

Recenzja

pracy doktorskiej lek. med. Aleksandry Zołocińskiej pt.: "Badanie zdolności mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) do stymulowania regeneracji uszkodzonych nerwów obwodowych szczura z wykorzystaniem rusztowań tkankowych"

pod promotorstwem prof. dr hab. n. med. Zygmunta Pojdy.

Uszkodzenia nerwów obwodowych są częste i mają duży wpływ na jakość życia pacjentów. Częstość takich uszkodzeń w Europie wynosi 300 000 przypadków rocznie, a do najczęstszych przyczyn należą wypadki samochodowe, obrażenia ostrymi przedmiotami i złamania kości długich. Mimo zaawansowanych technik chirurgicznych przywracanie funkcji ruchowych i czuciowych jest często nieosiągalne. Regeneracja nerwów obwodowych jest szczególnie trudna u osób, u których nastąpiło opóźnienie w zabiegu chirurgicznym lub w przypadkach regeneracji aksonów w dużej odległości. Z racji powolnego tempa regeneracji neuronów (1–3 mm/dzień) regenerujące się aksony pozostają pozbawione łączności przez miesiące lub lata. W takich warunkach komórki Schwanna w dystalnych zakończeniach przeciętych nerwów pozostają zwykle przewlekłe odnerwione, co prowadzi do utraty zdolności do uzyskiwania komórek naprawczych.

Istnieje więc zapotrzebowanie na skuteczne leczenie sprzyjające regeneracji.

Mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej posiadają zdolność do różnicowania w komórki innych tkanek, potencjał do endogennej stymulacji procesów naprawczych w miejscu uszkodzenia i aktywność immunomodulacyjną, a także właściwości proangiogenne. To rodzi nadzieje, że podjęcie wczesnej interwencji chirurgicznej wraz z zastosowaniem stymulowania regeneracji z użyciem ASC poprawi kliniczne wykładniki



powrotu funkcji neurologicznych po uszkodzeniu nerwów.

Autorka w swej pracy postawiła sobie za cel zbadanie przydatności mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) szczura do wspomagania procesów naprawczych uszkodzeń mechanicznych nerwów obwodowych z wykorzystaniem rusztowań tkankowych wykonanych metodami inżynierii materiałowej.

W dalszej kolejności Autorka w sposób bardzo logiczny i przemyślany formułuje szczegółowe cele niniejszej dysertacji:

- dokonano charakterystyki ASC izolowanych z wybranych lokalizacji tkanki tłuszczowej szczura, porównując ich cechy fenotypowe i czynnościowe.
- oceniono potencjał ASC do różnicowania w kierunku neuralnym i zbadano wpływ czynników wzrostu – NGF, VEGF i bFGF na zdolność do różnicowania w komórki tkanki nerwowej.
- zbadano wpływ ASC oraz ich sekretomu na tempo wzrostu oraz zdolność do naprawy uszkodzeń mechanicznych w hodowli komórek linii N2a, wywodzącej się z mysiej neuroblastomy.

Do realizacji wyżej wymienionych celów autorka zaprojektowała protokół badania, w którym kolejno weryfikuje swoje hipotezy naukowe. Na najwyższe uznanie zasługuje opracowanie bardzo dokładnego i logicznego schematu przeprowadzonej analizy z zastosowaniem najnowocześniejszych technik badawczych. Przyjęte metody badawcze zgodne są z międzynarodowymi standardami tego typu badań naukowych. Autorka przeprowadziła szczegółową i dobrze dobraną metodykę statystyczną analizując uzyskiwane wyniki.

Opis wyników jest bardzo staranny i klarowny stanowiąc logiczną konsekwencję podjętych



metod badawczych. W podobnym układzie, Doktorantka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników odnosząc się do dostępnej literatury w piśmiennictwie światowym.

Autorka sformułowała wnioski bezpośrednio podsumowujące uzyskane wyniki na podstawie kolejnych etapów swoich prac analitycznych na końcu rozdziału Dyskusja:

-Niezależnie od lokalizacji tkanki tłuszczowej, izolowane z niej mezenchymalne komórki macierzyste wykazują zbliżone cechy fenotypowe i czynnościowe, a także zdolność do różnicowania w kierunku neuralnym.

