Dr hab. Artur Kamiński
Kierownik
Zakładu Transplantologii
i Centralnego Banku Tkanek
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa, dn. 8.01.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Marcina Piejko pt.: "*Tłuszczopochodne mezenchymalne komórki macierzyste w leczeniu przetok odkryptowych i w chorobie Crohna. Optymalizaja hodowli, implantacji i nowe propozycje lecznicze*"

Przetoki odbytowe i odbytowo-pochwowe wpływają znacząco na pogorszenie jakości życia w wielu jego aspektach pacjentów dotkniętych tym schorzeniem. Występują w przebiegu wielu chorób: jako powikłanie zapalenia uchyłków, zakażeń gruczołów odbytu, ropni gruczołów Bartholiniego, martwicy przestrzeni odbytniczo-pochwowej, towarzyszą chorobom zapalnym jelit – chorobie Leśniowskiego-Crohna i zapaleniu wrzodziejącemu jelita grubego. Mogą być też objawem zaawansowanych nowotworów lub powikłaniem ich leczenia, a także powikłaniem innych operacji proktologicznych lub w obrębie pochwy. Leczenie tego schorzenia jest operacyjne i obarczone niestety dużym odsetkiem niepowodzeń. Dlatego udoskonalane są dotychczas stosowane oraz rozwijane nowe techniki mające prowadzić do wyleczenia, którego głównym elementem jest prawidłowa, sekwencyjne następująca regeneracja tkanek. Pomocne w uzyskaniu tego celu mogą być osiągnięcia medycyny regeneracyjnej.

Medycyna regeneracyjna to rozwijająca się dynamicznie od połowy XX wieku gałąź medycyny, której celem jest wykorzystanie różnych technik, mających na celu poprawę funkcjonowania uszkodzonych tkanek i narządów. Zaliczyć do niej należy przeszczepianie narządów, tkanek i komórek, wszczepianie wyrobów medycznych oraz zastosowanie produktów leczniczych terapii zaawansowanej. Ta ostatnia grupa została wydzielona i opisana przed 14 laty. Zalicza się do niej: terapię komórkami somatycznymi, inżynierię tkankową oraz terapię genową.

W okresie ostatnich 20 lat szczególnie rozbudzają nadzieję terapie z zastosowaniem komórek macierzystych. Wpisują się one w kryteria medycyny spersonalizowanej, komórki macierzyste dają nadzieję, że możemy nie tylko naprawić, ale także zregenerować uszkodzone i upośledzone tkanki ciała w celu przywrócenia ich pierwotnych funkcji. Lekarze poddawani są presji, aby wykonać zabieg, gdy tylko może okazać się obiecujący. Presja ta wywierana jest przez pacjentów, firmy biotechnologiczne, media i uniwersytety, które są zainteresowane wszelkimi innowacjami w medycynie. Pamiętać jednak należy, że obecnie dobrze udokumentowane efekty terapeutyczne dotyczą wyłącznie przeszczepów hematopoetycznych komórek macierzystych i hodowanych komórek naskórka. Wszystkie pozostałe terapie z zastosowaniem komórek macierzystych należy uznać na obecnym etapie ich rozwoju za eksperymentalne i wymagające gruntownego poznania i potwierdzenia skuteczności.

Dlatego też, podjęte przez lek. Marcina Piejko badania mające na celu propozycję leczenia nawracających oraz przetrwałych przetok odbytu i odbytniczo-pochwowych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych i wyrobów medycznych, również we wzajemnej kombinacji poprzez tworzenie produktów inżynierii tkankowej uważam za istotne zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

Przedstawiona mi do recenzji praca wydaje się mieć układ typowy, liczy 159 stron, zawiera 29 tabel i 27 rycin oraz 152 pozycje piśmiennictwa. Składa się z 7 rozdziałów i załącznika: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz rycin i tabel, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Piśmiennictwo.

We *Wstępie*, na stronach 13-38, Autor najpierw wprowadza czytelnika problematykę dotyczącą przetok odbytu i odbytniczo-pochwowych, podając ich etiologię, najczęściej odkryptową, częstość występowania, wskazuje na różnice w statystyce pomiędzy zapadalnością i chorobowością, objawy i skuteczność leczenia, a właściwie brak skuteczności pierwszorazowego zaopatrzenia i konsekwencje społeczne tego schorzenia. W dalszej części przedstawia klasyfikację przetok oraz opisuje patofizjologię ich gojenia wskazując na wypływ czynników ogólnoustrojowych i lokalnych wpływających na ten proces. W tym

