

prof. dr hab. med. Jerzy Strużyna
Wschodnie Centrum Leczenia Oparzeń
i Chirurgii Rekonstrukcyjnej
w Łęcznej

4.06.2018

Recenzja

rozprawy doktorskiej lekarza Tomasz Dębskiego „Wpływ prefabrykacji chirurgicznej rusztowań polimerowych na właściwości angiogenne i osteogenne komórek ADSC”

Promotor: prof. dr hab. n. med. Zygmunt Pojda

Rozprawa doktorska lekarza Tomasza Dębskiego zawiera 144 strony, 34 tabele, 39 rycin i 23 wykresy. Jej przedmiotem jest wpływ prefabrykacji chirurgicznej rusztowań polimerowych na właściwości angiogenne i osteogenne komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej. Temat rozprawy doktorskiej jest aktualny i wartościowy, a także niezwykle interesujący ze względu na obszar medycyny, której dotyczy. Inżynieria tkankowa poprzez wykorzystanie najnowszych osiągnięć medycyny oraz nowoczesnych technologii przekracza granice w naprawie ubytków ludzkiego ciała.

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ z podziałem na 7 rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja i omówienie wyników, Wnioski, Literatura. Przed wstępem autor umieścił wykaz skrótów używanych w pracy i streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Pracę zamyka spis tabel, rycin i wykresów.

Autor na początku pierwszego rozdziału – „Wstępu”, w oparciu o przegląd piśmiennictwa, wprowadził czytelnika w temat rozprawy. Przedstawił inżynierię tkankową jako jedną z dwóch składowych nowej, bardzo prężnie rozwijającej się dziedziny medycyny –

medycyny regeneracyjnej. Opisał zasadniczą kwestię odpowiedniego unaczynienia produktów inżynierii tkankowej wszczepianych w miejsce brakujących tkanek. Wytworzenie odpowiedniego systemu naczyniowego w rusztowaniach zarówno w procesie angiogenezy, jak i waskulogenezy jest kluczowym elementem inżynierii tkankowej. Ponieważ spontaniczne unaczynienie rusztowań jest niewystarczające, konieczne jest poszukiwanie metod, które usprawnią rozwój naczyń w produktach inżynierii tkankowej. Autor w sposób zwięzły i przystępny omówił różne strategie i metody wspomagania rozwoju unaczynienia dotyczące: budowy rusztowania, czynników wzrostu i różnicowania, wykorzystania komórek macierzystych oraz prewaskularyzacji. Ostatnia wymieniona strategia zastosowana *in vivo* (prefabrykacja) w połączeniu z zasiedleniem rusztowania żywymi komórkami wydaje się być najbardziej obiecującą metodą wytwarzania naczyń w inżynierii tkankowej. Na koniec wstępu autor przedstawił metodę prefabrykacji produktów inżynierii tkankowej, polegającej na umieszczeniu szypuły naczyniowej o swobodnym przepływie (typu flow-through) wewnątrz rusztowania i zaproponował zbadanie tej strategii. Ta część pracy nie budzi zastrzeżeń i zasługuje na uznanie.

Doktorant przyjął jako cel swojej pracy badanie wpływu nowej metody prefabrykacji, która łączy nowatorską konfigurację szypuły naczyniowej z angiogennymi właściwościami komórek macierzystych, na tworzenie naczyń w rusztowaniach.

W rozdziale: „Materiał i metody” doktorant szczegółowo omówił sposób badania, które przeprowadzono na grupie 36 szczurów. Zgodę na przeprowadzenie badań wydała Lokalna Komisja Bioetyczna. Na pierwszych 6 stronach tego rozdziału autor opisał oraz przedstawił na rycinach i zdjęciach etapy wytwarzania rusztowań z wykorzystaniem techniki druku 3D – metody przyrostowego kształtowania uplastycznionym polimerem, wykazał także ich właściwości. Na następnych 7 stronach doktorant w podobny sposób omówił metodę pobierania tkanki tłuszczowej oraz izolację i różnicowanie komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego, a także sposób zasiedlania nimi rusztowań. Informacje dotyczące pracy z komórkami macierzystymi przedstawione zostały w postaci protokołów w formie tabel, co zwiększa czytelność i przejrzystość tego rozdziału. Informacje dotyczące implantacji rusztowań opisane zostały na kolejnych 5 stronach, opatrzone licznymi zdjęciami, które szczegółowo przedstawiają ten etap badań. Plan doświadczenia zakładał ocenę wpływu prefabrykacji rusztowań w trzech grupach (12 szczurów w każdej): z pustymi rusztowaniami, rusztowaniami zasiedlonymi komórkami macierzystymi oraz rusztowaniami zasiedlonymi komórkami macierzystymi indukowanymi w kierunku osteogenezy. Do jednego szczura wszczepiano dwa rusztowania: po jednej stronie z szypułą umieszczoną klasycznie obok

