

dr hab. Bogusława Żywicka

Wrocław, 30.08.2023

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Centrum Badań Przedklinicznych

Wyb. Ludwika Pasteura 1, 50-367 Wrocław

Tel.71 7840132

e-mail: bogusława.zywicka@umw.edu.pl

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
04 -09- 2023
I. dz.....zał.....
znak sprawy:

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Pawła Stefanowicza

nt: „Izolacja, hodowla i charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej”

Promotor: prof. dr hab. Maciej Janeczek

Promotor pomocniczy: dr Tomasz Gębarowski

I. Informacje formalno-prawne

Podstawę do wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 30 maja 2023r. i pismo zlecające podpisane przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego.

Recenzję przedłożonego egzemplarza rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Stefanowicza wykonano zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187. Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Art. 187. [Rozprawa doktorska]

1. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej.
2. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.
3. Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej.

4. Do rozprawy doktorskiej dołącza się streszczenie w języku angielskim, a do rozprawy doktorskiej przygotowanej w języku obcym również streszczenie w języku polskim. W przypadku gdy rozprawa doktorska nie jest pracą pisemną, dołącza się opis w językach polskim i angielskim.

II. Przedmiot recenzji

Recenzja dotyczy rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Stefanowicza z Przychodni Weterynaryjna „Retina” (Kraków) nt: „Izolacja, hodowla i charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej”, która przygotowana została na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Katedrze Biostruktury i Fizjologii Zwierząt, pod opieką prof. dr hab. Macieja Janeczka jako promotora oraz dr Tomasza Gębarowskiego jako promotora pomocniczego.

III. Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona rozprawa doktorska opracowana została w języku polskim w formie wielostronicowej monografii-książki zawierającego 183 strony, streszczenie w językach polskim i angielskim. Praca posiada klasyczny układ z podziałem na wstęp (z dwunastoma podjednostkami), rozdziały definiujące założenia i cele pracy, materiały i metody (z dwoma podrozdziałami), wyniki (z czterema podrozdziałami). Dalej wydzielone zostały dyskusja, wnioski, indeks skrótów, wykaz piśmiennictwa. Doktorant przywołał 302 pozycje piśmiennictwa uporządkowane alfabetycznie. Pozycje literaturowe przywołane w głównym tekście zostały wymienione w spisie piśmiennictwa.

Wysoka liczba pozycji piśmiennictwa, staranność doboru i aktualność pozycji literaturowych dowodzą głębokiej znajomości teoretycznej zagadnień związanych z tematyką doktoratu. Zawartość rozdziałów z zakresu badań laboratoryjnych i klinicznych świadczy o bardzo wysokich kompetencjach praktycznych Doktoranta. Rozprawę doktorską zamyka suplement zawierający skany 20 protokołów z pobrania materiału biologicznego od psów i kotów sporządzonych w przychodni weterynaryjnej „Retina” (Kraków). Pod względem formalnym praca autorstwa lek. wet. Pawła Stefanowicza w pełni spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawie doktorskiej.

IV. Oryginalność problemu naukowego i cele badawcze

Współczesna medycyna regeneracyjna sięga po interdyscyplinarne metody dla uzyskania nowych terapii niwelujących skutki urazów i chorób, a także przedłużających lub podnoszących jakość życia ludzi. Wykorzystuje się przy tym zintegrowane metody, między innymi inżynierii tkankowej, gdzie połączenie np. autologicznego (własnego) materiału

biologicznego odpowiednio dobranym pod względem chemicznym, ale i strukturalnym biomateriałem, po ponownym wszczepieniu do organizmu biorcy może skutecznie nie tylko czasowo, ale i trwale zastąpić tkanki i narządy. Badania nad biokompatybilnością i doбором rodzaju biomateriału do rusztowań tj. skafoldów oraz doбором komórek do ich zasiedlenia przed implantacją w żądane lokalizacje w organizmie, trwają od wielu lat. Opracowano biomateriały naturalne, syntetyczne trwałe lub resorbowalne o eksperymentalnie potwierdzonej porowatości, odpowiedniej dla wzrostu i różnicowania się komórek. Początkowo wiele nadziei wiązano z uniwersalnymi liniami komórkowymi pochodzenia ksenogenicznego lub allogenicznego. Nie wykazywały one jednak pożądanego wzrostu, rozwoju i dalszego różnicowania się w zasiedlonych nimi skafoldach po ich implantacji do organizmu biorcy. Przełomem było zidentyfikowanie oraz izolowanie z różnych tkanek organizmu, mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) nazywanych też komórkami pnia. Badania nad ich potencjałem biologicznym ciągle trwają i wpisują się w terapie najnowszych generacji. W okulistyce zaproponowano wstępnie komercyjną technikę izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych rogówki i po zasiedleniu nimi skafoldów, ponownym wszczepieniu do rogówki u ludzi. W wyniku głębokich ubytków lub przewlekłych trudno gojących zmian chorobowych, rogówka może stracić przezierność, upośledzając zdolności wzrokowe w przebiegu choroby u ludzi jak i u zwierząt.

