

Jerzy Kawiak
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN
ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Kurzyk pt. **Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej do konstrukcji polimerowo-komórkowych rusztowań do regeneracji ubytków kostnych.**

Praca została wykonana w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie pod kierunkiem prof. dr. hab.n.med. Zygmunta Pojdy, który jest promotorem.

W Europie około miliona chorych rocznie przechodzi chirurgiczną rekonstrukcję kości z użyciem przeszczepów kostnych. Przeszczep kostny uważany jest za bezpieczny i skuteczny sposób leczenia dużych ubytków kostnych. Zawiera on komórki tworzące nową kość oraz ma właściwości osteoindukcyjne. Alternatywą dla takich przeszczepów jest implantacja protez z materiałów niebiologicznych, które jednak mogą nie stymulować tkanki kostnej do regeneracji uszkodzonej kości. Innym jeszcze rozwiązaniem może być połączenie trójwymiarowych wszczepów szkieletu materiałów niebiologicznych z wyhodowanymi na nich komórkami macierzystymi o niskiej ekspresji antygenów zgodności tkankowej.

Celem pracy Autorki było opracowanie modelu do badania zachowań komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC - adipose stem cells) dla regeneracji ubytków kostnych. Drugim celem było zbadanie i optymalizacja krytycznych etapów zasiedlenia *in vitro* konstruktów polimerowo-komórkowych, jako etapu badań przedklinicznych wykorzystania ludzkich ASC w ortopedii. Przedstawiony kontekst kliniczny celu rozprawy należy ocenić jako interesujący, a jego uzasadnienie we wstępie zostało opisane przejrzysto i zgodnie z aktualną wiedzą.

W rozprawie Autorka opisała potencjał proliferacyjny komórek pochodzących z tkanki tłuszczowej różnej lokalizacji badany na modelu szczurzym. Sprawdziła wzrost tych komórek w kolejnych pasażach hodowli *in vitro*. Oprócz oceny proliferacji komórek zbadła również potencjał różnicowania hodowanych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej. Oceniała też wydajność zasiedlania rusztowań polikaprolaktonu (PCL) oraz PCL z 5% trójfosforanem wapnia (TCP). Zbadła proliferację szczurzych ASC w rusztowaniach po różnym czasie hodowli, porównała też różne metody zasiedlania oraz dynamikę wzrostu ASC na rusztowaniach. ASC poddane procesowi różnicowania w kierunku osteogenezy w rusztowaniach oceniała testem aktywności fosfatazy zasadowej. Wzrost alkalicznej fosfatazy obserwowała po 7 i 14 dniach hodowli na rusztowaniu PCL.

Ważnym etapem rozprawy było podjęcie podobnych obserwacji na komórkach ASC pozyskanych z tkanki tłuszczowej ludzkiej po uzyskaniu zgody badanych osób. W jednej izolacji otrzymywano około 0.42×10^6 komórek frakcji SVF (ang. stromal vascular fraction, SVF) o żywotności 85% na ml lipoaspiratu. Czas podwojenia populacji ludzkich komórek SVF w pasażach 1-3 wynosił 96 h, a czas namnożenia hodowli pierwotnej do pasażu 1 wynosił 6 dni. Pasaż 3 uzyskiwano po 15-19 dniach. W kolejnych pasażach utrzymywały się komórki o fenotypie CD29, CD73, CD90, CD105. Natomiast komórek o fenotypie CXCR4, CD45 oraz lin1 było poniżej 1%. Do dziewiętnastego pasażu obserwowano 2-10% komórek CD34 dodatnich. W komórkach ASC różnicujących się w kierunku osteogenezy obserwowano gromadzenie depozytów wapnia wykrywanych czerwienią alizarynową. Sprawdzono wydajność zasiedlania rusztowań PCL i PCL+5%TCP przez zawiesiny ludzkich ASC. Obserwowano znaczący przyrost masy komórek między 1 a 7 dniem eksperymentu. Optymalne dla aktywności metabolicznej mierzonej testem MTS były rusztowania PCL+5%TCP. Obserwowano, że komórki ASC przylegają do powierzchni rusztowania tworząc rozległe skupiska, ale również zasiedlają wnętrza rusztowań. Komórki zasiedlające rusztowania mogą różnicować się w kierunku kostnym i tłuszczowym. Test na obecność fosfatazy alkalicznej jako wczesnego markera osteogennego wykazał optymalny wynik na rusztowaniu PCL+5%TCP.

Autorka rozprawy wykonała wszechstronne badania posługując się różnymi metodami. Wyniki oraz wnioskowanie na ich podstawie zostały opisane systematycznie, a wnioskowanie jest formułowane ostrożnie. W dalszej części rozprawy wnioski zostały przedyskutowane w związku z opublikowanymi doniesieniami z zakresu opracowanego tematu badań.

Rozprawa obejmuje wstęp, określenie przesłanek i celów podjętego projektu, opis materiałów i metod, wyczerpujący opis uzyskanych wyników wraz z tabelami, wykresami i zdjęciami oraz dyskusję zawierającą porównanie otrzymanych wyników badań z wynikami publikowanych prac o podobnej tematyce. Dołączono podsumowanie oraz wnioski wynikające z przeprowadzonych eksperymentów, streszczenie w j. polskim i j. angielskim oraz 356 pozycji piśmiennictwa.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na brak pełnego wykorzystania cytometrii przepływowej np. w łącznym oznaczaniu żywotności komórek i markerów komórkowych.

Rozprawę p. Agaty Kurzyk oceniam pozytywnie. Zawiera ona przedstawienie oryginalnego pomysłu rozwiązania problemów modelu rusztowania kostnego zasiedlonego

własnymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej osoby chorej. Badania wykonano na modelu z komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej u szczura i te wyniki zostały wykorzystane w badaniu na podobnym modelu komórek tkanki tłuszczowej człowieka. Przedstawione rozwiązania są oryginalne, a założone cele zostały zrealizowane. Prezentacja wyników jest przejrzysta, co potwierdza teoretyczną wiedzę autorki z zakresu prowadzonych badań oraz umiejętność organizowania i prowadzenia pracy naukowej.

W mojej ocenie, rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Przedstawiona rozprawa uzasadnia dopuszczenie pani Agaty Kurzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje o nagrodzenie Autorki za przedstawioną rozprawę.



Prof.dr hab.n.med. Jerzy Kawiak

Warszawa, 9 stycznia 2019 r.