rusztowania, po drugiej stronie zgodnie z zaproponowaną metodą lokalizacji szypuły wewnątrz rusztowania w układzie typu „flow-through”. Uważam za niezwykle cenne wykorzystanie jednego modelu badawczego do porównania obu sposobów prefabrykacji – zwiększa to wiarygodność uzyskanych wyników. Grupę badaną podzielono na dwie części: u połowy zwierząt wszczepione rusztowania usuwano po 2 miesiącach, u drugiej połowy po 6 miesiącach. Mimo tego, że grupę badaną tworzy 36 zwierząt, to podzielenie jej ze względu na trzy czynniki i dwa okresy czasu, sprawia, że ostatecznie uzyskujemy niezbyt liczne podgrupy do analiz statystycznych. Sposób doboru i zastosowania metod statystycznych nie budzi wątpliwości. Na ostatnich 10 stronach rozdziału „Materiał i metody” doktorant omówił sposób oceny wyników, której dokonano poprzez analizę preparatów histologicznych oraz wyniki mikrotomografii komputerowej pod kątem angiogenezy. Ze względu na opisywane przez autora trudności w ocenie histologicznej związane z właściwościami materiału użytego do wytwarzania rusztowań – polikaprolaktonu, przedstawiony został zmodyfikowany protokół oceny histopatologicznej. Uważam za cenne przedstawienie przez doktoranta problemów związanych z metodyką badań i sposoby ich rozwiązania.

Rozdział „Wyniki” jest obszerną częścią pracy, która zawiera szczegółową analizę uzyskanych danych, poddanych wnikliwej analizie statystycznej. Na 25 stronach autor przedstawił statystyki opisowe i wykresy dla zmiennej gęstości całkowitej naczyń w rusztowaniu. Doktorant zaprezentował ocenę zróżnicowania wartości badanej zmiennej ze względu na każdy z czynników: sposobu zasiedlenia rusztowania, czasu implantacji rusztowania i metody prefabrykacji rusztowania. Podał analizie statystycznej każdy z uwzględnionych czynników z osobna jak i biorąc pod uwagę ich interakcje. Mimo dużej ilości danych związanych z koniecznością uwzględnienia wszystkich badanych czynników, rozdział ten, w sposób jasny i zrozumiały prezentuje rezultaty pracy doktorskiej. Autorowi, dzięki umieszczeniu licznych wykresów i tabel oraz uporządkowanej strukturze, udało się w sposób przystępny przedłożyć swoje wyniki. 3 ostatnie strony tego rozdziału przedstawiają wyniki rekonstrukcji 3D naczyń, które uwidaczniają przerastanie nowopowstałych naczyń. Ryciny te są wartościowym dodatkiem, który obok danych statystycznych ukazuje wytworzone naczynia przy użyciu nowej metody prefabrykacji.

Na „Dyskusje i omówienie wyników” doktorant przeznaczył 20 stron. Autor w tym rozdziale omawia wyniki badań własnych w kontekście innych podobnych badań oraz krytycznie ustosunkowuje się zarówno do własnych wyników, jak i tych uzyskanych przez innych badaczy. Na początku zwrócił uwagę na problem odpowiedniego unaczynienia produktów inżynierii tkankowej, wskazując na swoją nowatorską technikę prefabrykacji,

