

# UNIWERSYTET MEDYCZNY WE WROCŁAWIU

*im. Piastów Śląskich*

*Katedra i Klinika Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej*

**KIEROWNIK Prof. dr hab. Krzysztof Grabowski**

ul. M. Curie-Skłodowskiej 66 50-369 WROCŁAW tel. 071 784 27 52

e-mail: krzysztof.grabowski@umed.wroc.pl fax 071 327 09 28

---

Wrocław, dnia 01.12.2015r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Diany Kitali

pt.: „Wykorzystanie owodni ludzkiej jako nieinwazyjnego i łatwo dostępnego źródła komórek macierzystych w leczeniu ran oparzeniowych”.

Oparzenia nadal stanowią trudny problem leczniczy i należą do urazów obciążonych wysokim procentem powikłań oraz śmiertelności. Przy rozległych oparzeniach skóry po stabilizacji stanu ogólnego oparzonych chorych pozostaje problem długotrwałego leczenia ran oparzeniowych. Celem tego leczenia jest przywrócenie funkcji uszkodzonej skóry oraz uzyskanie dobrego efektu kosmetycznego. Istnieje wiele metod leczenia ran oparzeniowych, które nie zawsze dają pożądaną efekt. Jedną z metod w leczeniu ran oparzeniowych jest wykorzystanie zdolności regeneracyjnych komórek macierzystych, które uzyskuje się metodami inwazyjnymi, ze szpiku kostnego, krwi obwodowej i pępowinowej oraz tkanki tłuszczowej. Źródłem tych komórek są również embriony, które ze względów etycznych nie są wykorzystywane. Kolejnym źródłem komórek macierzystych jest owodnia ludzka, która jest materiałem odpadowym po akcie naturalnym jakim jest poród.

Biorąc pod uwagę sposób uzyskania owodni oraz cechy regeneracyjne komórek macierzystych temat podjęty w rozprawie doktorskiej mgr inż. Diany Kitali jest aktualny i ważny w aspekcie poprawy gojenia ran oparzeniowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest jednostronnym wydrukiem komputerowym zawartym na 160 stronach, podzielona na 7 rozdziałów z zachowaniem odpowiedniej proporcji. Kolejne części to: wykaz skrótów, tabel, rycin, streszczenie w języku polskim i angielskim.

We wstępie Doktorantka w oparciu o dane z piśmiennictwa omawia zagadnienia dotyczące rodzajów ran w zależności od urazu ze szczególnym uwzględnieniem ran oparzeniowych, gojenia rany oparzeniowej i procedury leczenia chorych oparzonych. Kolejnymi zagadnieniami we wstępie jest biologia

komórek macierzystych, funkcje owodni ludzkiej oraz leczenie oparzeń przy użyciu komórek macierzystych.

Przedstawione zagadnienia we wstępie przybliżają czytającemu problemy, które będą przedmiotem rozprawy doktorskiej.

W rozdziale II cel pracy sprecyzowany jest jasno i dotyczy możliwości wykorzystanie błony owodniowej, jako nieinwazyjnego i łatwo dostępnego źródła komórek macierzystych w celu zastosowania ich w leczeniu ran oparzeniowych. Aby zrealizować cel pracy Doktorantka przedstawiła następujące cele szczegółowe:

1. wybranie optymalnej metody izolacji i hodowli komórek owodni i komórek macierzystych owodni
2. sprawdzenie czy ludzka owodnia zawiera homogenne populacje mezenchymalnych komórek macierzystych, czy jedynie heterogenną populację progenitorowych komórek
3. ustalenie celowości izolacji komórek macierzystych w odniesieniu do ich zdolności gojenia rany in vitro i angiogenezy do heterogennej mieszaniny komórek owodni i komórek macierzystych z tkanek tłuszczowej
4. zbadanie przydatności klinicznej komórek macierzystych owodni.

Materiałem badanym były owodnie pozyskiwane podczas zabiegu cięcia cesarskiego w warunkach bloku operacyjnego w Samodzielnym Publicznym Centralnym Szpitalu Klinicznym im. prof. Kornela Gibińskiego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Przed pobraniem materiału pacjentki wyrażały świadomą zgodę potwierdzoną podpisem na wykorzystanie owodni i komórek z niej pochodzących do badań naukowych. Pacjentki miały wykonywane badania w kierunku zakażenia:

- HIV
- wirusem zapalenia wątroby typu B, C
- kiły.

