

Prof. dr hab. n med. Szymon Dragan
Kierownik Katedry i Kliniki Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu
ul. Borowska 213

Recenzja¹
rozprawy doktorskiej mgr Agaty Kurzyk pt.

Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej do konstrukcji polimerowo-komórkowych rusztowań do regeneracji ubytków kostnych.

Postęp technologiczny jaki dokonuje się w medycynie światowej w okresie ostatniego dwudziestolecia umożliwia wprowadzanie nowych metod leczniczych pozwalających na regenerację tkanek i narządów. Jego warunkiem jest interdyscyplinarna współpraca zespołów badawczych a badania prowadzone są obecnie na poziomie komórkowym i tkankowym. Regeneracja ubytków kostnych powstałych w wyniku choroby lub leczenia operacyjnego jest przedmiotem badań klinicznych i doświadczalnych wielu zespołów. Najnowszym kierunkiem jest tworzenie rusztowań przestrzennych odtwarzających strukturę tkankową z możliwością ich zasiedlenia nieodróżnionymi komórkami auto- i allogenicznymi. Struktury te w przyszłości mogą zastąpić stosowane szeroko w chirurgii ortopedycznej endoprotezy stawowe i kostne.

Badania nad regeneracją tkankową prowadzone są obecnie w kilku kierunkach. Poszukiwane są konstrukcje przestrzenne, które mogą być podłożem dla zasiedlania komórkami i źródła uzyskiwania komórek, których wybór jest problemem, nie tylko czysto medycznym lecz również etycznym. Decydujące jednak jest opracowanie technologii przestrzennego zasiedlania skafoldów materiałem komórkowym, prostej oceny uzyskanego wszczepu biologicznego oraz technika operacyjna.

Podjęcie przez mgr Agatę Kurzyk badań doświadczalnych nad wykorzystaniem komórek macierzystych tkanki tłuszczowej do tworzenia rusztowań mogących służyć regeneracji ubytków kostnych należy przyjąć z dużym uznaniem. Badania te wpisują się w bardzo aktualny kierunek doświadczeń i mogą stać się przyczynkiem do dalszych badań klinicznych.

Przesłaną do recenzji rozprawę doktorską mgr Agaty Kurzyk pt. „*Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej do konstrukcji polimerowo-komórkowych rusztowań do regeneracji ubytków kostnych*” stanowi zwarty druk, który liczy 142 strony. Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego finansowanego

¹ ¹ Recenzja została sporządzona na podstawie dostarczonej dokumentacji w związku z postępowaniem Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M.Skłodowskiej-Curie, w sprawie nadania stopnia naukowego doktora magister Agacie Kurzyk w oparciu o kryteria określone w ustawie z dnia 13 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr.65, poz.595, z późn. zm.).

ze środków Unii Europejskiej dla Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka „*Bioimplant dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych*“ POIG.01.01.02-00-022/09-00.

Układ pracy jest zgodny z zasadami budowania prac naukowych. Poszczególne rozdziały są rozbudowane w różnym zakresie. Na początku rozprawy autorka zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim, następnie spis treści i wykaz stosowanych w pracy skrótów. Wstęp obejmuje 22 strony, cele pracy zajmują 1. stronę. Autorka na 24. stronach opisała materiał i stosowane metody badawcze. Wyniki przeprowadzonych badań doktorantka przedstawiła na 40. stronach. Dyskusja przeprowadzona została na 14. stronach a ich podsumowanie na 1. stronie. Cztery wnioski znajdują się na stronie 121. Pracę kończy 356 pozycji piśmiennictwa, w dużym stopniu angielskojęzycznego, cytowanego w pracy, przedstawionego na 21 stronach. O aktualności zgłębianej i posiadanej wiedzy a także umiejętności pracy bibliograficznej Doktorantki świadczy fakt, że ponad 47% prac cytowanych zostało wydanych w ostatnich 5. latach a ponad 90% zostało wydanych po 2000 roku.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Agatę Kurzyk zawarte są w 46. tabelach, 36. rycinach, i 25 wykresach.

