

## WNIOSEK

do Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu  
o wyrażenie opinii o projekcie badawczym  
realizowanym w ramach działalności statutowej Uczelni

1. Tytuł, stopień naukowy, imię i nazwisko wnioskodawcy - osoby zamierzającej zrealizować projekt badawczy:

**Dr hab. Aleksandra Klimczak, prof. PAN**  
.....

2. Telefon kontaktowy 666308999  
.....

3. Nazwa jednostki organizacyjnej ~~Uniwersytetu Medycznego~~, w której projekt ma być realizowany  
**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Samodzielne Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych**  
.....

4. Tytuł projektu:  
**Komórki macierzyste rezydujące w tkankach – lokalizacja, izolacja oraz charakterystyka biologiczna**  
.....

5. Numer rejestrowy Działu Nauki ~~UM~~ IITD ,  
**KNOW 519-1-4-1-347**

6. Szczegółowy opis projektu wraz z uzasadnieniem jego celowości i oceną wykonalności

Mezenchymalne komórki macierzyste - Mesenchymal Stem Cells (MSC) - rezydują w wielu tkankach i narządach i są odpowiedzialne za ich regenerację i utrzymanie prawidłowej funkcji narządu [1]. Jakkolwiek ich morfologia, immunofenotyp czy potencjał różnicowania jest zależny od tego, z którego narządu pochodzą komórki macierzyste. Koniec ubiegłego stulecia i początek obecnego wieku przyniósł dynamiczny rozwój badań dotyczących biologii komórek macierzystych [2,3,4]. Okazało się, że wielu naukowców pozyskiwało komórki z różnych tkanek i narządów ale ich nomenklatura była różna. Nie ma specyficznego markera definiującego MSC. Stąd aby zdefiniować mezenchymalną komórkę macierzystą Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy opracował minimalne kryteria, które powinna spełniać komórka mezenchymalna pochodząca od człowieka [5]. Po pierwsze muszą to być komórki mające zdolność adhezji do plastiku o wysokim potencjale proliferacyjnym, powinny posiadać specyficzne markery powierzchniowe CD73, CD90, CD105 i nie powinny mieć ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych CD34, CD45, CD14. Ich multipotencjalny charakter powinien być określony poprzez zdolności do różnicowania w kierunku adipocytów, chondrocytów i osteoblastów [5]. Jakkolwiek, od

momentu zdefiniowania kryteriów MSC badania nad ich biologią stały się mocno zaawansowane i proponowane dotychczasowe kryteria wymagają modyfikacji.

Celem badań jest odpowiedź na pytanie czy izolowane z tkanek pooperacyjnych komórki spełniają minimalne kryteria komórek macierzystych zdefiniowanych przez Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy [5] czy raczej są komórkami progenitorowymi specyficznymi dla tkanki, z której pochodzą.

#### Szczegółowy plan badań:

Materiał do badań będą stanowiły wycinki mięśni szkieletowych, skóry i szpiku pobrane z amputowanych w wyniku skrajnej choroby niedokrwiennej kończyn, dzięki współpracy z Oddziałem Chirurgii Naczyniowej 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Zgodnie z prawem zachowanie procedur chirurgicznych i tych związanych z pobraniem tkanek z amputowanej kończyny zostanie zagwarantowane przez Prof. dr hab. Dariusza Patrzalka, Ordynatora Oddziału Chirurgii Transplantacyjnej 4 WSK we Wrocławiu, wybitnego specjalisty dziedzinie chirurgii naczyniowej i transplantologii z wieloletnim doświadczeniem klinicznym.

Fragmenty mięśnia szkieletowego, skóry i szpiku z amputowanej kończyny zostaną pobrane po wykonaniu czynności związanych z zabezpieczeniem kikuta po amputacji. W rutynowym postępowaniu amputowana kończyna podlega utylizacji medycznej. Przed utylizacją, do badań eksperymentalnych zostanie pobrany fragment mięśnia szkieletowego, skóry i szpiku wyłuszczonego zgodnie z procedurą chirurgiczną. Pobranie tkanek po amputacji kończyny w żaden sposób nie narusza zdrowia i życia pacjenta. Przed zabiegiem chirurgicznym pacjent wyraża dodatkową, pisemną zgodę na amputację kończyny.

Projekt ma na celu przeprowadzenie wstępnych badań dotyczących opracowania najbardziej optymalnych warunków hodowli komórek macierzystych tj. określenie optymalnej liczby pasażów oraz pozyskanie czystej populacji komórek o fenotypie komórki macierzystej CD73+/CD90+/CD105+, jak i zabezpieczenia materiału do następnych badań pozwalających na określenie biologii pozyskanych komórek z użyciem technik cytometrii przepływowej, immunocytochemii oraz analizy genetycznej.

