Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego
Polska Akademia Nauk
Pracownia Bioinżynierii komórek Macierzystych
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
tel. (48 22) 6086449

Prof. dr hab. n. med. Leonora Bużańska
Kierownik Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych

Warszawa, 17.09.2017

Recenzja pracy doktorskiej mgr KATARZYNY FUTOMA
„Charakterystyka epineurium oraz ocena odpowiedzi immunologicznej po jego zastosowaniu jako bariery ochronnej zapobiegającej powstawaniu nerwiaków w obwodowym układzie nerwowym"

Tematem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest opracowanie nowej metody modulacji odpowiedzi organizmu na uszkodzenie nerwu obwodowego przez zastosowanie epineurium jako bariery ochronnej.

Przerwanie ciągłości nerwów obwodowych, z uwagi na znaczną zdolność obwodowego układu nerwowego do regeneracji, zwykle kończy się odbudową uszkodzeń i przywróceniem funkcji, ale tylko wówczas, kiedy ubytek tkanki nerwowej jest niewielki. Problem badawczy postawiony w tej pracy dotyczy łagodzenia skutków przerwania ciągłości nerwów, w sytuacji, w której regeneracja nie jest możliwa, tj. przy znacznych ubytkach nerwu lub braku dystalnego końca nerwu po amputacji.

Doktorantka postanowiła sprawdzić, czy zastosowanie epineurium do zaopatrzenie końca uszkodzonego nerwu jako „naturalnego opatrunku" może zapobiec tworzeniu się nerwiaka pourazowego i bólu neuropatycznego. Epineurium jest najbardziej zewnętrzną warstwą tkanki łącznej zabezpieczającą pęczki nerwowe w obwodowym układzie nerwowym i może stanowić skuteczną ochronę przed patologicznym wpływem mikrośrodowiska uszkodzonej tkanki na zmiany w otoczeniu regenerujących nerwów. Doniesienia dotyczące zastosowania epineurium w badaniach eksperymentalnych i w klinice do leczenia małych ubytków tkanki nerwowej, a także do zaopatrzenia końców uszkodzonych nerwów, są pozytywne. Brak jest jednak usystematyzowanej wiedzy na temat mechanizmów, które leżą u podstaw pozytywnego działania epineurium.

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 22-09-2017
L. dz. 427/2017

Doktorantka podjęła się trudnego zadania charakterystyki na poziomie molekularnym i komórkowym zmian zachodzących w tkankach w obrębie operowanego obszaru, jak również porównania właściwości immunologicznych, neurogennych czy angiogennych epineurium pochodzącego z różnych źródeł.

Tematyka ta wpisuje się precyzyjnie w bieżącą działalność Samodzielnego Laboratorium Biologii Komórek Macierzystych i Nowotworowych, którą kieruje Promotor omawianej pracy Pani Profesor Aleksandra Klimczak, czego dowodem jest publikacja z pierwszej części wyników dysertacji, która ukazała się w 2017 roku w czasopiśmie Histology and Histopathology.

Pracę podzielono na dwa etapy. Pierwszy miał na celu określenie optymalnego źródła ludzkiego epineurium do przeszczepów. Osiągnięto to porównując właściwości epineurium, które pochodzi z nerwów pozyskanych z kończyn amputowanych, z epineurium ludzkich nerwów obwodowych pozyskanych od zmarłych dawców narządów. Przeprowadzono wnikliwą charakterystykę ich właściwości immunologicznych (oszacowując obecność antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II, limfocytów T i makrofagów), proangiogennych (badając obecność czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF i CD31) oraz neurogennych (oszacowując występowanie antygenów współwystępujących ze wzrostem aksonów, takich jak białka GFAP lub S-100). Dodatkowo przeprowadzono podobną charakterystykę właściwości szczurzych epineurium, co było konieczne dla rozpoczęcia drugiego etapu pracy, w którym badano efektywność porównywanych epineurium na w hamowaniu rozwoju nerwiaka pourazowego w przeszczepie zaopatrującym nerw kulszowy u szczura. Po 6 oraz 12 tygodniach obserwacji przeprowadzono ocenę odpowiedzi immunologicznej poprzez zbadanie obecności stanu zapalnego w obszarze operowanym oraz ocenę wpływu czynników immunologicznych i neurotroficznych na powstawanie nerwiaka i bólu neuropatycznego. Ten drugi etap pracy wymagał porównania wyników badań po przeszczepie ksenogenicznego epineurium u szczurów z zachowanym układem immunologicznym z wynikami obserwacji u szczurów atymicznych, czyli pozbawionych funkcji grasicy.

Doktorantka dostarczyła przekonywujących dowodów na pozytywny wpływ epineurium w leczeniu nerwiakow w każdym wariancie eksperymentalnym. Wykazała jednak znaczącą przewagę epineurium pozyskiwanego od dawców narządów, nad epineurium pobranym z nerwów kończyn amputowanych, co jest związane z mniejszą immunogennością i zwiększonym potencjałem angiogennym tkanki pobranej od zdrowych dawców.