Mgr Agata Kurzyk we wstępie (strony 9-23), w sposób zwięzły, przedstawia problemy związane z rekonstrukcją tkanki kostnej stwierdzając, że obecne metody stosowania przeszczepów kostnych liofilizowanych litych i rozdrobnionych jako podłoża do odtworzenia ubytków są „złotym standardem“, jednak mają wiele ograniczeń i wymagają optymalizacji. Doktorantka zauważa, że spośród dotychczas stosowanych strategii w inżynierii komórkowej, obok miejscowego podawania wyizolowanych komórek, stosowania czynników wzrostu największe możliwości stwarzają hodowle komórek MSC na rusztowaniach trójwymiarowych w połączeniu z czynnikami wzrostu. Ważne jest również stwierdzenie, że do tej pory nie opracowano skutecznej metody zasiedlania komórkami rusztowań przestrzennych. Uwagi te Doktorantka powtarza na zakończenie rozdziału i można przyjąć je jako inspirację i tezy przeprowadzonych badań. W dalszej części wstępu mgr Agata Kurzyk omawia zadania inżynierii tkankowej, definiuje biomateriały opisując ich cechy ze szczególnym uwzględnieniem rusztowań trójwymiarowych. Wartościową częścią rozdziału jest omówienie mezenchymalnych komórek macierzystych: typów, źródeł pozyskiwania, zalet i korzyści związanych z ich zastosowaniem. Za najkorzystniejsze źródło komórek macierzystych uznaje tkankę tłuszczową człowieka zwracając uwagę na dostępność metod pozyskiwania tłuszczopochodnych komórek macierzystych i możliwość ich indukcji w kierunku osteogenezy przy pomocy czynników wzrostu. Na zakończenie rozdziału jako praktyczną aplikację wykorzystanie prac nad komórkami macierzystymi Doktorantka przytacza badania kliniczne nad ich zastosowaniem w tym 4 prowadzone w Polsce.

Podsumowując wstęp mgr Agata Kurzyk stwierdza, że szczególnie ważne jest poszerzenie wiedzy w zakresie warunków wpływających na odhezyjność komórek zasiedlonych na trójwymiarowych rusztowaniach.

Wprowadzenie świadczy o zrozumieniu problemów związanych ze stosowaniem komórek macierzystych w zasiedlaniu trójwymiarowych skafoldów, które mogą być aplikowane w przyszłości do regeneracji ubytków kostnych oraz bardzo dobrym

przygotowaniu praktycznym Doktorantki do prowadzenia badań w zakresie omawianej problematyki.

Ta część rozprawy doktorskiej, zawierająca podstawy teoretyczne podjętych badań w jasny i precyzyjny sposób ukazuje czytelnikowi problemy i niezbadane aspekty metodyki tworzenia bioimplantów trójwymiarowych zasiedlanych komórkami macierzystymi.

Celami pracy było:

1. opracowanie modelu zwierzęcego do badania zastosowań tłuszczowych komórek (ASC) mezenchymalnych w regeneracji ubytków kostnych,
2. badanie i optymalizacja krytycznych etapów zasiedlania *in vitro* konstruktów polimerowo-komórkowych, jako faza przedkliniczna zastosowania ludzkich ASC w ortopedii.

Plan badań obejmował badania wstępne na modelu zwierzęcym i badania na modelu ludzkim. W doświadczeniach zastosowano mezenchymalne komórki macierzyste uzyskane z tkanki tłuszczowej szczurzej i ludzkiej. Jako podłoża użyto trójwymiarowych rusztowań wykonanych z polikaprolaktonu (PCL) i polikaprolaktonu pokrytego trójfosforanem wapnia (PCL + 5% TCP). Frakcję stromalno–vaskularną pozyskiwano w modelu zwierzęcym od szczura z pięciu lokalizacji anatomicznych i w modelu ludzkim z lipoaspiratu uzyskanego z rutynowo wykonywanych zabiegów liposukcji. W obu modelach oceniano liczbę komórek w tkance, ich żywotność, zdolność do namnażania i różnicowania się w kierunku adipo- osteo- i chondrogenyzy. Procesy różnicowania opisywano testem fosfatazy alkalicznej. Ponadto w modelu ludzkim określono wpływ czynników osteogennych z użyciem medium opracowanego przez autorkę, wzbogaconego o czynniki wzrostowe BMP2 i TGF2 na przebieg namnażania komórek.

Skuteczność adhezji komórek mezenchymalnych oceniano w oparciu o objętość zastosowanej zawiesiny, gęstość komórek, technikę zasiedlania, ilościową i jakościową ocenę tego procesu oraz potencjał różnicowania się komórek mezenchymalnych na zastosowanych podłożach.

Materiał badawczy w tzw. modelu zwierzęcym stanowiło 12 szczurów, samców rasy WAG o ciężarze wagi ciała 250-300 g. Przebieg badania spełniał wymogi ustawowe i uzyskał zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach WUM w Warszawie- pozwolenie nr 31/2011. W modelu ludzkim zastosowano komórki ASC uzyskane z tłuszczu aspirowanego metodą Colemana w Klinikach Medycyny Urody. Badania przeprowadzono na 84 próbkach. Poza płcią – kobiety, brak jest innych danych dotyczących wieku, wagi, wzrostu i danych dotyczących zdrowia, co uważam za wadę tej części przeprowadzonego badania. Badania na materiale ludzkim wykonane zostały w Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej w Warszawie.

