

Prof. dr hab. Marek Galanty  
Katedra Chorób Małych Zwierząt i Klinika  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
SGGW, Warszawa

Warszawa, dnia 08.06.2023

## RECENZJA

**pracy 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 pod kierunkiem prof. dr hab. Zdzisława Kielbowicza i promotora pomocniczego  
dr hab. Przemysława Prządki

w Katedrze i Klinice Chirurgii na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu  
Przyrodniczego we Wrocławiu

Raz uszkodzona chrząstka stawowa u osobników dorosłych nie regeneruje się. Brak unaczynienia, unerwienia, wiskoelastyczność, specyficzna anizotropowa budowa oraz brak tzw. liniowości stanowią o szczególnej specyfice chrząstki i decydują o trudnościach jej regeneracji. Stale są opracowywane nowe metody terapeutyczne mające na celu poprawę wyników leczenia. Z jednej strony są to metody naprawcze prowadzące do powstania blizny włóknisto-chrzęstnej, a z drugiej - zabiegi zmierzające do zastąpienia uszkodzonej chrząstki materiałem który zapoczątkuje jej regenerację. Jednak mimo opracowania coraz to nowocześniejszych metod leczenia nadal nie udało się uzyskać regeneracji ubytków chrząstki stawowej. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem komórek macierzystych, czy też produktów inżynierii tkankowej w postaci rusztowań zasiedlonych mikropęcherzykami, do leczenia ubytków chrząstki stawowej. W tych okolicznościach cieszy wybór przez Doktoranta aktualnego tematu badawczego o wysokich walorach poznawczych a także potencjalnych

możliwościach aplikacyjnych jakim jest sprawdzenie przydatności gąbki kolagenowej nasączonej mezenchymalnymi komórkami macierzystymi pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) w porównaniu do autologicznych mikropęcherzyków (MVs) (pozyskanych z hodowli BM-MSCs) w regeneracji ubytków chrząstki stawowej. Ten sposób zastosowania MVs w leczeniu ubytków tkanki chrzęstnej nie był do tej pory opisany w literaturze.

Praca rozpoczyna się rozdziałem wprowadzenie w którym Autor naświetlił problematykę związaną z chorobą zwyrodnieniową stawów podkreślając wieloczynnikową etiologię, przebieg i leczenie tej choroby. Następnie we wstępie lek. wet. Krzysztof Buczak opisał budowę chrząstki stawowej, zwracając szczególną uwagę na jej swoistą strukturę, z której wynikają unikalne właściwości fizyko-chemiczne oraz skomplikowany charakter regeneracji i naprawy. Szczególnie dużo miejsca poświęcił przedstawieniu współczesnych metod leczenia z wykorzystaniem komórek macierzystych oraz mikropęcherzyków błonowych. Ten obszerny liczący 27 stron rozdział dowodzi o dobrym przygotowaniu Doktoranta do badań. Na podstawie przeglądu starannie dobranego piśmiennictwa Autor sformułował cel badawczy jakim była ocena ogólnej i miejscowej reakcji organizmu owcy na leczenie doświadczalnie wytworzonego ubytku chrząstki stawowej stawu kolanowego z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) w porównaniu do autologicznych mikropęcherzyków (MVs) (pochodzących z BM-MSCs).

Praca lek. wet. Krzysztofa Buczaka liczy 116 stron tekstu wraz z piśmiennictwem w liczbie 161 pozycji oraz 9 tabel i 40 rycin. Układ dysertacji jest zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim i zawiera wszystkie wymagane rozdziały w tym: wprowadzenie, cele i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, jednobrzmiące streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis treści, wykaz tabel, rycin i skrótów.

Tytuł pracy jasno precyzuje przedmiot rozprawy w zakresie prowadzonych badań.

W rozdziale „Materiał i metody” w pierwszej kolejności podana jest informacja o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach we Wrocławiu na przeprowadzenie badań na owcach. Następnie, dowiadujemy się o liczebności, gatunku, wieku, płci i masie ciała badanych zwierząt wraz z podziałem na grupy (dwie kontrolne i dwie doświadczalne). Wystarczająco szczegółowo opisane są warunki utrzymania i żywienia owiec, procedury przygotowania zwierząt do zabiegów, znieczulenie ogólne, techniki chirurgiczne włącznie z pobieraniem szpiku kostnego do izolacji, hodowli i pozyskania mikropęcherzyków.