miejscu, jako osoba ucząca studentów chciałbym zwrócić uwagę Autorowi na stosowanie określenia „śluzówka", która jest zapożyczeniem, przyjętym do żargonu medycznego z określenia z jęz. angielskiego „mucosa". Należałoby raczej konsekwentnie używać określenia „błona śluzowa".
Następnie lek. Marcin Piejko opisuje dostępne współczesne metody zaopatrywania przetok. Wymienia i opisuje różne metody chirurgiczne, analizując ich skuteczność, leczenie biologiczne, zastosowanie biomateriałów jak: kleje, zatyczki (kolagenowe i syntetyczne resorbowalne), miejscowe zastosowanie czynników wzrostu i różnicowania, wskazując na graniczenia i problemy związane ze standaryzacją ich stosowania. Kolejny podrozdział poświęcony jest charakterystyce mezenchymalnych komórek macierzystych. Autor opisuje miejsca występowania w organizmie człowieka mezenchymalnych komórek macierzystych, ich cechy, w tym zdolność do różnicowania oraz fenotyp na podstawie obecności określonych (CD105, CD73, CD90) i braku (CD45, CD34, CD14, lub CD11b, CD79alpha, lub CD19 i HLA-DR) antygenów prezentowanych na błonie komórkowej, ich rodzaje w zależności od lokalizacji i interakcje z tkankami. W końcowej części tego podrozdziału wskazuje na kontrowersje dotyczące mezenchymalnych komórek macierzystych, opisane zastosowania kliniczne tych komórek jako iniekcji zawiesiny oraz po zasiedleniu trójwymiarowych rusztowań. W kolejnym podrozdziale Autor porusza po krótce ważki temat jakim jest wdrażanie do zastosowania leczniczego produktów inżynierii tkankowej, czyli jak sam pisze "drogę od laboratorium do łóżka pacjenta", zwraca uwagę na uwarunkowania prawne, organizacyjne, współpracę interdyscyplinarną oraz konieczność dostosowania przez naukowców metod wytwarzania tych produktów do reżimu Dobrej Praktyki Wytwarzania, identycznego jak w firmach farmaceutycznych. Ostatni podrozdział wstępu poświęcony jest postępowaniu z pacjentami poddanymi terapiom eksperymentalnym w kontekście obowiązującego w naszym kraju ustawodawstwa dotyczącego eksperymentu medycznego, zarówno leczniczego jak i badawczego. Wskazuje na różnice w ich stosowaniu, uwarunkowaniach związanych z przeprowadzaniem badania klinicznego, porusza rolę lekarza i wykorzystanie eksperymentu w praktyce medycznej. W dalszej jego części Autor omawia aspekty związane z produktami leczniczymi terapii zaawansowanej (ang. ATMP), ustawodawstwo regulujące ich wytwarzanie dopuszczenie do stosowania, formy produktów leczniczych terapii zaawansowanej w zależności od rejestracji produktu: ATMP zarejestrowany, ATIMP i HE-ATMP, rodzaje ATMP w zależności od składu: GM-MP, SCT-MP, TE-MP i Combined ATMP, tkanki jako materiał startowy do ich wytwarzania zauważając odrębne od farmaceutycznego prawo transplantacyjne, któremu podlegają. Wskazuje na wieloetapowość i konieczność dostosowania do różnych regulacji prawnych na kolejnych etapach wytwarzania produktu leczniczego terapii zaawansowanej.

Uważam, że wstęp do dysertacji został opracowany dobrze. Wybór poruszanych w nim zagadnień, ich wielowątkowość z jednej strony, z drugiej zaś, spójność z tematyką pracy świadczy o dojrzałości i szerokiej, wielodyscyplinarnej wiedzy Autora. W częściach wstępu, omawiających eksperymenty medyczne zastosowanie terapii komórkowych oraz produkty lecznicze terapii zaawansowanej zabrakło mi kilku słów komentarza związanych z aspektami etycznymi. W moim przekonaniu ważny wydaje się aspekt zgody czy ochrony pacjenta/ochotnika poddawanego eksperymentowi medycznemu. Istnieje także oczywista sprzeczność w podejściu do możliwości czerpania korzyści finansowych w przypadku leczenia z użyciem przeszczepów komórek, tkanek i narządów w porównaniu do stosowania produktów leczniczych. Czerpanie korzyści finansowych w pierwszym przypadku jest zabronione, wręcz penalizowane, zaś w drugim nie. Uważam również, że należy używać określenia „choroba Leśniowskiego-Crohna" a nie „choroba Crohna".

Cel pracy, strony 39-40, został sformułowany w 3 głównych punktach z podpunktami i obejmuje:

1. Opracowanie propozycji leczenia przetok odbytu z użyciem tłuszczopochodnych mezenchymalnych komórek macierzystych w procedurze dwuetapowej:
   - przygotowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej składającego się z ASC,
   - przeprowadzenie eksperymentu pilotażowego leczenia przetok odbytu w procedurze dwuetapowej,
   - opracowanie niekomercyjnego badania klinicznego w leczeniu przetok odbytu w przebiegu choroby Crohna w procedurze dwuetapowej.
2. Opracowanie biomateriału dedykowanego przetokom odbytniczo-skórnym (o trójwymiarowym kształcie):
   - przedstawienie charakterystyki biochemicznej macierzy zewnątrzkomórkowej z tkanki tłuszczowej (adipoECM),

- ocena biokompatybilności in vivo,
- ocena wgajania się i przebudowy adipoECM in vivo.

3. Opracowanie biomateriału wzbogacanego ASC dedykowanego rekonstrukcji przetok odbytniczo-pochwowych o kształtach płaskich:
   - opracowanie optymalnej proporcji komórek w stosunku do powierzchni biomateriału,
   - przedstawienie charakterystyki wzrostu komórek w biomateriale,
   - scharakteryzowanie potencjału do przebudowy konstruktu biomateriału wraz z komórkami,
   - przeprowadzenie eksperymentu pilotażowego leczenia płaskich ubytków tkanek miękkich przy użyciu konstruktu biomateriału i komórek.

Kolejny rozdział, strony 41-72, zatytułowany *Materiał i metody* został przez Autora podzielony na trzy główne
części: Terapia komórkowa z wykorzystaniem ASC, Decelularyzowana ludzka tkanka tłuszczowa (adipoECM) i Konstrukt ASC-Integra®DRT.