-Spośród wykorzystanych czynników wzrostu, NGF w największym stopniu wpływa na zdolność do różnicowania ASC w kierunku neuralnym, natomiast żaden z badanych czynników wzrostu nie ma wpływu na ich potencjał do zwiększenia proliferacji linii komórkowej N2a, wywodzącej się z mysiej neuroblastomy.

-ASC znamienne skracają czas naprawy uszkodzeń mechanicznych komórek linii N2a wywodzącej się z mysiej neuroblastomy.

- Nanowłóknina wykonana z kopolimeru poli-(L-laktydu) z poli-(ε-kaprolaktonem) z polianiliną (P(LLA-CL)/PANI) z dodatkiem kolagenu wpływa pozytywnie na proneurogenne właściwości ASC in vitro poprzez wzrost ekspresji genów związanych z różnicowaniem w kierunku neurogenezy.

- Tubularne rusztowanie tkankowe z kopolimeru poli-(L-laktydu) z poli-(ε-kaprolaktonem) z polianiliną (P(LLA-CL)/PANI) z dodatkiem kolagenu zasiedlone mezenchymalnymi komórkami macierzystymi izolowanymi z tkanki tłuszczowej szczura wspomaga naprawę uszkodzeń mechanicznych nerwów obwodowych w modelu in vivo poprzez stymulację wzrostu włókien nerwowych.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta ale również klinicysty pragnę wyrazić kilka uwag:



W literaturze opisano szereg badań z zastosowaniem ASC na regenerację nerwów w modelach zwierzęcych. Praca Tremp i wsp., 2018, którą cytuję autorka wydaje się dość zbliżona co do metod zastosowanych w niniejszej dysertacji. Autorzy opisali poprawę w zakresie testów behawioralnych u zwierząt leczonych ASC. Warto poszerzyć w dyskusji omówienie podobieństw i różnic w protokołach badawczych w tych projektach.

Bardzo istotnym elementem oceny w aspekcie regeneracji byłby poszerzony protokół badań behawioralnych i ruchowych u zwierząt poddawanych obserwacji po uszkodzeniu nerwu kulszowego. Proszę o poruszenie w dyskusji w czasie obrony jakie testy mogłyby być ważne i przydatne w tym zakresie.

W praktyce klinicznej stosowane są intensywne metody rehabilitacji i fizykoterapii u pacjentów po uszkodzeniach nerwów – czy według autorki mogłoby to poprawiać efekty działania komórek macierzystych, wówczas gdyby udało się udowodnić ich efekt terapeutyczny?

Czy należałoby się spodziewać jakiś działań niepożądanych przy użyciu takiej metody terapeutycznej- ten temat również należałoby poruszyć w Dyskusji.

Powyższe uwagi zostały sprowokowane lekturą niniejszej dysertacji i wynikają z zainteresowania Recenzenta tym zagadnieniem i w niczym nie umniejszają wartości tej pracy.

Ważnym aspektem całej dysertacji jest fakt, że po raz pierwszy użyto kondukt z tego typu polimeru zawierającego kolagen i zasiedlanego mezenchymalnymi komórkami macierzystymi izolowanymi z tkanki tłuszczowej szczura co stanowi o jej oryginalnym charakterze.

Praca stanowi kontynuację badań w Zakładu Medycyny Regeneracyjnej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, PIB w Warszawie dotyczących prac nad



zastosowaniem komórek macierzystych w procesie regeneracji. Ośrodek ten kierowany przez Pana prof. dr hab. n med. Zygmunta Pojdy jest słynny i niezwykle ceniony w kraju i za granicą. Niniejsza dysertacja ma charakter nowatorski i jest oryginalna oraz wnosi wiele nowych danych do całokształtu badań nad regeneracją nerwów obwodowych. Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością, starannością i rzetelnością naukową, co bardzo dobrze wróży na przyszłość dla jej kariery naukowej.

Dlatego też, mam zaszczyt wnieść do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie lek. med. Aleksandry Zołocińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Neurologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Prof. dr hab. n. med. Konrad Rejdak

