



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski  
Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka  
Zakład Immunopatologii i Biologii Molekularnej  
ul. Bujwida 44, 50-345 Wrocław

### 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.

Rozprawa doktorska lek. wet. Krzysztofa Buczaka omawia, istotne z biologicznego i terapeutycznego punktu widzenia zagadnienia, dotyczące regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej u owiec. Biorąc pod uwagę wciąż mocno ograniczone metody leczenia zmian zwyrodnieniowych stawów u zwierząt i ludzi istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych.

Praca doktorska zawiera 115 stron podzielonych na konwencjonalnie przyjęte rozdziały, które ilustruje 40 rycin, 9 tabel i 161 pozycji właściwie dobrane i cytowanego piśmiennictwa, które umożliwia konfrontację wyników badań Doktoranta z wynikami innych autorów oraz podjęcie merytorycznej dyskusji. Warto nadmienić, że znaczna część cytowanego piśmiennictwa, to prace opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (IF). Wstęp pracy doktorskiej rozpoczyna zwarty opis struktur i komponentów morfologicznych chrząstki stawowej oraz jej funkcji ze szczególnym podkreśleniem składu macierzy międzykomórkowej. Opisując fizjologiczną rolę chrząstki stawowej, Doktorant zwraca uwagę na istotę wzajemnych oddziaływań pomiędzy poszczególnymi składowymi tkanki chrzęstnej takimi jak, włókna kolagenowe oraz cząsteczki proteoglikanów. Autor szczegółowo omawia diagnostykę oraz standardowe metody leczenia ubytków tkanki chrzęstnej u zwierząt. Podkreśla, że powszechnie stosowane nieinwazyjne metody leczenia takie jak: fizjoterapia, rehabilitacja, farmakoterapia prowadzą

do zmniejszenia dyskomfortu związanego z bólem ale nie skutkują wyleczeniem urazu chrząstki stawowej i w wielu przypadkach należy zastosować leczenie operacyjne. Doktorant dużo uwagi poświęca opisom metod leczenia z zastosowaniem autogennych przeszczepów chrzęstno-kostnych, autogennych chondrocytów oraz implantów, składających się z membrany z naniesionymi chondrocytami lub komórkami macierzystymi. Ostatnią częścią wstępu dysertacji są rozważania na temat możliwości wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) w medycynie weterynaryjnej. Dużo uwagi również poświęca charakterystyce komórek macierzystych pobranych z różnych tkanek oraz ich potencjał terapeutycznym. Zdaniem Doktoranta, pomimo wykazania potencjału regeneracyjnego komórek macierzystych w leczeniu wielu schorzeń, w tym schorzeń zwyrodnieniowych stawów, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt ich wykorzystanie jest ograniczone z powodu restrykcyjnych regulacji prawnych oraz procedur dotyczących przygotowania MSCs. Doktorant uważa, że rozwiązaniem tego problemu mogą być bioaktywne czynniki wydzielane przez komórki macierzyste do podłoża w trakcie ich hodowli. Szczególną uwagę zwraca na możliwość wykorzystania mikropęcherzyków izolowanych z komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej. Warto zaznaczyć, że Doktorant wnikliwy i przekonujący sposób uzasadnia celowość podjętych badań, będących podstawą Jego pracy doktorskiej. Podkreśla, że w dotychczasowym piśmiennictwie brak jest opracowań, dotyczących zaproponowanego w pracy doktorskiej modelu badawczego, który umożliwi wykazanie potencjału regeneracyjnego rusztowań z umieszczonymi na ich powierzchni mikropęcherzykami i/lub komórkami macierzystymi w regeneracji ubytków chrząstki stawowej u owiec.

Głównym celem pracy doktorskiej była ocena miejscowej i ogólnej reakcji organizmu owcy na leczenie doświadczalnie wytworzonego ubytku chrząstki stawowej szklistej stawu kolanowego skafoldem kolagenowym nasączonym: autologicznymi mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSCs); lub autologicznymi mikropęcherzykami (MVs) pochodzącymi z BM-MSCs.

Do realizacji głównego celu pracy doktorskiej, Autor sformułował 4 zadania badawcze, które zostały w pełni zrealizowane.

Problem badawczy, który Autor zamierzał rozwiązać wpisuje się w nowoczesny nurt badań z zakresu medycyny regeneracyjnej dotyczący wykorzystania inżynierii tkankowej w leczeniu chrząstki stawowej, zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Należy z uznaniem stwierdzić, że realizacja postawionych celów badawczych wymagała, nie tylko dobrego przygotowania

merytorycznego oraz opanowania metod badawczych, ale również ogromnego nakładu pracy i czasu.