W części pierwszej, w materiałach, lek. Marcin Piejko, informuje że do wytwarzania ASC wykorzystano próbki tkanki tłuszczowej pozyskane jako odpad medyczny. Na pozyskanie tkanek oraz przeprowadzenie eksperymentów leczniczych, a także na planowane niekomercyjne badanie kliniczne uzyskano pozytywne opinie odpowiednich Komisji Bioetycznych. Następnie wymienione zostały odczynniki, które wykorzystano w pracy. W dalszej części opisane zostały kolejno metody wytwarzania ASC z podziałem na 4 etapy: izolację z zastosowaniem kolagenazy I i wirowanie w celu uzyskania frakcji oraz założenie hodowli pierwotnej, hodowlę (2-4 cykli pasażu u wymian pożywki) z zastosowaniem dodatku 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS) lub 8,5% ludzkiego lizatu płytkowego (hPL). Na tym etapie określano czas podwojenia hodowli. W kolejnych etapach opisana została szczegółowo procedura przygotowania ASC do wydania oraz walidacji warunków transportu. Żywotność komórek oceniana w mikroskopie świetlnym w barwieniu błękitem trypanu posłużyła do oceny morfologii i organizacji komórek. Do charakterystyki produktu wykorzystano ocenę jałowości, badanie fenotypu ASC, ocenę różnicowania komórek oraz ich kariotyp. Do oceny jałowości wykorzystano analizę retrospektywną serii ASC HE-ATMP wykonaną w Instytucie Biotechnologii Surowic i Szczepionek BIOMED S.A. oddział w Krakowie zgodnie z Farmakopeą Europejską w zakresie oceny płynu znad tkanki w czasie izolacji i zawiesiny komórek z opakowania przed jego zamknięciem i wydaniem oraz analizę prospektywną międzyoperacyjną: ocena przejrzystości pożywki, obecność mikroorganizmów podczas mikroskopowej obserwacji hodowli, zmiany morfologii komórek, odsetek odklejonych od podłoża komórek, cechy zakażanie materiałów używanych do hodowli oraz warunki środowiskowe pomieszczeń czystych (liczba cząstek, monitoring mikrobiologiczny, kaskada ciśnień), w których prowadzono hodowlę komórkową. Fenotyp hodowanych komórek określano po II pasażu przy użyciu zestawu przeciwciał zabarwionych odpowiednim fluoroforem do oceny fenotypu mezenchymalnych komórek macierzystych, zarówno w zakresie markerów pozytywnych (CD105, CD73, CD90) jak i negatywnych (CD45, CD34, CD11b, CD19 i HLA-DR). Badanie wykonano na ASC od 3 pacjentów, w 3 powtórzeniach do 3 dołków płytki 6.cio dołkowej. Po dodaniu przeciwciał i odpowiednim płukaniu przeprowadzono, dokumentowane zdjęciami, obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym oceniając 100 komórek przy 100.krotnym powiększeniu dla każdego z kanałów fluorescencji. Różnicowanie komórek w hodowlach ASC badano przy 80-90% konfluencji poddając je różnicowaniu w kierunku osteocytów, adipocytów i chondrocytów stosując odpowiednie komercyjnie dostępne pożywki różnicujące. Po trzech tygodniach hodowle utrwalono w 4% formaldehydzie i wykonano odpowiednie barwienia cytochemiczne: czerwienią olejową dla adipocytów, czerwienią aliazarynową S dla osteocytów oraz błękitem alacjanu dla chondrocytów. Obserwacje przeprowadzono w mikroskopie świetlnym. Kariotyp określano w hodowli od 3 pacjentów, po II pasażu w Zakładzie Genetyki Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

W dalszej kolejności, w części pierwszej, opisany został pilotażowy eksperyment leczniczy: dwuetapowa procedura zaopatrzenia przeto przy użyciu ASC. Do leczenia kwalifikowano pacjentów spełniających kryteria włączenia: obecność przetoki odbytowej lub odbytniczo-pochwowej niezależnie od etiologii, przetoka utrzymująca się co najmniej 12 miesięcy pomimo przynajmniej 1 interwencji chirurgicznej oraz możliwość śród-zabiegowego pozyskania tkanki tłuszczowej. Moim zdaniem należałoby stosować określenie „śród-zabiegowego pobrania tkanki…", ponieważ jest to działanie celowe. Określenie „pozyskanie" zgodnie z art. 21 ustawy z dnia 1 lipca 2005 r. o pobieraniu, przechowywaniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów

(Dz.U. z 2020 r. poz. 2134) zarezerwowane jest do sytuacji, gdy komórki, tkanki, narządy lub ich części usunięte są z innych przyczyn niż w celu pobrania z nich komórek, tkanek lub narządów, po uzyskaniu zgody na ich użycie od dawcy lub jego przedstawiciela ustawowego.