Konstrukcja pracy, przebieg doświadczeń i metodologia zostały zaplanowane perfekcyjnie. Praca ma podział klasyczny, rozpoczyna ją spis treści, a następnie przydatny spis skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i piśmiennictwo. W preambule umieszczono referencje do publikacji i wykaz doniesień zjazdowych prezentujących wyniki pracy. Praca zawiera 132 strony maszynopisu, w tym 31 rysunków, 6 tabel oraz 164 pozycje piśmiennictwa. Tekst jest napisany poprawną polszczyzną i starannie edytowany – znalazłam zaledwie parę drobnych literówek i jedną lub dwie niezręczności stylistyczne.

Wstęp zawiera wprowadzenie do wszystkich ważnych wątków merytorycznych występujących w pracy, którymi są: 1) budowa nerwów obwodowych ze szczególnym uwzględnieniem budowy i funkcji epineurium; 2) mechanizmy rozwoju nerwiaków pourazowych z dokładnym opisem przemian molekularnych towarzyszących zwyrodnieniu Wallera i regeneracji uszkodzonych nerwów; 3) czynniki neurotroficzne i immunomodulacyjne, zaangażowane w regenerację nerwów: NGF, CNTF, VEGF, laminina i białko GFAP; 4) opis genezy bólu neuropatycznego, ze szczególnym uwzględnieniem roli peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) oraz 5) opis obecnych metod leczenia i zapobiegania tworzeniu nerwiaków zarówno w postępowaniu klinicznym jak i w fazie badań eksperymentalnych. We wstępie zabrakło mi jedynie dokładniejszego odniesienia do białka S-100, które wraz z GFAP stosowane jest w tej pracy jako marker regeneracji nerwów.

Cel główny pracy przedstawiono w sposób opisowy, co było konieczne z uwagi na wielowątkowość zagadnień podjętych w dysertacji. Praca, z jednej strony wymagała charakterystyki i wyjaśnienia na poziomie molekularnym i komórkowym, mechanizmów działania epineurium przy zabezpieczeniu uszkodzonych nerwów, z drugiej zaś strony wymagała potwierdzenia skuteczności działania zastosowanej metody w eksperymentach behawioralnych in vivo. Dlatego cele szczegółowe przedstawiono w postaci dwóch jasno wyodrębnionych etapów pracy: pierwszy etap, przeprowadzany *in vitro*, w którym porównywano epineurium pozyskane z różnych źródeł oraz drugi etap pracy, w którym badano efektywność epineurium *in vivo* w przeszczepach izogenicznych (szczurze epineurium) oraz ksenogenicznych (ludzkie epineurium). W układach ksenogenicznych sprawdzano odpowiedź immunologiczną biorcy zarówno u szczurów z zachowanym układem immunologicznym, jak i szczurów atymicznych, czyli pozbawionych funkcji grasicy.

W dysertacji udowodniono hipotezę, że epineurium od zdrowych dawców skuteczniej zapobiega rozwojowi nerwiaka i występowaniu bólu neuropatycznego niż epineurium izolowane z amputowanej kończyny, ale jednocześnie potwierdzono założenie, że w jako tkanka łączna

bogata w kolagen i elastynę epineurium działa pozytywnie i zmniejsza dolegliwości biorcy w każdym z zastosowanych w tej pracy układzie eksperymentalnym.

Szeroki wachlarz zastosowanych metod, dowodzi, że Doktorantka posiada wszechstronny warsztat eksperymentatora. Metody izolacji i przygotowania epineurium do przeszczepów, analizy histologicznej, immunocytochemicznej oraz molekularnej, a także procedury chirurgiczne i badania behawioralne oraz analiza statystyczna stosowane w tej pracy, są szczegółowo opisane w rozdziale „Materiały i Metody". Praca jest interdyscyplinarna, dlatego jest zrozumiałe, że niektóre z procedur wykonywane były przez osoby współpracujące np. procedury chirurgiczne przy współpracy z dr Arkadiuszem Jundziłło z Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy. Z rozdziału „Materiały i Metody" nie można jednoznacznie wywnioskować, czy badania behawioralne również były prowadzone przez osoby współpracujące, czy bezpośrednio przez Doktorantkę. Nie zmienia to jednak mojej wysokiej oceny zarówno jakości prowadzonych badań jak i całokształtu pracy doktorskiej.

Analiza biologiczna epineurium pozyskanego z ludzkich oraz szczurzych nerwów obwodowych, przedstawiona w części pierwszej rozdziału „Wyniki" zawierała ocenę właściwości immunologicznych (HLA klasy I i klasy II, CD3, CD4, CD8, CD68), właściwości neurogennych (S-100, GFAP, CNTF laminina) oraz angiogennych (CD31, VEGF). Podobną charakterystykę przeprowadzono w części drugiej „Wyników" do oceny odpowiedzi immunologicznej i neurogennej w obrębie uszkodzonych nerwów obwodowych zabezpieczonych osłonką epineuralną. W zaopatrzonej epineurium regenerującej tkance dodatkowo zbadano barwieniem histologicznym zmiany morfologiczne w obrębie nerwu kulszowego oraz określono obecność mRNA dla czynnika bólowego (CGRP) i regeneracyjnego (CNTF) - Real-time PCR.

