przygotowanie tej dysertacji pracy, jej nowatorski charakter oraz jej znaczącą wartość merytoryczną i przede wszystkim praktyczną, wniesić do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza pt. „Izolacja, hodowla i charakterystyka mezynchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej” odpowiada warunkom określonym w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2018 poz. 1668) i przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Pawła Stefanowicza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Dr hab. Waldemar Sienkiewicz prof. UWM