Leczenie eksperymentalne przeprowadzono u w latach 2013-2015, na podstawie pozytywnej opinii Komisji Bioetycznej UJCM, po uzyskaniu świadomej zgody pacjentów i przeprowadzonej diagnostyce endoskopowej i ultrasonograficznej. W drugim etapie leczenia u 4 pacjentów, po upływie 2 do 4 tygodni od zaopatrzenia chirurgicznego przetoki w pierwszym etapie, podawano komórki: u dwóch pacjentek pomiędzy ścianę pochwy i odbytnicy, po uprzednim przeszczepieniu mięśnia smukłego uda w tę okolicę, u jednej pacjentki w okolicę szczelinowatego kanału po uprzedniej plastyce od strony pochwy i odbytnicy, u jednego pacjenta, po międzyzwieraczowym podwiązaniu przetoki od strony ściany przetoki. Około ¾ zawiesiny komórek podawano w ściany przetoki, pozostała część odpowiednio od strony ujścia w pochwie (3 pacjentki) lub od ujścia zewnętrznego na skórze (1 pacjent). Obserwację pozabiegową prowadzono przez 12 miesięcy w okresie 1, 4, 8 i 12 tygodni oraz 6 i 12 miesięcy, która obejmowała ocenę subiektywną, wziernikowanie i USG przez odbyt. Za wygojenie uznawano brak objawów klinicznych przetoki, brak komunikacji między pierwotnymi ujściami przetoki w badaniu wziernikowym, zaś za brak nawrotu – brak komunikacji w 12 miesiącu po terapii komórkowej. W końcowej części tego podrozdziału przedstawiono projektowanie badania klinicznego fazy IIa ATIMP ASC w ramach procedury dwuetapowej, zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków dla ATMP i biorąc pod uwagę dotychczas przeprowadzone badania kliniczne. Przyjęto następujące założenia: badanie jednoośrodkowe, otwarte, jednoimienne, oceniające bezpieczeństwo oraz wstępną ocenę skuteczności, badanym produktem będą autologiczne ASC. Kryteria walczenia: przetoka w przebiegu choroby Leśniowskiego-Crohna, utrzymująca się co najmniej 12 miesięcy pomimo co najmniej 1 interwencji chirurgicznej lub przetoka nawrotowa. W pierwszym etapie wykonywana będzie fistulektomia z pobraniem tkanki tłuszczowej, w drugim etapie podanie ASC ATIMP w okresie 2-4 tygodni od uprzedniej interwencji chirurgicznej. Schemat opracowano w oparciu o badanie pilotażowe, zaś punkty końcowe określono pa podstawie dostępnego piśmiennictwa.

Druga część tego rozdziału (*Materiał i metody*) poświęcona jest procedurze decelularyzacji ludzkiej tkanki tłuszczowej. W podrozdziale dotyczącym metod określono, że materiał wyjściowy stanowi tkanka tłuszczowa pozyskana jako odpad medyczny po operacjach przeprowadzanych z innych wskazań na podstawie pozytywnych opinii odpowiednich Komisji Bioetycznych. Eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych uzyskały również zgodę odpowiedniej Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie. Dalej, w tabeli wymieniono wykaz stosowanych materiałów oraz wykaz roztworów, które posłużyły do uzyskania adipoECM i wykorzystane do doświadczeń. Dalej opisano metodę decelularyzacji tkanki tłuszczowej. Na szczególną uwagę zwraca fakt, że zastosowana alkoholowa metoda decelularyzacji jest autorską metodą opracowaną przez doktoranta. W badaniu wykorzystano tkankę tłuszczową pozyskaną od trzech dawców (pacjentów). Bezpieczeństwo decelularyzacji oceniano poprzez badanie stężenia endotoksyn z zastosowaniem reakcji lizatu amebocytów skrzypłocza (LAL) z kontrolą negatywną i pozytywną oraz badając jałowość uzyskanej macierzy. W opisie pominięto sposób badania jałowości procesu decelularyzacji innymi metodami. Właściwości uzyskanej macierzy zewnątrzkomórkowej określano badając jej elastyczność przy użyciu reometru w Katedrze Biomateriałów i Kompozytów na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie. Pomiary przeprowadzano w stałej temperaturze 25°C wykonując po trzy powtórzenia. Do oceny biochemicznej 3 serii adipoECM, po ich liofilizacji i ekstrakcji kolagenazą I wykorzystano badania: zawartości DNA (oznaczenie metodą spektrofotometryczną NanoDrop), zawartości glikozoaminoglikanów z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej z błękitem alcjanu przy długości fali 600 nm, analizy proteomicznej wykonanej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętej ze spektrometrią mas w Pracowni Proteomiki i Spektrometrii Mas w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Obecność lipidów badano metodą mikroskopową na skrawkach mrożeniowych, barwionych czerwienią olejową i hematoksyliną. W celu sprawdzenia cytotoksyczności decelularyzowanej macierzy Autor wykonał analizę wzrostu i żywotności ASC na adipoECM przy zastosowaniu alternatywnego do MTT testu AlmarBlue wykorzystującego redukcję resazuryny do resarufinu i zastosowaniu spektrofotometrii. Pomiary wykonywano 1, 7 i 14 dnia po wysianiu ASC na badana macierz. W celu sprawdzenia biokompatybilności adipoECM na poziomie lokalnym i ogólnoustrojowym, 40 myszom BALB/c wszczepiano badany materiał podskórnie,