Harmonogram badań zakłada wykonanie następujących zadań badawczych, które będą realizowane jednocześnie:

1. Badania dotyczące lokalizacji tkankowej komórek macierzystych w narządach człowieka: ko-  
lokalizacja obecności markerów o fenotypie komórki macierzystej CD73, CD90, CD105 w  
parafinowych preparatach tkankowych ze skóry i mięśnia szkieletowego poprzez podwójne  
barwienia immunofluorescencyjne z użyciem markerów: PAX7, Sca-1, Peg3, oraz markerów  
wykluczających obecność fenotypu komórek hematopoetycznych CD34, CD45.

2. Izolacja i prowadzenie hodowli komórek pozyskanych z tkanek: mięśni szkieletowych, skóry i  
szpiku kostnego.

- Szpik kostny zostanie pobrany do heparynizowanych probówek, komórki jednojądrowe będą  
odseparowane na fikolu i poddane hodowli w medium  $\alpha$ MEM.

- Wycinki tkanek pobranych z mięśni szkieletowych i ze skóry zostaną podzielone na dwie części.  
Jeden wycinek zostanie zamknięty w bloku parafinowym w celu wykorzystania do badań  
immunocytochemicznych na obecność: CD45, CD34, CD117, CD73, CD90, CD56, PAX7 oraz  
oceny ko-lokalizacji markerów komórkowych (patrz punkt 1). Drugi fragment wycinka  
tkankowego będzie trawiony enzymatycznie a pozyskane komórki zostaną umieszczone w  
medium hodowlanym.



- Hodowla będzie prowadzona w butelkach hodowlanych, zależnie od potencjału proliferacyjnego populacji w butelkach T-25 lub T-75 z wykorzystaniem medium DMEM dla komórek mięśniowych i ze skóry, oraz alfa-MEM dla komórek pozyskanych ze szpiku.

3. Ocena fenotypu i właściwości biologicznych komórek. Przy każdym pasażu zabezpieczane będą:

- ✓ komórki do izolacji RNA, celem późniejszej analizy ekspresji genów zaangażowanych i kontrolujących proliferację komórek pluripotencjalnych,
- ✓ komórki w postaci preparatów cytospinowych do badania fenotypu poprzez podwójne i potrójne barwienie immunocytochemiczne
- ✓ komórki do analizy cytometrycznej z użyciem przeciwciał: CD45, CD34, CD73, CD90, CD105, CD56, CD146, CD31. Badanie fenotypu komórek będzie wykonane z zastosowaniem trójkolorowej cytometrii przepływowej poprzez zewnątrzkomórkowe barwienie antygenów przeciwciałami znakowanymi fluorochromami (FITC, PE, APC) w odniesieniu do kontroli izotypowych dla wszystkich kolorów.

Przygotowane, zabarwione komórki będą analizowane przy wykorzystaniu cytometru przepływowego FACS Calibur firmy Becton Dickinson.

Barwienie metodą cytometrii przepływowej i immunocytochemiczne zostaną wykonane w ramach obecnego projektu, natomiast ocena genetyczna parametrów biologicznych z wykorzystaniem mikromacierzy, ze względu na wysokie koszty badań, zostaną wykonane w ramach grantu zewnętrznego, do którego podstawą będą wyniki uzyskane w obecnym projekcie.

4. Badanie multipotencjalnego charakteru pozyskanych komórek w długoterminowej hodowli z użyciem mediów różnicujących w kierunku adipocytów, chondrocytów i osteoblastów pozwoli na pełną ocenę właściwości biologicznych pozyskanych komórek zgodnie z kryteriami Komitetu ds. Komórek Mezenchymalnych i Komórek Macierzystych Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej [2].

Powyższe badania mają na celu znalezienie odpowiedzi na pytanie czy istnieją alternatywne źródła komórek macierzystych o potencjale regeneracyjnym do zastosowania klinicznego w odniesieniu do MSC pozyskiwanych od dawców komórek. Dążenie do zebrania tych, wydawałoby się podstawowych informacji na temat natury komórek macierzystych było i jest niewystarczające. Wierzimy, że dokładne i kompleksowe scharakteryzowanie komórek macierzystych pochodzących z pooperacyjnych tkanek znacząco pomoże w opracowywaniu optymalnych technologii ich przygotowania do zastosowania w medycynie regeneracyjnej.

#### Bibliografia

1. Aleksandra Klimeczak and Urszula Kozłowska. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells International* 2016; Article ID 4285215
2. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641-50.
3. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2013; 9: 32-43.
4. Devang M. Patel, Jainy Shah, Anand S. Srivastava. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells Int.* 2013, 2013: 496218
5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315-7.