Cel pracy zrealizowano poprzez wykonanie ubytków chrzęstno-kostnych na obciążanej powierzchni stawowej bloczka kości udowej i implantację w wytworzonych ubytkach

skafoldów kolagenowych nasączonych preparatami bioaktywnymi tzn. mikropęcherzykami oraz komórkami macierzystymi. Badania przeprowadzono na modelu owczym w dwóch etapach. W pierwszym pozyskiwano ze szpiku kostnego BM-MSCs i MVs i w drugim etapie implantowano skafoldy kolagenowe w wytworzone ubytki w chrząstce stawowej i nasączano pozyskanym wcześniej w/w materiałem. Pobranie szpiku kostnego, implantację wszczepów do stawów kolanowych, pobranie krwi do badań laboratoryjnych oraz badania sekcyjne stawów kolanowych przeprowadzono w Katedrze i Klinice Chirurgii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W celu przeprowadzenia zakrojonych na szeroką skalę badań nawiązano współpracę z Samodzielnym Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych (SLBKMiN) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, gdzie izolowano MSCs ze szpiku kostnego owiec i MVs. Badania histologiczne wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii a badania morfologiczne i biochemiczne krwi w Weterynaryjnym Laboratorium Diagnostycznym „UNI-LAB” Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Ocenę prowadzono przyżyciowo i pośmiertnie. Jakość regeneratu prowadzono na podstawie:

- oceny makroskopowej badanych stawów kolanowych pośmiertnie po upływie 180 dni
- oceny struktur operowanego stawu kolanowego z wykorzystaniem tomografii komputerowej (TK) po 90 i 180 dniach
- oceny mikroskopowej skrawków chrząstki pobranych z blozka kości udowej w której został wykonany ubytek chrzęstno-kostny. Ocena miała charakter subiektywny, ale w celu jej zobiektywizowania wykonano ocenę półjakościową opartą o 14-punktową skalę utworzoną przez Międzynarodowe Towarzystwo Chorób Chrząstki zwaną jako „zmodyfikowaną skalą ICRS”.

W trakcie badań dodatkowo prowadzono ocenę przyżyciową owiec obejmującą ocenę ogólnej reakcji organizmu owcy na zastosowane leczenie poprzez monitorowanie parametrów morfologicznych (z uwzględnieniem liczby erytrocytów, leukocytów, płytek krwi) i biochemicznych (z określeniem aktywności aminotransferazy asparaginowej, alaninowej, fosfatazy alkalicznej, stężenia mocznika, kreatyniny, białka całkowitego i albumin). Zastosowanie takiego warsztatu umożliwiło wiarygodną ocenę ogólnoustrojowej reakcji na przeprowadzone zabiegi. W tym miejscu wypada przypomnieć, że Doktorant maksymalnie wykorzystał zebrany materiał badawczy do przeprowadzenia niezbędnych analiz i oszacowania statystycznej istotności wybranych danych. Wykazał się przy tym biegłą znajomością metod

znieczulenia ogólnego i analgezji zwierząt, technik chirurgicznych w obrębie stawu kolanowego a także metod hodowli komórkowych *in vitro*.

Z opisu materiałów i metod wynika, że eksperymenty były przeprowadzone prawidłowo pod względem technicznym. Wszystkie etapy badań zostały szczegółowo opisane a ich wyniki dobrze i przejrzysto udokumentowane. W rozdziale wyniki dowiadujemy się między innymi, że najbardziej nasilone procesy chondrogenyzy i osteogenyzy przebiegały w grupie trzeciej, gdzie implantowano mikropęcherzyki (MVs). Ubytek był całkowicie wypełniony dobrze unaczynioną tkanką łączną z obecną w obszarach peryferyjnych strefą chrzęstnowłóknistą, dobrze zespoloną z tkanką kostną beleczkową. Powierzchnia stawowa nad ubytkiem była pokryta przez błonę łącznotkankową zbudowaną głównie z włókien kolagenowych o ułożeniu równoległym. Podobne lecz mniej wyrażone procesy były obecne w grupie 4 w której impantowano komórki macierzyste (MSCs), podczas gdy w gr 2 kontrolnej (po implantacji gąbki kolagenowej) wewnątrz ubytku nie zawierało żadnych ognisk fibrogenyzy ani osteogenyzy.

#### Uwagi krytyczne

W materiałach i metodach Doktorant dowiadujemy się że „Przed rozpoczęciem II etapu doświadczenia u każdego zwierzęcia zostało wykonane badanie radiologiczne i tomograficzne prawego stawu kolanowego”. W opinii recenzenta nie było potrzeby wykonywania badań rentgenowskich do oceny stanu stawu, w sytuacji kiedy były wykonywane badania TK, tym bardziej, że w dalszej części eksperymentu nie wykonywano badań RTG, lecz tylko TK. Załączone ryciny 16 i 17 obrazują przewagę tomogramów nad radiogramami w ocenie stanu stawów kolanowych.

Autor prowadził pośmiertną makroskopową ocenę mazi stawowej, podczas gdy ocena ta mogłaby być uzupełniona o badania laboratoryjne i cytologiczne.