Pobranym materiałem zgodnie z zasadami aseptyki był umieszczany w pojemniku transportowym i przekazywany do Pracowni Hodowli Komórek i Tkanek in vitro z Bankiem Tkanek w Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich. Materiał był opracowany z zastosowaniem nowoczesnych metod inżynierii tkankowej. Pracownia spełniała normy klasy czystości A/B zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 1 października 2008r.

W Pracowni Hodowli Komórek i Tkanek in vitro przeprowadzono izolacje komórek owodni, ich hodowlę, ocenę komórek macierzystych z hodowli, porównanie heterogennej mieszaniny komórek owodni z wyselekcjonowanymi komórkami macierzystymi owodni. Sprawdzone również metody przeniesienia komórek macierzystych na ranę.

W rozdziale IV Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki badań. Izolowane komórki owodni oceniane były pod kątem:

1. żywotności w zależności od metod izolacji i warunków hodowli
2. procenta komórek apoptotycznych owodni
3. liczby komórek owodni.

Analiza żywotności komórek owodni wykazała, że występuje istotna statystycznie różnica pomiędzy żywotnością komórek izolowanych metodą mechaniczną z trypsynizacją komórek. Średnia żywotność komórek izolowanych mechanicznie (homogenizacją) wynosi 70%, a w przypadku wytrawienia trypsyną 58%.

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w procentach ilości komórek apoptycznych w izolowanych grupach. Badania wykazały również, że średnia ilość komórek uzyskanych drogą homogenizacji jest najwyższa i istotnie różna statystycznie w porównaniu do stosowanych enzymów kolagenazy i trypsyny. Wykazano również, że izolacja enzymem dispaza jest ponad czterokrotnie większa w stosunku do metody z wykorzystaniem kolagenazy i trypsyny. Liczba komórek owodni była analizowana również pod względem kinetyki wzrostu hodowlanych komórek i liczby podwojeń komórek w hodowli. Podwojenie populacji komórek było istotnie mniejsze w przypadku komórek izolowanych enzymem kolagenaza w stosunku do mechanicznej metody, wytrawienia trypsyną i wytrawienia dispazą. Najwyższą wartość podwojenia populacji komórek odnotowano dla komórek wytrawionych trypsyną, a najniższą dla komórek wytrawionych kolagenazą.

Doktorantka badała również czas podwojenia hodowli komórek w interwałach czasowych. Najwyższą wartość podwojenia stwierdzono w 12 dobie dla komórek wytrawionych kolagenazą oraz trypsyną. Najniższą wartość obserwowano w 21. dniu hodowli dla komórek homogenizowanych oraz wytrawionych dispazą.

Zauważono również, że w zależności od zastosowanego medium hodowlanego komórki owodni mają różną morfologię. Zastosowanie mediów KGM-CD, Ham's F12 promuje wzrost komórek o morfologii podobnej do komórek nabłonkowych, a media hodowlane AmioGrow oraz DMEM stymulują wzrost komórek o charakterze fibroblastopodobnym, podobnych do komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej. Morfologia komórek fibroblastopodobnych jest cechą pozwalającą uznać izolowane komórki za komórki macierzyste. Analiza żywotności komórek owodni w zależności od zastosowanego medium hodowlanego pozwala stwierdzić, że medium AmioGrow zapewnia statystycznie większą żywotność komórek od pożywek AMEM, KGM CD oraz Ham's F12. Najniższa żywotność jest uzyskiwana w przypadku stosowania pożywek KGM-CD. Analiza odsetka komórek apoptycznych owodni w zależności od zastosowanego medium hodowlanego wskazuje, że nie ma

istotnych statystycznie różnic w badanych grupach. Średnia liczba komórek apoptycznych wynosiła 11% dla pożywki AmioGrow i Hami's F12 i 12% dla pożywki DMEM. Kolejnymi badaniami określającymi warunki hodowli komórek owodni była analiza ilości komórek owodni w zależności od zastosowanego medium hodowlanego oraz porównanie heterogenicznej mieszaniny komórek owodni z wyselekcjonowanymi komórkami macierzystymi owodni. Dodatkowo oceniano wpływ komórek owodni na cykl komórkowy keratynocytów i fibroblastów oraz oceniano wpływ na potencjał komórek skóry i naskórka do gojenia rany *in vitro*. Doktorantka badała również zdolność do indukowania angiogenezy oraz wpływ na szybkość do indukowania angiogenezy oraz wpływ na szybkość proliferacji komórek skóry i naskórka.