Model zaproponowany w badaniach będących przedmiotem rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Stefanowicza jest ambitnym, nowatorskim opracowaniem innowacyjnej terapii i wprowadzeniem jej do praktyki okulistyki weterynaryjnej. Obejmuje ona leczenie chorobowych i urazowych zmian w rogówce z użyciem odpowiednio dobranego skafoldu, zasiedlonego mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pnia (LSCM) wyizolowanymi z rąbka rogówki zwierząt.

Dla rozwiązania tego problemu naukowego Doktorant postawił sobie następujące cele szczegółowe:

- a. Opracowanie bezpiecznego procesu pozyskiwania wycinka rąbka rogówki od psa domowego (*Canis lupus familiaris*) i kota (*Felis catus*)
- b. Opracowanie powtarzalnej metody izolacji i dalszej hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych rąbka rogówki
- c. Opracowanie metody wytwarzania prototypu skafoldu - produktu inżynierii tkankowej

V. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Badania mają charakter prac eksperymentalnych i poprzedzone zostały pogłębionymi analizami i badaniami różnic w anatomii i grubości rogówki u różnych zwierząt domowych, wyborowi lokalizacji miejsca bezpiecznej izolacji materiału biologicznego, opracowaniem techniki powtarzalnej izolacji i hodowli komórek macierzystych LMSC, wreszcie wszczepieniu prototypu skafoldu z LMSC do rogówki kota.

W wieloczęściowym uporządkowanym, podzielonym na podrozdziały wstępie, autor opisuje w szerokim kontekście budowę, histofizjologię, sposoby leczenia chorób rogówki u wybranych zwierząt domowych. Dalej obszernie analizuje użycie i kliniczne znaczenie mezenchymalnych komórek macierzystych pnia z rąbka rogówki, wykazując szeroką ogólną wiedzę teoretyczną nie tylko w dyscyplinie naukowej weterynaria, ale i z zakresu nowoczesnych technik hodowli *in vitro*. W dziale „materiały i metody” autor podaje, że wycinki rąbka rogówki pobierano w górnym jej biegunie od 20 zwierząt, w tym 8 kotów i 12 psów, podczas eutanazji wykonanych z przyczyn innych niż okulistyczne. Załączone dane z badań parametrów krwi dawców wskazują na zróżnicowany stan zdrowotny zwierząt, które różniły także płeć i wiek. Z fragmentów pobranych bioptatów, dostarczanych w pożywce transportowej w czasie 72h w od pobrania, wykonywano badania histologiczne, pozostały materiał biologiczny przeznaczano do dalszych procedur laboratoryjnych. Izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych pnia z rąbka rogówki odbyła się w wielostopniowym procesie, który jest także znaczącym osiągnięciem tej pracy.

Podczas izolacji wykonano badania laboratoryjne weryfikujące wpływ czasu na skuteczność i efektywność izolacji komórek macierzystych LMSC od punktu „0” tj. pobrania bioptatu do odczytu danych. Oceniano żywotność komórek, także przy użyciu formazanu i zdolności tworzenia kolonii po 7 dniach. Wykazano, że optymalny czas na skuteczne przeprowadzenie izolacji komórek z rąbka rogówki wynosi do 72h od pobrania bioptatu. Najskuteczniejszą metodą izolacji mezenchymalnych komórek z bioptatu z rąbka rogówki okazała się izolacja mieszana mechaniczno-enzymatyczna. Po procesach identyfikacji namnożonych komórek, opracowano skafold z użyciem kolagenu bydłęcego z komórkami uzyskanymi w procesie izolacji i hodowli LMSC z rąbka rogówki. Czas proliferacji, komórek w skafoldzie do właściwej ich gęstości wynosił 7dni, a ich żywotność w skafoldzie w warunkach chłodniczych 48h. Prototyp skafoldu został zaimplantowany w rogówkę kota.