W zdaniu „W grupie czwartej (komórki BM-MSCs) obraz morfologiczny wykazywał szereg cech wspólnych, jednakże występowały tam również cechy istotnie różnicujące obie techniki.” należy sprecyzować z którą techniką obraz morfologiczny wykazywał szereg cech wspólnych. Tak sformułowane zdanie nie wyjaśnia, czy chodzi o wyniki gr 2 czy gr 3.

Kolejne uwagi dotyczą strony graficznej rycin i ich opisu:

Na rycinie 32.2 jest zamieszczona strzałka, natomiast w opisie tej ryciny zabrakło informacji co ona oznacza.

Omawiając rycinę 33,4 (str. 75) Autor podaje, że obrazuje ona „powierzchnię stawową... i wewnątrz wypełnione tkanką tłuszczową”, podczas gdy rycina ta przedstawia procesy przebudowy tkanki kostnej.

W zdaniu „Wnętrze blizny było wypełnione tkanką tłuszczową, co na radiogramach może przedstawiać się jako cysta” (str. 75), Autor powołuje się na ryc. 34.3, która nie jest radiogramem lecz obrazem histologicznym. Ponadto jak wynika z materiałów i metod pośmiertnie wykonywano tomografię komputerową, a nie badania rentgenowskie i z tego względu należałoby użyć terminu tomogramy a nie radiogramy.

W rozdziale wyniki (str. 78) w części dotyczącej analizy statystycznej oceny mikroskopowej w skali ICRS Autor powołuje się na cztery ryciny w kolejności nr 38,3, 38,1, 38,2 i 38,4, których w przedstawionym maszynopisie nie ma. Prawdopodobnie chodzi o ryciny nr: 35,3, 35,1, 35,2 i 35,4.

Ciekawy jest rozdział dyskusja w którym na podstawie obserwacji własnych, dokumentacji fotograficznej i danych zestawionych w tabelach lek. wet. Buczak poprowadził dyskusję konfrontując własne wyniki z wynikami innych autorów. Rozdział ten dla ułatwienia jego lektury warto byłoby podzielić na podrozdziały. Ponadto w tej części zabrakło omówienia zmian aktywności aminotransferaz: alaninowej i asparaginowej, których duże wahania zostały stwierdzone w czasie eksperymentu i zostały opisane w wynikach.

Praca kończy się 4 wnioskami. Wszystkie są prawidłowo sformułowane i wynikają z przeprowadzonych badań.

Istotny jest wniosek pierwszy stanowiący, że zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) i mikropęcherzyków (MVs) korzystnie wpływa na proces gojenia ubytków chrząstki stawowej u owiec. Jakość odbudowy ubytków była znacząco lepsza w obu grupach badawczych niż w grupie kontrolnej, co dowodzi o wyższej skuteczności terapii uszkodzeń chrząstki nad samoistnym leczeniem.

Szkoda, że w tym miejscu nie znalazł się dodatkowy wniosek wynikający z przeprowadzonych badań, stanowiący, że zastosowanie mikropęcherzyków (MVs) pozwala na lepsze wypełnienie ubytku, bardziej wyrażone procesy chondrogenyzy i kościogenezy z lepszym powrotem do funkcjonalności powierzchni chrząstnej w porównaniu do mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs).

Jako cenne uważam dwa podobne do siebie wnioski 3 i 4 informujące o tym, że zastosowanie mikropęcherzyków (MVs) czy też mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzenia szpikowego (BM-MSCs) jest bezpieczne i nie wywołuje negatywnej reakcji miejscowej i ogólnej organizmu.

### **Wniosek końcowy**

Oceniając rozprawę doktorską lek. wet. Krzysztofa Buczaka stwierdzam, że jest ona cenna pod względem dużych walorów poznawczych i aplikacyjnych, bogatej i właściwie dobranej metodyki, oraz dobrze udokumentowanych wyników badań otrzymanych w oparciu o wszechstronny i poprawnie dobrany warsztat badawczy. Autor dowiódł korzystny wpływ komórek macierzystych pochodzenia szpikowego oraz mikropęcherzyków na proces gojenia ubytków chrzęstno-kostnych u owiec. Recenzowana dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego a zaznaczone powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają jej wartości.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska pt. „Wpływ substancji bioaktywnych zawartych w mikropęcherzykach pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych na gojenie się ubytków chrząstki szklistej stawowej u owiec” autorstwa lek. wet. Krzysztofa Buczaka w pełni spełnia wymagania stawiane pracom na stopień doktora nauk weterynaryjnych i w pełni odpowiada warunkom określonym w art. art 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742).

Mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. wet. Krzysztofa Buczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na dużą wartość poznawczą i aplikacyjną pracy wnioskuje o jej wyróżnienie.