wyliczając jej zalety takie jak: autonomicznie regulowany proces naczyniotworzenia, funkcjonalność i stabilność powstałych naczyń oraz nieskomplikowana technika jej stosowania – bez konieczności zespołów mikrochirurgicznych. Z przeprowadzonej analizy statystycznej wynika, że średnia gęstość naczyń w przypadku stosowania nowej metody prefabrykacji z zasiedleniem komórkami macierzystymi w 2 miesięcznym okresie obserwacji jest 10 krotnie wyższa niż w grupie kontrolnej – kiedy wykorzystywano klasyczną szypułę bez zasiedlenia. Autor zwraca uwagę na synergistyczny efekt dwóch czynników – skutecznej metody prefabrykacji oraz efektu działania komórek macierzystych. Doktorant w dalszej części tego rozdziału omówił szczegółowo rolę prefabrykacji oraz komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej w angiogenezie. Zwrócił uwagę na udowodnione możliwości różnicowania się tych komórek w komórki śródbłónka, a także regulacji procesu angiogenezy. Doniesienia te mają swoje odzwierciedlenie w wynikach tej rozprawy. Różnica w gęstości naczyń pomiędzy grupą z rusztowaniami zasiedlonymi i pustymi jest istotna. Niewielką część dyskusji autor poświęcił roli czasu w prefabrykacji rusztowania nową metodą. Analiza uzyskanych wyników gęstości naczyń po okresie 2 i 6 miesięcznym dowiodła, że komórki macierzyste działają najskuteczniej w pierwszym okresie po implantacji, szczególnie przy odpowiedniej konfiguracji szypuły naczyniowej. Ponieważ w badaniu zasiedlano rusztowania także komórkami macierzystymi indukowanymi w kierunku osteogenezy, doktorant na kilku stronach tego rozdziału omówił wzajemne relacje procesów angiogenezy i osteogenezy, które są ze sobą ściśle powiązane. Autor w dyskusji zlicza atuty i pokazuje mocne strony swojej metody, nie wymienia jednak żadnych wad. Konieczność umieszczenia szypuły wewnątrz rusztowania w układzie „flow-through” wymaga spełnienia odpowiednich warunków, szczególnie w zakresie wyboru materiału, projektowania i wytwarzania takiego rusztowania, aby możliwe było jego otwarcie i precyzyjne umieszczenie szypuły. Pod koniec tego rozdziału doktorant wyszczególnił i omówił kliniczne zastosowanie nowej metody prefabrykacji. Sugeruje on wykorzystanie inżynierii tkankowej w postaci prefabrykowanych i zasiedlanych komórkami macierzystymi rusztowań do rekonstrukcji ubytków kości z powodu nowotworu, przebytego urazu lub wad wrodzonych, z dostarczeniem zdrowych tkanek i uniezależnieniem ich od słabego ukrwienia w miejscu biorczym. Przytacza także pierwsze próby zastosowania tego typu rozwiązań na świecie. Zwraca także uwagę na możliwości zastosowania komórek macierzystych do wytwarzania gęstej sieci naczyniowej w tkankach niedokrwionych np. płatach zagrożonych martwicą czy niedokrwionych kończynach. Niniejsza praca udowadnia, że tworzenie nowych naczyń przebiega znacznie szybciej w przypadku, gdy komórki macierzyste znajdują się w bliskim

sąsiedztwie naczyń odżywczych (nowa metoda prefabrykacji z naczyniem wewnątrz rusztowania). Rozdział „Dyskusja i omówienie wyników” zakończony jest zwięzłym podsumowaniem. Przeprowadzona dyskusja wskazuje na wysokie kompetencje doktoranta w zakresie omawianego tematu i wnikliwą znajomość aktualnego piśmiennictwa.

W rozdziale „Wnioski” autor potwierdził w jednym zdaniu skuteczność i wpływ nowej metody prefabrykacji na większy i szybszy rozwój sieci naczyniowej w obrębie produktów inżynierii tkankowej.

Rozdział „Literatura” zawiera 269 pozycji piśmiennictwa, w większości zagranicznego, w tym najnowsze prace z zakresu inżynierii tkankowej. Wybór piśmiennictwa jest właściwy i aktualny.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lekarza Tomasza Dębskiego odznacza się wysokim poziomem merytorycznym. Stanowi ona cenny wkład w naukę światową. Oryginalny pomysł badawczy z zakresu istotnych zagadnień niezwykle prężnie rozwijającej się medycyny regeneracyjnej oraz sposób przeprowadzenia badań świadczą o dojrzałości badawczej doktoranta.

W mojej ocenie na szczególne uznanie zasługuje wykorzystanie w badaniu szypuły o swobodnym przepływie w układzie „flow-through”, preparowanej z mankietem otaczających tkanek. Ta słabo poznana jak dotąd konfiguracja szypuły w produktach inżynierii tkankowej zapowiada się obiecująco. Życzę lekarzowi Tomaszowi Dębskiemu by mógł ten atrakcyjny i interesujący temat badawczy w swojej pracy naukowej dalej rozwijać. W mojej opinii wyniki badań tej rozprawy mają szeroki wydźwięk praktyczny, szczególnie w dziedzinie chirurgii rekonstrukcyjnej i mogą być wykorzystane w codziennej praktyce klinicznej lekarzy wielu specjalności, w tym chirurgii plastycznej.

Praca ta spełnia wszystkie warunki wymagane dla rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Pozwalam sobie zatem przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie lekarza Tomasza Dębskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego jak również o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Wschodnie Centrum Leczenia Cparzeń
I Chirurgii Rekonstrukcyjnej
Lekarz Koordynujący
prof. dr hab. med. Jerzy Strużyna
specjalista chirurgii plastycznej