Metodyka izolacji ASC w obu przypadkach była podobna, co wydatnie uwiarygadnia i podnosi wartość uzyskanych wyników.

W dalszych częściach rozdziału materiał i metody Doktorantka opisała metodykę izolacji komórek macierzystych, ich ocenę ilościową i jakościową oraz prowadzenie hodowli pierwotnej aż do niezdolności komórek do dalszych podziałów. Następnie pasażowano ASC i

oceniano ich proliferację zgodnie z protokołem producenta MTS CELLTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay i fenotyp przy pomocy programu CellQUEST pro (BD). Różnicowanie komórek w kierunku osteogenezy przeprowadzono zgodnie z protokołami MesenCult Osteogenic Stymulatory Supplements (Human) z użyciem MesenCult MSC Basal Medium. Podobnie oceniano adipogenezę i chondrogenezę oraz znakowano adipocyty i osteocyty. Ponadto zostały wykonane testy czynników osteoidukcyjnych. Aktywność różnicowania osteogenicznego określana była na każdym etapie hodowli w oparciu o aktywność fosfatazy alkalicznej.

Znaczącą wartość praktyczną i naukową mają podrozdziały opisujące szczegółowo metodykę zasiedlania zastosowanych podłoży trójwymiarowych komórkami ASC. Ocena jakościowa komórek, określenie ich optymalnej gęstości a także kontrola rozkładu w zastosowanych skafoldach przy użyciu mikrotomografii komputerowej i mikroskopu elektronowego świadczą o rzetelnym warsztacie naukowym mgr Agaty Kurzyk.

Metody analizy statystycznej użyte przez Doktorantkę są adekwatne do założonej oceny zebranego materiału badawczego. Zastosowany został pakiet STATISTICA v.10 firmy Statsoft Polska i program statystyczny R version 3.4.3.. Za poziom istotności wartości p przyjęto 0,05 we wszystkich testach. Ponieważ zmienne opisujące badane charakterystyki nie spełniały warunku normalności rozkładów (ocenianego za pomocą testu Shapiro-Wilka), w obliczeniach stosowane były testy nieparametryczne: współczynnik korelacji Spearmana i testy U Manna-Whitney'a oraz Kruskala-Wallisa. Tak zaplanowana i przeprowadzona analiza statystyczna uzyskanych wyników uwiarygadnia dalsze analizy i wnioski pracy oraz świadczy o rzetelnym i dogłębnym przygotowaniu Doktorantki do przeprowadzenia badań.

W rozdziale wyniki, Doktorantka opisała i udokumentowała w tabelach, na rycinach i wykresach wyniki badań poszczególnych testów. Ilustracje wyników znajdują komentarz w tekście. Mgr Agata Kurzyk podkreśliła w nich szczególnie wyniki odnoszące się do postawionych w badaniu tez i celów. Zwraca uwagę recenzenta analiza wyników badań z własnego autorstwa udoskonaloną metodą nasycenia etapowego MSC skafoldów. Jakość edytorska ilustracji jest bardzo wysoka. Szczegółowo dokumentują one i przedstawiają przeprowadzone analizy zarówno części badań przeprowadzonych na szczurach jak i z zastosowaniem ASC pochodzenia ludzkiego.

W końcowej części rozprawy, w dyskusji (str. 106-119), mgr Agata Kurzyk omówiła uzyskane wyniki odnosząc je do badań przeprowadzonych przez innych autorów. W sposób świadczący o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu naukowego dokonała analizy występujących zgodności i różnic tłumacząc je szczegółowo i merytorycznie. Stwierdziła, że dotychczas żaden z pojedynczych gatunków zwierząt nie został uznany za standard badania przedklinicznego zwierzęcego do regeneracji tkankowych narządu ruchu, dlatego też uznała za najwłaściwszy i zastosowała model „szczurzy“. Realizując cele pracy opracowała standard pobierania tkanki tłuszczowej od szczura uznając, że optymalnym źródłem jest tkanka tłuszczowa karku szczura. Technika ta nie wymaga jednocześnie eutanazji zwierzęcia. Doktorantka zauważyła, że dotychczas stosowane w praktyce klinicznej przez lekarzy metody pozyskiwania komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej u człowieka pozwalają na otrzymanie tylko jednego niezróżnicowanego składnika zrębowego frakcji naczyniowej, którą można również nazwać „zmielonym tłuszczem“. Natomiast prawidłowa izolacja SVF z tkanki tłuszczowej jest stosunkowo prostym procesem, wymaga jednak spełnienia restrykcyjnych

wymogów regulacyjnych, zapewniających integralność i bezpieczeństwo badań klinicznych. Lekarz podający pacjentowi komórki macierzyste różnego pochodzenia przeprowadza „eksperyment kliniczny“, za którego przebieg i efekty bierze na siebie pełną odpowiedzialność. Stąd też szczególnie ważne wg Doktorantki jest opracowanie i wdrożenie standardów leczenia z zastosowaniem MSC.