Opis części metodycznej pracy jest na tyle obszerny, że pozwala na dokładną analizę przyjętej metodologii oraz zastosowanych metod i technik badawczych. Do realizacji nakreślonych zadań, Doktorant posłużył się modelem zwierzęcym, składającym się z 16 owiec rasy Merynos polski, które podzielono na 4 grupy badawcze: pierwszą grupę stanowiły owce, u których nie wykonano żadnej procedury chirurgicznej, w drugiej, trzeciej i czwartej grupie owiec wykonano zabieg artrotomii prawego stawu kolanowego. W grupie drugiej do ubytku wprowadzono skafold nasączony płynem fizjologicznym, w trzeciej zastosowano skafold nasączony autologicznymi mikropęcherzykami wyizolowanymi z BM-MSCs, w czwartej zaimplantowano skafold nasączony autologicznymi BM-MSCs. Metodologia badań została dobrze zobrazowana. Usystematyzowanie i udokumentowanie w postaci licznych fotografii poszczególnych etapów eksperymentalnych badań klinicznych, nie tylko obrazuje chronologię prowadzonych eksperymentów, ale utwierdza w przekonaniu, że Doktorant posiada dobre przygotowanie merytoryczne w planowaniu eksperymentów badawczych. Jednym elementem metodologii, który wymagałby szerszego omówienia jest sposób przygotowania bioimplantów. Dobór modelu eksperymentalnego, wybór membrany, rodzaj bioaktywnych komponentów połączonych z membraną oraz wachlarz wykonanych analiz, umożliwił Autorowi uzyskanie wyników potwierdzających potencjał regeneracyjny analizowanych bioimplantów w leczeniu ubytków chrząstki stawowej u owiec. Praca jest dobrze opracowana statystycznie z odpowiednio dobranymi testami obliczeniowymi.

Wyniki badań to obszerny rozdział pracy doktorskiej, który Doktorant rozpoczyna od zobrazowania wyników badań tomografii komputerowej stawu kolanowego wykonanej bezpośrednio po zabiegu operacyjnym oraz 90 i 180 dni po zabiegu. W oparciu o wyniki tomografii komputerowej, Autor wykazał, że proces regeneracji eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego bloczka kości udowej zachodził znacznie szybciej u owiec w grupie III, w której zastosowano skafold nasączony mikropęcherzykami oraz w IV, po zaimplantowaniu skafoldu połączonego z komórkami macierzystymi, aniżeli w grupie II, w której do ubytku wprowadzono skafold nasączony roztworem soli fizjologicznym. Przeprowadzając ocenę makroskopową stawu kolanowego w 4 badanych grupach owiec, Autor nie wykazał istotnych różnic w ocenie stawu kolanowego, natomiast wypełnienie ubytku chrząstki stawowej bloczka kości udowej było pełniejsze w III i IV grupie aniżeli w II grupie owiec. Opierając się na 14-punktowej zmodyfikowanej skali ICRS zaproponowanej



przez Międzynarodowe Towarzystwo Chorób Chrząstki, Doktorant przeprowadził ocenę mikroskopową powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu powstałego ubytku chrzęstno-kostnego w badanych grupach owiec wykazując, że najlepszy efekt terapeutyczny uzyskał u owiec po zastosowaniu skafoldu nasączonego mikropęcherzykami. Ocena cech morfologicznych nowo powstałych tkanek w obrębie regenerowanego ubytku jednoznacznie wykazała, że rodzaj bioaktywnej składowej skafoldu wpływa na wynik leczenia. Dokonując analizy porównawczej oceny mikroskopowej powierzchni stawowej bloczka kości udowej w miejscu regenerowanego ubytku chrzęstno-kostnego u owiec według 14-punktowej skali ICRS, Autor stwierdził, że zastosowanie wyłącznie membrany kolagenowej do regeneracji ubytku chrząstki stawowej daje słaby efekt terapeutyczny określony na 10,5/34,0 punktów w skali ICRS. Interesującą obserwacją było wykazanie najlepszego efektu terapeutycznego według skali ICRS (25,0/34,0 punktów) w grupie III po zastosowaniu skafoldu nasączonego mikropęcherzykami i nieznacznie słabszego w grupie IV (21,0/34,0 punktów). Grupę III charakteryzowało między innymi lepsze wypełnienie przestrzeni ubytku przez nowopowstałą tkankę łączną, wyższy rozrost tkanki łącznej oraz wzmożona angiogeneza w porównaniu do II i IV grupy owiec. Cennym uzupełnieniem oceny mikroskopowej potencjału regeneracyjnego poszczególnych implantów, była analiza parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi owiec w różnych przedziałach czasowych po zabiegu operacyjnym. Obserwowane nieznaczne odchylenia od wartości referencyjnych między innymi, liczby białych krwinek, płytek krwi oraz stężenia białka całkowitego, albuminy i enzymów wątrobowych w początkowym okresie obserwacji zdaniem Autora mogą być wynikiem terapii przeciwzapalnej i przeciwbólowej, jak i reakcji obronnej organizmu na wykonane procedury chirurgiczne.

