

## **Recenzja pracy doktorskiej**

**pt.: „Wykorzystanie owodni ludzkiej jako nieinwazyjnego i łatwo dostępnego źródła komórek macierzystych w leczeniu ran oparzeniowych” którą przygotowała mgr inż. Diana Kitala; Młodszy Asystent w Centrum Leczenia Obrażeń w Siemianowicach Śląskich.**

Leczenie oparzeń stanowi nadal poważny problem medyczny i wyzwanie dla chirurgów w celu ratowania życia ludzkiego. Ponad 90% wszystkich urazów rejestrowanych w medycynie katastrof na świecie stanowią oparzenia i wymagają natychmiastowego leczenia w specjalistycznych ośrodkach posiadających zaplecze zapewniające kompleksowe postępowanie. W Polsce śmiertelność wynikająca z leczenia ran oparzeniowych utrzymuje się na poziomie około 5% co stanowi podobny wskaźnik śmiertelności z powodu oparzeń jak w krajach wysokorozwiniętych. Postępowanie dotyczące ratowania życia ciężko poparzonemu obejmuje zabezpieczenie rozległych i głębokich obrażeń i adekwatne postępowanie medyczne/chirurgiczne w pierwszych godzinach, dniach w walce ze wstrząsem poparzeniowym.

Rozwój nauki i nowych technologii w medycynie umożliwia skuteczne leczenie chorych z oparzeniami nowymi innowacyjnymi metodami z wykorzystaniem własnych przeszczepów skórnych zasiedlonych komórkami, hodowlą keratynocytów, opracowaniem tzw. sztucznej skóry będącej biozgodnym opatrunkiem czasowym, wykorzystaniem hodowli komórkowych komórek międzygatunkowych czy też obcogatunkowych itp. Jedną z takich możliwości stanowią innowacyjne metody badawcze nad komórkami macierzystymi, które są produktem leczniczym terapii zaawansowanej zgodnie z międzynarodową klasyfikacją i podlegają obowiązkowi wytwarzania w szpitalu zgodnym z obowiązującymi przepisami GMP w oparciu o decyzję o wytwarzaniu Głównego Inspektora Farmaceutycznego w przypadku stosowania w praktyce klinicznej u chorych. Praca doktorska przedstawiona do oceny podejmuje ważny problem badawczy i proponuje praktyczne rozwiązania w odpowiedzi na potrzeby kliniczne.

Błona owodniowa stanowi wewnętrzną część łożyska od strony płodowej i zbudowana jest z trzech warstw (nabłonkowej, błony

podstawnej i nieunaczynionej warstwy komórek mezenchymalnych) i stanowi źródło komórek macierzystych, a jednocześnie posiada właściwości bakteriostatyczne i przeciwwirusowe co powoduje, że spełnia oczekiwania kliniczne w celu wykorzystania w przeszczepach czy też medycynie regeneracyjnej.

Cele postawione przez Doktorantkę, zastosowane techniki, metody oraz wykonane badania eksperymentalne *in vitro* - hodowle komórkowe, a następnie opracowane wyniki badań dla potrzeb klinicznego zastosowania stanowią całość i są spójne z postawionymi tezami.

Prowadząc hodowle komórkowe Doktorantka proponuje różne metody i techniki, które mogą mieć później zastosowanie w praktyce klinicznej z uwzględnieniem kosztów. Arkusze utworzone tylko z komórek owodni lub kontroli hodowli komórek owodni z fibroblastami, bądź ADRC umożliwiają przenoszenie do drugiego naczynia bez naruszenia integralności struktury. Jest to ważne technicznie rozwiązanie umożliwiające dalsze badania i zapobieganie rulonizacji dla potrzeb klinicznych. Przenoszenie arkusza badane było w odniesieniu do opatrunku hydrożelowego, opatrunku Suprathel®, siatki dla celów medycznych, opatrunku z kolagenu suszonego, opatrunku z kolagenu liofilizowanego, jak również na skórę i owodnię allogeniczną. W oparciu o test Kruskala-Wallisa Doktorantka potwierdziła istotną statystycznie różnicę w liczbie odzyskanych komórek ( $p < 0.001$ ). Największa jednak liczba odzyskanych komórek możliwa jest dzięki zastosowaniu powszechnie używanej metody enzymatycznej (aż w 87,8%), powoduje to jednak dezintegrację. Doktorantka wykazała, że użycie enzymu Dispaza II zapewnia uzyskanie statystycznie istotnej większej liczby odzyskanych komórek, niż przenoszenie komórek za pomocą opatrunku hydrożelowego ( $p = 0.002$ ), opatrunku Suprathel® ( $p < 0.001$ ), siatki do celów medycznych ( $p < 0.001$ ), siatki wraz z przepłukaniem pipetą Pasteura 3ml ( $p < 0.001$ ) czy opatrunku z kolagenu suszonego ( $p < 0.001$ ). Wykazano w doświadczeniu, że istotnie większą liczbę komórek przeniesiono z kolagenem liofilizowanym w porównaniu do opatrunku hydrożelowego ( $p = 0.009$ ), opatrunku Suprathel® ( $p = 0.002$ ), siatki do celów medycznych ( $p = 0.001$ ) z metodą łączącą przepłukanie pipetą Pasteura i zastosowaniem siatki do celów medycznych ( $p < 0.001$ ), skórą allogeniczną ( $p = 0.019$ ), opatrunkiem kolagenowym suszonym ( $p < 0.001$ ). Badanie jednoznacznie potwierdziło, że najmniejszą liczbę komórek