Z piśmiennictwa wynika, że istnieją rozbieżności co do czynników wpływających na jakość ASC, które są trudne do standaryzacji. W dyskusji mgr Agata Kurzyk, porównując wyniki własne w doniesieniach literaturowych, zwraca jednak uwagę, że według niektórych autorów, czynnikiem wpływającym na przebieg hodowli ASC może być wiek pacjenta oraz konsekwentne przechowywanie komórek z poszczególnych izolacji a metody izolacji mają decydujący wpływ na wydajność namnażania i różnicowania komórek. Wydaje się, że uzyskanie przez autorkę większej liczby danych dotyczących osób, którym pobierano tkankę tłuszczową pozwoliłoby na wzbogacenie danych uzyskanych w pracy jednocześnie stwarzając możliwość wystandaryzowania metody w oparciu o: np. wiek, etniczność, stan zdrowia, indeks BMI itp.

Wynik badań wskazujący na wpływ BMP2 i FGF2 na zdolność osteogenną ASC umożliwił Doktorantce na stworzenie własnego wzorca wzbogacania medium podstawowego znacząco wpływającego na wzrost procesu mineralizacji komórek hodowli *in vitro* w porównaniu z komórkami niezróżnicowanymi. Ta część badania jest cennym przyczynkiem do dalszego optymalizowania strategii przedklinicznych w stosowaniu czynników wzrostu i biomateriałów w medycynie regeneracyjnej.

Za szczególnie wartościowe uważam badania nad możliwościami zasiedlania komórkami ASC skafoldów i wizualizacji tego procesu. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, iż zastosowanie własnej techniki zasiedlania i etapowej inkubacji zwiększa adhezyjność MSC na powierzchni w penetracji komórek w pory skafoldu. Uważam jednak, że jakkolwiek bardzo wartościowe jest stosowanie μ CT czy SEM i mikroskopu fluorescencyjnego w badaniach *in vitro* to jednak stosowanie tych metod w praktyce klinicznej jest skomplikowane i może znacznie zwiększać koszty metody.

Na szczególne uznanie zasługuje opracowanie standardu prowadzenia badania na modelu zwierzęcym i metody izolacji, namnażania i zasiedlania komórek na skafoldzie a także oceny skuteczności penetracji komórek ASC w strukturę 3D. Stworzenie standardu przedstawionego na ryc. 36 i opisanego szerzej w tekście wzbudza u chirurga ortopedy nadzieję na przyspieszenie prac nad klinicznym zastosowaniem *polskich biomateriałów* w chirurgii rekonstrukcyjnej i regeneracyjnej

Pracę kończą 4 wnioski, według recenzenta zbyt ostrożne i ogólnikowe, które stanowią odpowiedź na postawione przez Doktorantkę cele:

1. Uzyskanie dużej populacji komórek ASC z tkanki tłuszczowej z lokalizacji karkowej pozwala na wykorzystanie szczura jako autologicznego modelu badania ubytków kości, bez konieczności eutanazji zwierzęcia.
2. Udoskonalona metoda zasiedlania zwiększa adhezję na powierzchni rusztowań polikaprolaktonowych i może przyczynić się do uzyskania biologicznie wydajnego

produktu inżynierii tkankowej dla potrzeb medycyny regeneracyjnej i rekonstrukcyjnej.

3. ASC zasiedlone na powierzchni rusztowań polikaprolaktonowych wzbogaconych 5% trójfosforanem wapnia wykazują większy potencjał osteogeny w porównaniu do ASC rosnących na powierzchni rusztowań polikaprolaktonowych bez dodatku trójfosforanu wapnia, co wskazuje, że dodanie 5% trójfosforanu wapnia do rusztowań polikaprolaktonowych, ma pozytywny wpływ na proces kościotworzenia i przemawia za możliwością wykorzystania badanych konstruktów polimerowo-komórkowych w regeneracji i rekonstrukcji ubytków kostnych.
4. ASC wykazują zdolność do adhezji na powierzchni rusztowań PCL i PCL + 5% TCP i zachowują swoje własności podczas długotrwałej hodowli *in vitro*, co potwierdza ich przydatność do wykorzystania w regeneracji ubytków kostnych.