W tym miejscu z pozycji recenzenta chciałabym jednak zwrócić uwagę na błędne określenia białka wiążącego wapń i typowego dla komórek Schwanna jako antygenu specyficznego dla aksonów (str 63 i 64). Białko S-100 nie podlega ekspresji w neuronach i można go nazwać jedynie jako współwystępujące z aksonami, ponieważ komórki Schwanna tworzą otoczkę mielinową wokół aksonów. Sądzę jednak, ze ta nieścisłość merytoryczna jest związana jedynie z zastosowanym skrótem myślowym, ponieważ Doktorantka na str 98 stwierdza: „fizjologiczna ekspresja S-100 pojawia się na komórkach Schwanna oraz osłonce mielinowej aksonów", co jest prawidłowym oznaczeniem lokalizacji i funkcji tego białka.

Dobór badanych parametrów uważam za bardzo trafny i dobrze oddający zarówno charakterystykę pobranego do przeszczepu materiału jak i zmian w obrębie tkanki

regenerujących nerwów. Na szczególną uwagę zasługuje analiza złożonej odpowiedzi immunologicznej, w której Doktorantka bsdała immunogenność tkanki przeszczepianej poprzez określenie antygenów zgodności tkankowej HLA klasy I i II, a także limfocytów T (CD3) z wyróżnieniem subpopulacji pomocniczych (CD4) oraz cytotoksycznych (CD8), a także makrofagów (CD68), których zwiększona liczba może świadczyć o występowaniu stanu zapalnego. Taka całościowa analiza odpowiedzi immunologicznej była szczególnie cenna przy porównaniu uszkodzonych nerwów obwodowych zabezpieczonych osłonką epineuralną u szczurów z funkcjonalną grasicą i szczurów atymicznych.

Otrzymane wyniki etapu I badań jednoznacznie wykazały mniejszą immunogenność oraz zwiększone właściwości proangiogenne epineurium pozyskanego z nerwów obwodowych od zmarłych dawców w porównaniu do epineurium izolowanego z nerwów z amputowanych kończyn.

Wszystkie przedstawione wyniki etapu II badań prowadzą do ogólnego wniosku, że zastosowanie epineurium z jednej strony powoduje skuteczne zahamowanie wzrostu nerwiaka, ale ze względu na właściwości immunogenne (zarówno w przypadku przeszczepu kseno- jak i izogenicznego) indukuje stan zapalny (obecność mRNA dla czynnika bólowego CGRP) i podtrzymuje ból neuropatyczny. Znacznie szybszy powrót do sprawności uszkodzonej kończyny obserwowany był u zwierząt atymicznych z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną, co dodatkowo wskazuje znaczenie elementu zapalnego w odpowiedzi behawioralnej. Ponieważ rozwój nerwiaka u szczurów kontrolnych, u których przerwany nerw nie został zabezpieczony przez epineurium, w znacznie większym stopniu powodował dolegliwości bólowe, Doktorantka słusznie wnioskuje, że epineurium może być stosowane klinicznie jako materiał biologiczny stanowiący barierę pomiędzy regenerującymi aksonami a mikrośrodowiskiem produkującym czynniki troficzne indukujące wzrost aksonów, co zapobiega tworzeniu nerwiaków pourazowych.

W rozdziale „Dyskusja" omówiono i uzasadniono otrzymane wyniki. Interpretując wyniki Doktorantka wykazała się dużą znajomością literatury w omawianej dziedzinie. Cytowane piśmiennictwo zawiera wybrane dane dotyczące przedmiotu badań, w tym również najnowsze pozycje. Przedstawione punkty w rozdziale „Wnioski" zawierają również zwięzłe podsumowanie wyników. Streszczenie zamieszczone w języku polskim i angielskim umożliwia szybkie zapoznanie się z problematyką i wynikami pracy.

Podsumowując recenzowana praca ma duże znaczenie poznawcze oraz praktyczne, a jej wyniki mogą wpłynąć na opracowanie nowych metod klinicznych zapobiegających powstawaniu nerwiaków i bólu neuropatycznego w obwodowym układzie nerwowym.

Moje uwagi krytyczne dotyczące skrótów myślowych w określeniu niektórych markerów neurogenezy są znikome w porównaniu z wartością merytoryczną tej pracy i bogactwem metod zaprezentowanych przez Doktorantkę, dlatego nie zmieniają ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej dysertacji.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia14 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.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Katarzyny Futoma do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej przed Wysoką Radą Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość poznawczą otrzymanych wyników oraz wyjątkową staranność w opracowaniu i przedstawieniu tak dużego i wielowątkowego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. Leonora Buzanska

KIEROWNIK
Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych

prof. dr hab. n. med. Leonora Bużańska