Wielowątkowa i dobrze merytorycznie opracowana pierwsza część dyskusji, dotycząca roli komórek macierzystych i ich pochodnych w regeneracji ubytków chrząstki stawowej u zwierząt oparta o najistotniejsze pozycje piśmiennictwa jest dobrze przedstawiona. Autor umiejętnie interpretuje wyniki badań własnych w relacji z danymi innych autorów, wskazując na poznawczy charakter prowadzonych badań. Doktorant z dużą rozwagą interpretuje wyniki badań własnych podkreślając, że zastosowane podejście terapeutyczne ma istotny wpływ na proces regeneracji powierzchni chrząstki stawowej u owiec. Natomiast druga część dyskusji, to szczegółowe przedstawienie wyników badań oceny mikroskopowej nowopowstałej chrząstki stawowej oraz odpowiedzi organizmu owcy na wprowadzony bioimplant. Ta część dyskusji wymagałaby skondensowanego omówienia

uzyskanych wyników i ich znaczenia w odniesieniu do wyników innych autorów. W mojej opinii ryciny 36,37,38,39,40 powinny zostać zaprezentowane w rozdziale wyniki. Podsumowaniem dyskusji jest logiczne uzasadnienie celowości prowadzenia dalszych badań, które zdaniem lek. wet. Krzysztofa Buczaka umożliwiłyby opracowanie protokołów postępowania do zastosowania inżynierii tkankowej w medycynie weterynaryjnej. Z przeprowadzonych badań i konfrontacji uzyskanych wyników z obserwacjami innych autorów, Doktorant formułuje 4 wnioski końcowe. Są one z jednej strony odpowiedzią na jasno sprecyzowane cele badawcze, z drugiej stanowią wartościowe wskazówki do podjęcia dalszych badań.

W uwagach krytycznych chciałabym zaznaczyć, że obok podania liczby MSCs i MVs określenie gęstości MSCs oraz MVs na powierzchni skafoldu stanowiłoby dodatkowy parametr charakteryzujący bioimplant. Standardem w terapii komórkowej, jak i w inżynierii tkankowej jest określenie podstawowego immunofenotypu MCSs. Wyniki badań dobrze obrazują proces regeneracji tkanki chrzęstnej, jednak cennym uzupełnieniem byłoby określenie stanu funkcjonalnego nowopowstałej tkanki między innymi poprzez ocenę kolagenu typu I i II.

**Podsumowanie.** Zakres badań realizowany przez Kandydata w ramach pracy doktorskiej jest nowatorski, wyniki badań dostarczyły nowych i oryginalnych danych, które stanowią uzupełnienie istniejącego stanu wiedzy z zakresu medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej w medycynie weterynaryjnej. Należy podkreślić, że wyniki dotyczące określenia potencjału regeneracyjnego analizowanych bioimplantów w leczeniu ubytków chrząstki stawowej u owiec stanowią podstawę do dalszych badań w obszarze medycyny translacyjnej. Wyniki Doktoranta mają znaczenie, nie tylko dla nauki, ale mogą przyszłościowo zostać wykorzystane w praktyce klinicznej, celem zwiększenia możliwości terapeutycznych w leczeniu zmian zwyrodnieniowych w obrębie stawów u zwierząt, a perspektywicznie również u ludzi. Wykazanie potencjału regeneracyjnego mikropęcherzyków komórek macierzystych szpiku w połączeniu z membraną kolagenową otwiera nowe możliwości w projektowaniu bioimplantów. Uważam, że praca doktorska lek. wet. Krzysztofa Buczaka jest wartościowym i nowatorskim opracowaniem, wnosi istotny wkład w opracowanie alternatywnych terapii w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej i pomimo uwag krytycznych, które nie obniżają jej nowatorskich aspektów zasługuje na wyróżnienie.

Praca doktorska lek. wet. Krzysztofa Buczaka 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.). Na tej podstawie przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Krzysztofa Buczaka do dalszych etapów w przewodzie doktorskim i wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Wrocław, 12 czerwiec 2023 r.

Prof. dr hab. Julia Bar  