Za oryginalne osiągnięcia Doktorantki uważam:

1. Podjęcie badań nad innowacyjnymi metodami otrzymywania biomateriałów mogących znaleźć zastosowanie w chirurgii rekonstrukcyjnej.
2. Zbadanie i opisanie procesów biologicznych i własności materiałów pozwalających na tworzenie kościopodobnych skafoldów biologicznie aktywnych z możliwością transformacji ASC w komórki kostne.
3. Opracowanie, w oparciu o modele zwierzęcy i ludzki, własnych innowacyjnych standardów namnażania ASC, zbadania czynników wpływających na ten proces, własnej modyfikacji podstawowego medium wzbogaconego o wystandaryzowane BMP2 i FGF2, własnej techniki zasiedlania komórkami ASC skafoldu polikaprolaktonowego wzbogaconego 5% trójfosforanem wapnia i laboratoryjnych technik ilościowej i jakościowej oceny przebiegu kondukcji komórek w strukturę podłoża 3D.

Opiniowana praca jest próbą wnikięcia w złożone, trudne i wieloaspektowe problemy związane z dotychczas nie w pełni zbadanymi i opisanymi procesami pozyskiwania, i namnażania komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego, ich zasiedlania na skafoldach 3D oraz oceny tego procesu. Przeprowadzenie tych badań wymagało wcześniejszego doświadczenia badawczego i żmudnej pracy. Mgr Agata Kurzyk prowadząc badania wykazała się umiejętnością pracy w zespole interdyscyplinarnym, prowadzenia twórczej analizy wyników i co zasługuje na szczególne uznanie praktycznej aplikacji uzyskanych wyników. Należy podkreślić również sposób przygotowania teoretycznego i odniesienie wyników badań do wyników uzyskanych przez innych autorów oraz przeprowadzenie dogłębnej analizy statystycznej.

Na zakończenie recenzji pozwalam sobie na przedstawienie, poza zawartymi w tekście, paru uwag i pytań nasuwających się podczas studiowania pracy:

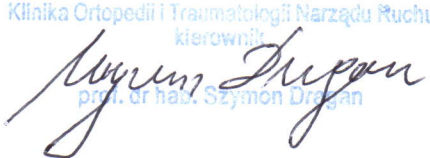
1. Czy na podstawie uzyskanych wyników i własnych doświadczeń Doktorantka może zaproponować tańszą i prostszą metodę oceny zasiedlania skafoldu komórkami w zastosowaniach klinicznych?

2. W pracy brakuje spisu rycin, tabel i wykresów. Zamieszczenie spisu ułatwi czytającemu odszukiwanie wybranych, interesujących ilustracji wyników opisywanych w tekście.
3. Przed oddaniem pracy do druku konieczne jest skorygowanie błędów literowych w tekście i ujednolicenie układu wydawniczego piśmiennictwa.
4. Według recenzenta Doktorantka używa zamiennie różne określenia dla tych samych zjawisk biologicznych lub tworzy słowa które nie odnoszą się do rzeczywistych przedmiotów. Np. stosuje określenie konstrukt do określenia stworzonego skafoldu a wg. słownika PWN konstrukt jest to «*logiczna struktura powstała w czyimś umyśle*».
5. Podsumowanie wyników i wnioski według recenzenta są częściowo powtórzeniami i powinny zostać odpowiednio połączone przez co wartość wniosków pracy znacząco wzrośnie.

Pomimo wymienionych uwag, zdaniem recenzenta chirurga-ortopedy zajmującego się rekonstrukcją ubytków kostnych i chrzęstnych, praca jest bardzo wartościowa i przedstawia bardzo duże walory poznawcze i praktyczne.

Reasumując swoją recenzję stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agaty Kurzyk pt. *Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej do konstrukcji polimerowo-komórkowych rusztowań do regeneracji ubytków kostnych* spełnia kryteria określone w ustawie z dnia 13 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr.65, poz.595, z późn. zm.). W tym przekonaniu przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie wniosek o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Agaty Kurzyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze innowacyjny charakter pracy, wkład własny w postęp wiedzy dotyczącej tworzenia materiałów biologicznych dla chirurgii rekonstrukcyjnej i bardzo wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań stawiam również wniosek o nagrodę dla ocenianej pracy doktorskiej.

Wrocław, dnia 12 stycznia 2019 roku

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu
KATEDRA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII
NARZĄDU RUCHU
Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu
kierownik

prof. dr hab. Szymon Dragan