W wyniku badań laboratoryjnych oraz klinicznych uzyskano następujące dane:

- a. Opracowany został protokół pobierania materiału z rąbka rogówki od kotów i psów do hodowli komórkowych tj. wyprowadzenia linii pierwotnej

- b. Wypracowano procedurę izolacji, namnożenia i dalszego zasiedlenia komórkami LMSC z rąbka rogówki resorbowalnego podłoża kolagenowego
 - c. Wykazano brak wpływu wieku zwierzęcia, procesów chorobowych związanych z jaskrą i rozległym wrzodem rogówki na efekty procedury izolacji, namnożenia i zasiedlenia LMSC na podłożu kolagenowym
 - d. Wykazano brak wpływu poza okulistycznych chorób towarzyszących na jakość pozyskanego materiału komórkowego z rąbka rogówki
 - e. Opracowano powtarzalną metodę przygotowania skafoldu, materiału nośnikowego z jednorodną warstwą mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z rąbka rogówkowego (LMSC), przeznaczonego do implantacji na rogówkę.
- Dane opracowane zostały statystycznie, udokumentowane zostały bardzo dobrej jakości makro i mikrografiami.

VI. Uwagi

Praca zawiera dużą ilość bardzo dobrze opracowanych i udokumentowanych danych i drobne potknięcia, które się zakradły, nie zmniejszają wagi merytorycznej ani starannego jej przygotowania pod względem edytorskim. W wykazie piśmiennictwa począwszy od pozycji literaturowej 211 układ alfabetyczny bywa zakłócony, z tego powodu w kilku przypadkach pozycje literaturowe są dwukrotnie powtórzone - dotyczy to pozycji 293, 279, 262, 290, 267, 226. Jedna pozycja cytowana w tekście głównym (McKay i inni) ze strony 47 nie znalazła się w wykazie piśmiennictwa. W tekście głównym podpisy umieszczone zostały nad tabelami, rycinami i wykresami, podczas gdy zazwyczaj jest przyjęte by ryciny i wykresy były podpisywane pod spodem. Choć dodać należy, że w różnych czasopismach stosowane są różne reguły.

VII. Podsumowanie końcowe

Pod względem merytorycznym rozprawę doktorską lek. wet. Pawła Stefanowicza oceniam bardzo wysoko. Wpisuje się ona i przyczynia do rozwoju najnowszych terapii w weterynaryjnej medycynie regeneracyjnej. Wypracowane standardy związane z techniką izolacji, hodowl i skutecznej charakterystyki mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki mają duży potencjał aplikacyjny w okulistyce weterynaryjnej. Przeprowadzone i opisane w rozprawie doktorskiej badania mają charakter bardzo dobrze zaplanowanych prac eksperymentalnych. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego planowania badań naukowych, skutecznością w ich realizacji, wyciąganiem wnikliwych wniosków, wykazując się przy tym głęboką wiedzą teoretyczną i wysokimi praktycznymi umiejętnościami laboratoryjnymi i chirurgicznymi. Założone główne tezy badań zostały

potwierdzone i zrealizowane, osiągnięta została pełna spójność założeń pracy badawczej z osiągniętymi wynikami i wyciągniętymi wnioskami. Problem naukowy z zakresu izolacji, hodowli i charakterystyki mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalnego zastosowania w okulistyce weterynaryjnej został rozwiązany w pracy w sposób oryginalny i może stanowić podstawę do dalszych prac eksperymentalnych. Praca ma nowatorski charakter w dyscyplinie naukowej weterynaria i dowodzi wysokiego przygotowania teoretycznego i ponad przeciętnego bardzo dobrego przygotowania praktycznego. Autor wykazał się wysoką znajomością literatury przedmiotu badań. Wskazać należy także na inspirujący i wysoki poziom merytoryczny opieki naukowej przy realizacji badań objętych rozprawą doktorską. Podsumowując rozprawa doktorska lek. wet. Pawła Stefanowicza nt:” Izolacja, hodowla i charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej” pod kierownictwem prof. dr hab. Maciej Janeczek i kierownictwem pomocniczym dr Tomasza Gębarowskiego wypełnia wymogi określone w art. 187. ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce dotyczące ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie naukowej weterynaria. W związku z tym wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Stefanowicza i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie zważywszy na oryginalność i wysoki poziom naukowy przedstawionych wyników badań wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.



dr hab. Bogusława Żywicka