przeniesionych uzyskuje się przy zastosowaniu opatrunku kolagenowego suszonego (7,9%). Liczba przeniesionych komórek jest istotnie statystycznie niższa od liczby komórek przeniesionych za pomocą owodni i skóry allogenicznej oraz opatrunku kolagenowego suszonego ( $p=0.002$ ).

Z badań wynika, że najlepszą metodą do przeniesienia pełnego arkusza komórek w stosunku do metody enzymatycznej jest wykorzystanie opatrunku kolagenowego liofilizowanego oraz przeniesienie owodni i skóry allogenicznej co ułatwia późniejsze zastosowanie w praktyce klinicznej.

**Doktorantka wykonując badanie opisała ważną z klinicznego punktu widzenia obserwację i stwierdziła, że zarówno skóra, jak i owodnia ulegają zasiedleniu.** Obserwowała również możliwość hodowli komórek przez 10 dni na celularnych opatrunkach biologicznych i wypełnianie/„zarastanie” ubytków przez komórki owodni i napływające fibroblasty.

**Koszty związane z wytwarzaniem i możliwościami transferu technologii do codziennej praktyki klinicznej stanowią również ważną część pracy doktorskiej.** Podstawowym elementem pracy jest oszacowanie kosztów wytwarzania co stwarza możliwości zastosowania w praktyce klinicznej (koszty związane z otrzymaniem materiału to około 50pln), a następnie przetworzeniem owodni na biostatyczne i/lub allogeniczne przeszczepy. Źródłem komórek macierzystych są elementy owodni, które pozostały po przetworzeniu owodni. Wykorzystywane do przygotowania komórek medium hodowli w jednej butelce przez 21 dni to 66pln, koszty hodowli fibroblastów to 100,23pln, a keratynocytów to 216,97pln. Dodatkowy koszt to enzym Dispaza potrzebny w hodowli komórek owodni w celu przeniesienia pełnej, zintegrowanej struktury komórek w postaci arkusza.

Aktualna sytuacja ekonomiczna szpitali i ośrodków specjalizujących się w procedurach leczenia ran oparzeniowych wymaga oszacowania realnych kosztów prowadzonego leczenia i poszukiwania tanich metod wytwarzania, które umożliwią wdrożenie metody/techniki do codziennej praktyki klinicznej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska opracowana została w sposób typowy, a jej niewątpliwą zaletą jest dobrze udokumentowany materiał badawczy w postaci tabel, wykresów i rycin oraz dokumentacja fotograficzna z praktyki klinicznej co potwierdza tylko potrzebę/konieczność analizy metod, zastosowanych technik wykonania i założeń pracy dla potrzeb klinicystów. Poza nielicznymi błędami językowymi praca jest napisana zrozumiałą, ładną polszczyzną i nie sprawia trudności w rozumieniu merytoryki trudnego tematu dla osób nie będących specjalistami przez co stanowi ważne uzupełnienie wiedzy w tym obszarze badań naukowych, jak również znaczenia dla praktyki klinicznej.

Dodatkowo przekazana mi do opinii, przygotowana przez Doktorantkę publikacja naukowa o charakterze klinicznym w oparciu o zastosowane metody badawcze opisane w rozprawie doktorskiej i wykorzystane w praktyce chirurgicznej upoważniają mnie z pełnym przekonaniem do wyrażenia opinii, że

„Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 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.)”

Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o wyróżnienie pracy doktorskiej.

**W uzasadnieniu** zwracam uwagę na praktyczne znaczenie wyników pracy dotyczące w szczególności metodologii i osiągniętych wyników jej powtarzalność w każdych warunkach laboratoryjnych, opracowanie i oszacowanie niskich nakładów dla praktyki klinicznej i bardzo wysokie prawdopodobieństwo wdrożenia do terapii w ośrodkach chirurgicznych specjalizujących się w leczeniu ran oparzeniowych co zostało dobrze udokumentowane i przedstawione w publikacji naukowej.

Tytuł: Application of advanced therapy medicinal product (amniotic stem cells) in burned patient. Kitala Diana (w druku).

Prof. zw. dr hab. med. Piotr Fiedor