Badania wykazały, że heterogeniczna mieszanina komórek owodni i komórki macierzyste owodni nie wykazują zdolności do tworzenia naczyniopochodnych struktur w warunkach *in vitro*. Komórki owodni hamują zdolność fibroblastów do tworzenia naczyń. Keratynocyty nie wykazują zdolności do angiogenezy w teście *in vitro*. Bardzo ważna dla całego projektu badawczego była analiza zdolności heterogenicznej mieszaniny komórek owodni oraz wyizolowanych z tej mieszaniny komórek macierzystych owodni do różnicowania w trzy linie komórkowe wywodzące się z mezodermy. Analiza po pierwszym pasażu wykazała, że zarówno heterogeniczna mieszanina komórek owodni, jak i mezenchymalne komórki macierzyste owodni (hAHMSCs) wykazują po 14 dniach zdolność do różnicowania w adipocyty, chondrocyty i osteocyty. Należy zauważyć, że przeprowadzone wcześniej badania są podstawą do klinicznych badań w tej pracy, to jest analizy gojenia rany *in vitro*, różnicowanie komórek macierzystych owodni w komórki skóry i naskórka oraz standaryzacja transferu komórek macierzystych na ranę. Doktorantka wykazała, że owodnia jest źródłem komórek macierzystych mających duży potencjał do wykorzystania ich w gojeniu ran oparzeniowych. Owodnia ludzka jest lepszym źródłem komórek macierzystych niż tkanka tłuszczowa. W celu zastosowania ich w praktyce klinicznej należy stosować komórki po pierwszym pasażu hodowli. Komórki owodni można przenosić w postaci arkusza z wykorzystaniem skóry i owodni allogenicznej lub kolagenu liofilizowanego. Uzyskane wyniki badań były usystematyzowane i przedstawione graficznie w postaci 52 barwnych wykresów, 1 tabeli oraz zestawie 21 barwnych fotografii.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w oparciu o dane z piśmiennictwa w pierwszej części bardzo szczegółowo analizuje fizjologię procesu gojenia się ran oraz stosowane do tej pory metody leczenia ran oparzeniowych. Pozostała część dyskusji poświęcona jest omówieniu i analizie uzyskanych wyników badań. Całość dyskusji opiera się na danych z piśmiennictwa. Z dyskusji wynika, że owodnia

ludzka jest dobrze rokującym źródłem komórek macierzystych mających duży potencjał w gojeniu ran oparzeniowych. Wyniki badań uzyskane przez mgr inż. Dianę Kitale wskazują, że owodnia ludzka jest lepszym źródłem komórek macierzystych niż tkanka tłuszczowa. Niezwykle ważnym jest udowodnienie przez Doktorantkę, że komórki owodni można przenosić na ranę oparzeniową w postaci arkusza z wykorzystaniem skóry, owodni allogenicznej lub kolagenu liofilizowanego. Autorka tej rozprawy doktorskiej idzie znacznie dalej i na podstawie swoich badań wskazuje na celowość stworzenia biowitalnego przeszczepu z samymi komórkami owodni lub w hodowli z keratynocytami.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały podsumowane w 4 wnioskach, które są konsekwencją tych badań. Wnioski jednoznacznie wskazują na przydatność owodni ludzkiej w uzyskiwaniu komórek macierzystych, które następnie będą wykorzystywane w procesie gojenia ran oparzeniowych.

Pracę uzupełnia 135 pozycji piśmiennictwa, które jest aktualne, trafnie cytowane.

Zawarte w pracy streszczenie w języku polskim i angielskim w sposób czytelny stanowi podsumowanie przeprowadzonych badań, przebieg dyskusji i uzyskanych wniosków.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalnym opracowaniem dotyczącym praktycznego wykorzystania owodni ludzkiej w celu uzyskania komórek macierzystych do leczenia ran oparzeniowych. Doktorantka mgr inż. Diana Kitale zrealizowała cele postawione w pracy. Należy podkreślić, że opracowała metodę uzyskiwania i hodowli komórek owodni, co na pewno znacznie przyczyni się do postępu w zakresie leczenia ran oparzeniowych. Praca przygotowana jest starannie napisana, poprawnym językiem.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595, z późn.zm.).

Stawiam więc wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem lekarsko – Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie mgr inż. Diany Kitale do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę przydatność praktyczną uzyskanych wyników badań oraz oryginalny opracowany przez Doktorantkę model badań wykorzystany w recenzowanej rozprawie doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy.