

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Chirurgii

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikropęcherzykach
pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się
ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec.**

lek. wet. Krzysztof Buczak

Promotor

prof. dr hab. Zdzisław Kiełbowicz

Promotor pomocniczy

dr hab. Przemysław Prządka

Wrocław 2023

1. Streszczenie w języku polskim

Słowa klucz: mezenchymalne komórki macierzyste, mikropęcherzyki, inżynieria tkankowa, medycyna regeneracyjna, reparacja ubytku chrzęstno-kostnego, choroba zwyrodnieniowa stawów, osteoartroza

W doświadczeniu własnym oceniono wpływ mikropęcherzyków pochodzących z autologicznych BM-MSCs na reakcję ogólną organizmu i gojenie się eksperymentalnie wytworzonego ubytku chrzęstno-kostnego w bloczku kości udowej u owiec. W badaniu podzielonym na 2 etapy – 1) prefabrykacja BM-MSCs i MVs, 2) wszczepienie implantów – wykorzystano 16 zwierząt, gatunku owca domowa (łac. *Ovis aries*), samic, rasy Merynos polski, w wieku od 2 do 4 lat, o masie ciała od 43 do 66 kg. W celu badawczym zwierzęta podzielono 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 w celu izolacji i ekspansji autologicznych BM-MSCs i MVs śródoperacyjnie pobrano szpik kostny z bliższej nasady kości ramiennej. Następnie w drugim etapie badania u każdej owcy z grupy II, III i IV w trakcie artrotomii prawego stawu kolanowego wykonano ubytek chrzęstno-kostny o średnicy 6,5 mm i głębokości 10 mm w bloczku kości udowej. Ubytki wypełniono skafoldem kolagenowym, a następnie nasączono go odpowiednio 0,9% NaCl, MVs lub BM-MSCs.

Obserwacja u operowanych zwierząt trwała 180 dni. Bezpośrednio po zabiegach operacyjnych, a także w 90 i 180 dniu obserwacji wykonano kontrolne badanie tomografii komputerowej stawów kolanowych. Pośmiertnie u zwierząt przeprowadzono analizę makroskopową i mikroskopową okolicy ubytku chrzęstno-kostnego zlokalizowanego na powierzchni bloczka kości udowej. Do oceny ogólnej organizmu posłużono się badaniami morfologicznymi i biochemicznymi krwi wykonanymi bezpośrednio przed zabiegiem, a także w 3, 6 i 10 dobie po zabiegu operacyjnym.

W badaniach przesiewowych krwi obserwowano klasyczne dla stanu zapalnego związane z zabiegiem chirurgicznym podwyższenie liczby WBC i PLT we krwi obwodowej. Na podstawie wyników oceny mikroskopowej można stwierdzić pozytywny wpływ MVs i BM-MSCs na gojenie się i wypełnienie łoża ubytku nowo powstałą tkanką łączną w porównaniu do grupy II – kontrola pozytywna. Analiza statystyczna wyników oceny mikroskopowej wykazała istotne ($p \leq 0,05$) różnice między grupą III (MVs) i grupą IV (BM-MSCs), pod względem czterech ocenianych cech na korzyść grupy doświadczalnej III.

2. Abstract

Key words: mesenchymal stem cells, microvesicles, tissue engineering, regenerative medicine, regeneration of osteochondral defect, degenerative joint disease, osteoarthritis

In planned experiment, the effect of microvesicles from autologous BM-MSCs on the overall reaction of the body and the healing of an experimentally created an osteochondral defect in the trochlear groove in sheep was conducted and assessed. The study was divided into two stages: 1) prefabrication of BM-MSCs and MVs, 2) implantation - 16 animals of the domestic sheep (*Ovis aries*), females of the Polish Merino breed, aged 2 to 4 years, body weight from 43 to 66 kg. For the research purpose, the animals were divided into four groups: group I (2 sheep – negative control), group II (2 sheep – positive control, 0.9% NaCl), group III (6 sheep – MVs), group IV (6 sheep – BM-MSCs). In the first stage of the experiment, to isolate and expand autologous BM-MSCs and MVs, bone marrow was collected intraoperatively from the proximal epiphysis of the humerus. Then, in the second stage of the study, each sheep from groups II, III and IV had an osteochondral defect 6.5 mm wide and 10 mm deep in the trochlear groove during arthrotomy of the right knee joint. The cavities were filled with a collagen scaffold and then impregnated with 0.9% NaCl, MVs or BM-MSCs, respectively.

Observation in operated animals lasted 180 days. Immediately after the surgical procedures, and on the 90th and 180th day of observation, a control computed tomography examination of the knee joints was performed. Post-mortem, macroscopic, and microscopic analysis of the area of the osteochondral defect located on the surface of the femoral trochlea was performed in the animals. The general assessment of the body was based on morphological and biochemical blood tests performed immediately before the surgery, as well as on the 3rd, 6th, and 10th day after the surgery.

In blood screening tests, elevations of peripheral WBC and PLT counts, typical of surgical-related inflammation, were observed. Based on the results of microscopic scoring, it can be stated that MVs and BM-MSCs have a positive effect on regeneration and filling the defect with newly formed connective tissue compared to group II – positive control. Statistical analysis of the results of the microscopy scoring showed significant ($p \leq 0.05$) differences between group III (MVs) and group IV (BM-MSCs), in terms of four assessed features in favor of experimental group III.