nagrzbietowo. Jako materiał kontroli zastosowano płatki Integra®DRT. Zwierzęta poddawano eutanazji w 1, 7, 30 i 60 dniu po wszczepieniu i pobierano wszczepiony materiał w bloku ze skórą. Połowę objętości wyciętych tkanek utrwalono w celu wykonania preparatów histologicznych, drugą połowę zaś zatapiano w OCT u zamrażano. W czasie eutanazji pobierano krew myszy do badań oraz narządy: wątrobę i śledzionę. Wykonywano morfologię przy użyciu analizatora weterynaryjnego, badania biochemiczne z surowicy krwi (fosfatazy alkalicznej, transferazy alaninowej, kreatyniny, całkowitego stężenia białka i mocznika) przy użyciu odpowiedniego analizatora oraz oznaczano profil cytokin prozapalnych (IL-1α, IL1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17a, IL-23, IL-27, MCP-1, INF-β, INF-γ, TNF-α) z wykorzystaniem cytofotometrii przepływowej. Poddano także ocenie histologicznej preparaty pobranych wątrób i śledzion. W celu oceny przebudowy adipoECM na skrawkach parafinowych macierzy wykonano trójkolorowe barwienie metodą Massona. Skrawki mrożeniowe posłużyły natomiast do oceny komórek zasiedlających wszczepione matryce metodą immunohistofluorescencji pośredniej z zastosowaniem znakowanych przeciwciał przeciwko CD11b (antygen komórek monocytarno-makrofagalnych), CD31 (antygen komórek śródbłonka), CD90 (antygen komórek mezenchymalnych) i dobarwiano DAPI. Obserwacje mikroskopowe preparatów histologicznych immumnohistofluorescencyjne i immumnocytofluorescencyjne przeprowadzano za pomocą zestawu mikroskopowego wyposażonego w kamery do światła przechodzącego i do fluorescencji oraz z akwizycją obrazów.

W części trzeciej *Materiałów i metod* Autor opisuje metody badań opracowanego konstruktu ASC-Integra®DRT. Do zasiedlenia matrycy wykorzystano komórki izolowane z tkanki tłuszczowej pozyskanej jako odpad medyczny po operacjach przeprowadzanych z innych wskazań na podstawie pozytywnych opinii odpowiednich Komisji Bioetycznych. Eksperymenty lecznicze przeprowadzone z zastosowaniem opracowanego konstruktu również uzyskały pozytywne opinie odpowiednich Komisji Bioetycznych. Podobnie jak w poprzednich częściach, w tabeli wymieniono wykazy zastosowanych materiałów i roztworów, które posłużyły do uzyskania konstruktu ASC- Integra®DRT i wykorzystane do doświadczeń. Konstrukty wykonywano poprze wycięcie krążków o średnicy 6 mm z Integra®DRT, a następnie inkubowano w medium hodowlanym przez minimum 8 godzin. Optymalizację warunków wytwarzania konstruktu, tak aby ASC zachowały jak najdłużej żywotność, zbadano jaka gęstość wysiewania komórek jest najefektywniejsza. Matrycę Integra®DRT wysycano roztworami soli fizjologicznej lub Sterofundin z 10% albuminą ludzką. Żywotność komórek oceniano po 24 godzinach od zasiedlenia. Medium kontrolnym był DMEM z 10% FBS. Komórki wysiewano w trzech różnych stężeniach (1, 10 i $100x10^5$ ASC w przeliczeniu na cm^2) na uprzednio przygotowane krążki. Po 24 godzinach inkubacji dodawano 10% AlamarBlue i po 3 godzinach inkubacji wykonywano pomiary fluorescencji w czytniku płytek. Otrzymane wyniki dla dwóch mediów, osobno dla każdej gęstości wysiewanych komórek normalizowano względem konstruktów inkubowanych w DMEM z dodatkiem 10%FBS. To pozwoliło na wybór gęstości wywiewanych komórek do dalszej części eksperymentów. W dalszej kolejności przeprowadzono analizę proliferacji ASC na matrycy przy użyciu testu WST-1. Związane z matrycą komórki inkubowano, zmieniając po 1, 7 i 14 dniach pożywkę na 10% roztwór WST-1 w DMEM z FBS do pomiarów absorbancji. Do oceny żywotności, apoptozy i nekrozy konstrukty przygotowano analogicznie, które w badanych punktach czasowych, w odróżnieniu od poprzedniego eksperymentu ulegały zniszczeniu. Do oceny elastyczności i do oceny ekspresji genów komórki wysiewano z podobną gęstością, jednak ich średnica była większa i wynosiła 2 cm^2. Ocenę morfologiczną ASC rosnących na Integra®DRT przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego w Zakładzie Biofizyki Komórki. Żywe komórki wyznakowano fluorochromem-TMRE gromadzącym się w mitochondriach. Jądra komórkowe wybarwiono Hoechst 33342. Apoptozę komórek oceniano po 2, 7 i 14 dniach inkubacji stosując przeciwciał przeciw aneksynie V zaś nekrozę stosując 7-AAD (barwnik gromadzący się w DNA komórek nekrotycznych) i analizowano metodą cytofotometrii przepływowej w Zakładzie Biofizyki Komórki. Można również rozważyć potwierdzenie obecności ASC na matrycy poprzez wcześniejsze, ich wyznakowanie bezpośrednio przed wysianiem, lipofilnym fluorescencyjnym barwnikiem błonowym (DID – detekcja w dalekiej czerwieni).

Aktywność kolagenolityczną konstruktu określano za pomocą testu, w którym substratem jest kolagen typu I połączonym kowalencyjnie z fluoresceiną. W obecności enzymów trawiących kolagen dochodzi do uwalniania fluoresceiny a detekcja fluorescencji jest wprost proporcjonalna do aktywności kolagenolitycznej. Badania zebranego medium hodowlanego przeprowadzano po 2, 7 i 14 dniach inkubacji. Badania elastyczności konstruktu, podobnie jak badania adipoECM przeprowadzono przy użyciu reometru również po

2, 7 i 14 dniach inkubacji. Ekspresję genów zaangażowanych w gojenie tkanek miękkich przeprowadzano po 3 tygodniach hodowli ASC na matrycy Integra®DRT. Badania przeprowadzano przy użyciu ilościowej łańcuchowej reakcji polimeryzacji w czasie rzeczywistym z mRNA izolowanego z ASC oraz fibroblastów skóry pochodzących od tego samego dawcy. Użyto starterów dla genów COL1A1, COL4A1, VEGF, KGF, MMP2, MMP9, IL-6, IL-8, HGF, FGF-2, TGFβ i B2M. Przeprowadzono również pilotażowy eksperyment z zastosowaniem badanego konstruktu u pacjentki z blizną pooparzeniową w trakcie zabiegu uwolnienia przykurczów szyi i okolicy prawego barku. Procedura była dwuetapowa. W pierwszym pobrano tkankę podskórną w celu izolacji ASC. Po trzech tygodniach wycięto blizny i ubytki tkanek zaopatrzono konstruktem Integra®DRT z ASC. Badania kontrole przeprowadzano po 1,3, 6 i 9 miesiącach od zabiegu.

Analizy statystyczne wykonywano w programie OriginPro 2019b, a analizy istotności statystycznej testem Manna-Whitneya.

Na szczególną wagę zasługuje fakt staranności Autora w zaplanowaniu badań oraz wzięcie pod uwagę wszystkich aspektów wynikających z regulacji prawnych z wielu obszarów mających zastosowanie w medycynie. Zaproponowana przez Autora w tym rozdziale ścieżka badań jest wybrana prawidłowo. Świadczy to o Jego dojrzałości naukowej i dojrzałości w aspekcie legalizmu.

Rozdział *Wyniki,* zawarty na stronach 73-118, również podzielony został na trzy części korespondujące z *Celami* oraz *Materiałami i metodami*. W podsekcji pierwszej – Terapia komórkowa, Autor najpierw przedstawia uzyskane wyniki dotyczące izolacji, hodowli i transportu komórek. Zwalidowana została metoda izolacji ASC. Wykorzystano dane zarówno z procesu wytwórczego jak i z fazy doświadczalnej. Z wystandaryzowanej, biorąc pod uwagę zmienności osobnicze objętości tkanki tłuszczowej, poddanej enzymatycznemu trawieniu, uzyskiwano 0,375 do 1,1 $x10^6$ ASC w czasie od 4 do 8 dni. Trochę zaskakuje, choć pozytywnie, fakt, że w procesie wytwórczym z 1 ml tkanki tłuszczowej uzyskiwano 2-3 więcej komórek w przeliczeniu na dzień niż w fazie eksperymentalnej. Następnie przestawiono wyniki wydajności namnażania ASC. Największy przyrost ASC po trzech dniach hodowli (8,7+/-1,3 uzyskano w pożywce zawierającej lizat płytkowy, zaś najefektywniejsza gęstość wysiewania komórek wynosiła 1 do $2x10^3$ ASC/cm^2. Zoptymalizowano więc czas podwojenia populacji hodowanych komórek, który pozwolił na opracowanie założeń wytwarzania produktu: całkowity czas wytwarzania <28 dni, czas etapu I < 8 dni, liczba komórek po I etapie – 0,373-1,1$x10^6$. Wszystkie z wytwarzanych serii komórek były jałowe po dwutygodniowej ocenie jałowości. W dalszej kolejności przedstawiona została charakterystyka ASC. Potwierdzono fenotyp izolowanych komórek, wyniki przedstawiono w formie tabeli i zilustrowano zdjęciami z analizy immunocytofluorescencyjnej. Wykazano, poparty zdjęciami z wybranych barwień, potencjał różnicowania ASC w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów z wytwarzaniem odpowiedniej macierzy zewnątrzkomórkowej. W hodowlach po 2 pasażu stwierdzano prawidłowy kariotyp komórek we wszystkich badanych hodowlach eksperymentalnych. W dalszej części przedstawiono wyniki walidacji warunków transportu. Po 24 godzinach, akceptowalną żywotność komórek (85%), prawidłową morfologię i organizację wykazywały AS zawieszone w roztworze krystaloidów wzbogaconych 20% albuminą.

Dalszą część stanowi opis wyników eksperymentu pilotażowego. U opisanych w poprzednim rozdziale pacjentach wykonano odpowiednio: oczyszczenie przetoki, gracilloplastykę z wyłonieniem stomii odbarczającej oraz fistulektomię z asystą wideofistuloskopu. Pod koniec zabiegu pobierano, nie zaś jak pisze Autor pozyskiwano z tkanek odpadowych (uwaga opisana wcześniej), tkankę tłuszczową. Następnie, w drugim etapie do ściany przetoki podano przygotowane komórki i prowadzono obserwację. U żadnego z pacjentów nie obserwowano rozwoju infekcji po podaniu ASC czy reakcji uczuleniowej na resztki substancji używanych w czasie procesu wytwarzania ani na substancje pomocnicze używane w czasie transportu. U pacjentek z przetoką odbytowo-pochwową między 4 a 8 tygodniem ustąpiły subiektywne objawy przetoki, a po 8 tygodniach nie stwierdzano przetoki w badaniu wziernikowym. U pacjenta również po 8 tygodniach nie obserwowano wycieku treści ropnej ani surowiczej z ujścia zewnętrznego przetoki. W 6 miesiącu stwierdzono całkowite wygojenie przetoki. U pacjentek 2 i 3, nie zaś 4 (pomyłka pisarska Autora), odtworzono w 4 i 5 miesiącu ciągłość przewodu pokarmowego. Wyniki zilustrowano zdjęciami śródoperacyjnymi. W końcowej części tego podrozdziału opisano przygotowanie badania klinicznego. Pierwszym koniecznym etapem było uzyskanie zgody na wytwarzanie badanego produktu leczniczego terapii zaawansowanej (ATIMP) ASC na podstawie uprzednio przeprowadzonych procedur optymalizacyjno-walidacyjnych. Wzięto również pod uwagę wyniki badań pilotażowych realizowanych w ramach HE-ATMP oraz przedstawione w tabeli

opublikowane badania kliniczne. Na podstawie analizy badań klinicznych przeprowadzono ocenę bezpieczeństwa stosowania ASC w leczeniu przetok, stwierdzając występowanie proktalgii, ropni, bólu, ropni okołoodbytniczych, gorączki, guzka w miejscu podania komórek i innych, które kwalifikowano jako istotne reakcje niepożądane (SAE), i które zostały wyleczone. Wymienione zdarzenia są często obserwowanymi powikłaniami u pacjentów poddanych procedurom chirurgii proktologicznej. Skuteczność analizowanych terapii wynosiła od 33 do 83%. Pracowano projekt badania klinicznego, który jest oceniany przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych i umieszczono go w bazie badań klinicznych EuduraCT pod akronimem TMCF-ASC. Na zakończenie, w formie tabeli, przedstawiono streszczenie planowanego badania klinicznego uwzględniając liczbę ośrodków, cel i hipotezy badawcze, liczbę pacjentów i ich populację, rodzaj badanego produktu leczniczego i w końcu kryteria oceny.

W części drugiej rozdziału przedstawiono wyniki dotyczące badań nad decelularyzowaną tkanką tłuszczową. W pierwszym etapie zaprezentowano wyniki decelularyzacji. Proces trwał 2 dni. Zawartość wagowa adipoECM wynosiła 5%, zaś zawartość wagowa macierzy i komórek w tkance tłuszczowej – 78-89%., tak więc w procesie decelularyzacji usuwane jest 73-84% masy wyjściowej tkanki (przedział komórkowy wraz z lipidami). Wyniki z poszczególnych serii próbek przedstawiono w tabeli. Dalej przedstawiono wyniki przeprowadzonej charakterystyki adipoECM. Wykazano zgodność z założeniami wszystkich badanych parametrów: akceptowalną, niską zawartości DNA, obecność GAG, brak obecności jąder komórkowych, lipidów, endotoksyn, jałowość dla warunków tlenowych i beztlenowych oraz określono elastyczność materiału. Wyniki przedstawiono w tabeli i zilustrowano zdjęciami obrazów mikroskopowych i przeprowadzonego badania stężenia endotoksyn. Analiza proteomiczna wykazała w badanym adipoECM obecność głównych białek macierzy i tych, odpowiedzialnych za interakcje z komórkami: kolagenów typu I, III, IV, V, lamininy, fibryliny, fibronektyny, tenascyny i elastyny.

W ocenie biokompatybilności wykazano brak działania toksycznego i stopniową, powolną proliferację ASC na otrzymanym produkcie w okresie 14 dni. W eksperymentach in vivo z wykorzystaniem myszy szczepu BALB/c porównano adipoECM z Integra®DRT. W przypadku grupy, której wszczepiano adipoECM, parametry morfologii, w tym rozmazu były prawidłowe, w odróżnieniu od tych którym wszczepiano Integra®DRT, gdzie obserwowano większą liczbę limfocytów. Nie obserwowano różnic w stężeniu alkalicznej fosfatazy, transferazy alaninowej kreatyniny, białka całkowitego ani mocznika w obu badanych grupach. Podobnie, stężenia badanych cytokin prozapalnych nie różniły się pomiędzy grupami doświadczalnymi. Uzyskane wyniki zilustrowano wykresami. Wykonane obserwacje preparatów histologicznych wykazały prawidłową budowę wątroby i śledziony zwierząt obu grup.

W ocenie histologicznej, barwieniu Massona, eksplantowanych wszczepów, w 1. dniu od wszczepienia obserwowano obecność włókien kolagenowych, brak komórek oraz integracji z otaczającymi tkankami. Po 60 dniach od wszczepienia obie badane matryce ściśle przylegają do sąsiadujących tkanek. We wszczepie Integra®DRT komórki obecne były wyłącznie na obwodzie materiału, podczas gdy w adipoECM obecne były na wszystkich przekrojach, przy czym ich rozkład nie był równomierny. W strefie bogato komórkowej ułożone są one pomiędzy luźnymi pęczkami włókien kolagenowych, zaś w strefie ubogo komórkowej – wzdłuż podłużnych, zbitych pasm kolagenu. Opisane wyniki wzbogacono fotografiami obrazów mikroskopowych. W preparatach adipoECM Autor przeprowadził analizę zasiedlających materiał komórek. Potwierdził obecność makrofagów i komórek mezenchymalnych, zaś w przekrojach naczyń krwionośnych erytrocyty i komórki śródbłonka, podobnie ilustrując obserwacje zdjęciami z mikroskopu.

W części trzeciej rozdziału *Wyniki* Autor przedstawia charakterystykę konstruktu ASC-Integra®DRT. Wykorzystując test żywotności, stwierdzono, że optymalna gęstość wysiewanych komórek powinna wynosić $100x10^3$ ASC/cm^2, zaś pożywką powinien być płyn wieloelektrolitowy z albuminą, który pozwala uzyskanie żywotności ASC na poziomie 95+/-1%. Wzrost ASC na Integra®DRT jest ciągły, jednak znacznie wolniejszy niż na podłożach plastikowych. Analiza cytometryczna wykazała, że w pierwszych dwóch dniach po wysianiu komórek na matrycę żywotność komórek wynosi odpowiednio 95,5 i 93,7%, odsetek komórek apoptotycznych wynosi 3,9 do 5,2%, nekrotycznych 0,6 do 1,1%. W kolejnych dniach (7 i 14) odsetek żywych komórek spada odpowiednio do 41,1 i 45%, zwiększa liczba komórek apoptoczych – 53,7 i 49,9 (jak wynika z tabeli, a nie jak podano w tekście - 9,9 - pomyłka pisarska) oraz nekrotycznych – 4,9 i 5,1%. Zasiedlenie matrycy Integra®DRT ASC zobrazowano przyżyciowym preparatem mikroskopii konfokalnej uwidaczniając jądra komórkowe i mitochondria żywych komórek. W kolejnych badaniach,

pomiędzy 2 a 14 dniem inkubacji, stwierdzono stopniowy spadek elastyczności, któremu towarzyszył stopniowy wzrost aktywności kolagenolitycznej konstruktu związanej ze wzrastającą aktywnością metaloproteinaz. Analiza w ASC z konstruktu, wykazała wzrost ilości mRNA dla czynników promujących gojenie: VEGF, FGF-2, HGF, KGF, przebudowujących macierz zewnątrzkomórkową: Col1A1, Col4a1, MMP-2 i MMP-9 oraz czynników immunomodulujących: TGFβ, IL-6 i IL-9, w porównaniu z mRNA fibroblastów w podobnych warunkach inkubacji. Rozdział ten kończy przedstawienie wyników zastosowania badanego konstruktu w leczeniu pacjentki z blizną pooparzeniową w trakcie zabiegu uwolnienia przykurczów szyi i okolicy prawego barku. Ok 10 cm ubytku po wyciętej bliźnie skórnej wypełniono badanym konstruktem ASC-Integra®DRT, z wysianiem komórek o gęstości $1x10^5$, a część samym opatrunkiem Integra®DRT (obszar referencyjny). Po 4 tygodniach usunięto silikonową warstwę z obu fragmentów konstruktu. W trakcie obserwacji, obydwie powierzchnie cechowały się czerwonym zabarwieniem, przy czym obszar testowy był bledszy. Po 9 miesiącach uzyskano całkowite odtworzenie ubytku. Wokół obszaru badanego konstruktu nie obserwowano blizny. W czasie obserwacji nie obserwowano reakcji niepożądanych, w tym zakażenia materiału badanego i kontrolnego. Doświadczenie zilustrowano fotografiami.

W rozdziale *Dyskusja*, strony 119-141, Autor porównuje wyniki badań własnych z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Ta część dysertacji, podobnie jak wcześniejsze, podzielona jest na trzy części, odnoszące się odpowiednio do omawianych: terapii komórkowej, decelularyzowanej tkanki tłuszczowej (adipoECM) oraz konstruktu ASC-Integra®DRT. W dyskusji Doktorant wykazał się szeroką wiedzą w zakresie problematyki podjętego tematu badawczego oraz znajomość aktualnego piśmiennictwa specjalistycznego. Wykazał w ten sposób umiejętność krytycznego analizowania otrzymanych wyników i doskonałe przygotowanie do prowadzenia pracy naukowo-badawczej.

W rozdziale *Wnioski*, strony 142-143, Autor podsumowuje i odpowiada na przedstawione w założeniach badawczych cele.

Rozdział *Piśmiennictwo*, strony 144-154, stanowi rozsądnie wybrane pozycje korespondujące z tematyką pracy.

Ciekawym dodatkiem jest rozdział 8 – *Załączniki*, w którym Autor zaproponował ankietę dla pacjentów z utrzymująca się przetoką odbytu w kontekście wpływu schorzenia na funkcjonowanie w kontekście ponoszonych wydatków finansowych.

Podsumowując uważam, że Doktorant prawidłowo zrealizował cel badawczy. To bardzo bogata w materiał naukowy dysertacja. Z powodzeniem mógłby on być źródłem przynajmniej dwóch niezależnych, ciekach opracowań. Drobne uchybienia w żaden sposób nie umniejszają wysokiego poziomu recenzowanej przeze mnie pracy. Lekarz Marcin Piejko wykazał się ponadprzeciętną umiejętnością zaplanowania, wykonania doświadczeń i przedstawienia wyników badań oraz ich rzeczowej analizy. Potrafi właściwie interpretować uzyskane dane oraz wybrać i korzystać odpowiednio z piśmiennictwa naukowego.

Stwierdzam zatem, że praca doktorska lek. Marcina Piejko pt.: "*Tłuszczopochodne mezenchymalne komórki macierzyste w leczeniu przetok odkryptowych i w chorobie Crohna. Optymalizaja hodowli, implantacji i nowe propozycje lecznicze*" stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego przez Autora i spełnia warunki art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 poz. 595 z późn. zm.). Stąd też zwracam się z wnioskiem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek. Marcina Piejko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wskazany powyżej wysoki poziom naukowy i aplikacyjny oraz ważkość podjętej tematyki, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy lek. Marcina Piejko.

Kierownik Zakładu Transplantologii
i Centralnego Banku Tkanek

dr hab. n. med. Artur Kamiński