7. Imię, nazwisko osoby mającej kierować eksperymentem w Uczelni, adres, telefon kontaktowy:

**Dr hab. Aleksandra Klimczak, prof. PAN**

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,**

**Samodzielne Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych**

**ul. R. Weigla 12**

**53-114 Wrocław**

**Tel. 666308999**

8. Skład zespołu mającego realizować projekt badawczy z wyszczególnieniem kwalifikacji zawodowych i naukowych

1. **Dr hab. Aleksandra Klimczak, prof. PAN, Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych ITD, kierownik projektu.** Prowadzi prace związane z biologią, immunopatologią i mechanizmami reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi u pacjentów po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych oraz prace badawcze nad biologią komórek macierzystych. Wieloletnie doświadczenie w dziedzinie przeszczepień komórkowych. A. Klimczak zdobyła pracując pod kierunkiem Prof. dr hab. Andrzeja Lange, kierownika Zakładu Immunologii Klinicznej w Instytucie Immunologii, Dyrektora Dolnośląskiego Centrum Transplantacji Komórkowych we Wrocławiu. Ponadto, przez 6 lat pracowała w grupie badawczej Prof. dr hab. M. Siemionow w Cleveland Clinic, USA, gdzie prowadziła badania eksperymentalne związane z tolerancją immunologiczną na złożone przeszczepy wielotkankowe, wykorzystując również metody związane z adoptywną terapią komórkową z użyciem komórek hematopoetycznych i mezenchymalnych komórek macierzystych w celu indukcji tolerancji. Aktywność naukowa A. Klimczak znajduje odzwierciedlenie w licznych publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym i prezentacjach na zjazdach i konferencjach międzynarodowych. Wieloletnie doświadczenie dr hab. Aleksandra Klimczak dotyczące immunologii transplantacyjnej i medycyny regeneracyjnej zdobyte w zespole prof. dr hab. A. Lange we Wrocławiu i w zespole prof. dr hab. M. Siemionow w Cleveland w USA, będzie bardzo użyteczne w realizacji obecnego projektu badawczego dotyczącego możliwości pozyskania i charakterystyki biologicznej komórek macierzystych izolowanych z tkanek pooperacyjnych.
2. **Prof. dr hab. Dariusz Patrzalek Ordynator Oddziału Chirurgii Transplantacyjnej 4 WSK we Wrocławiu.** Profesor D. Patrzalek jest autorem i współautorem licznych publikacji z dziedziny chirurgii naczyniowej i transplantacyjnej. Zgodne z prawem postępowanie, dotyczące pobrania tkanek z amputowanych kończyn, zostanie zagwarantowane przez Prof. dr hab. Dariusza Patrzalka, wybitnego specjalistę w dziedzinie chirurgii naczyniowej i transplantologii z wieloletnim doświadczeniem klinicznym.
3. **Mgr Urszula Kozłowska, doktorantka** – posiada duże doświadczenie w izolacji i hodowli komórek macierzystych, które zdobyła pod opieką naukową dr hab. A. Klimczak
4. **Mgr Katarzyna Futoma, doktorantka** – posiada duże doświadczenie w stosowaniu technik immunohistochemicznych oraz immunofluorescencyjnych niezbędnych w realizacji zadań badawczych. Umiejętności zdobyła pod opieką naukową dr hab. A. Klimczak

9. Miejsce(a) wykonywania badań:

**Samodzielne Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.**



10. Opis spodziewanych korzyściach leczniczych i poznawczych oraz ewentualnych innych korzyściach dla osób poddanych eksperymentowi medycznemu

Istotnym efektem badań przedklinicznych proponowanych w obecnym projekcie jest opracowanie technologii pozyskania komórek macierzystych pochodzących z różnych tkanek pobranych z kończyn amputowanych z powodu skrajnej choroby niedokrwiennej kończyn, porównanie efektywności ich ekspansji i przygotowanie tych komórek jako potencjalnego źródła MSC służących do badań eksperymentalnych i następowego zastosowania w medycynie transplantacyjnej i regeneracyjnej. Zastosowanie komórek MSC pozyskanych z tkanek z amputowanych kończyn będzie mogło mieć zastosowanie kliniczne po ich przygotowaniu w warunkach GMP. Na tym etapie projektu nie jest przewidziane zastosowanie kliniczne tylko charakterystyka biologiczna pozyskanych komórek. Znamionym efektem proponowanych badań jest identyfikacja macierzystych komórek mezenchymalnych oraz opisanie ich cech biologicznych w odniesieniu do miejsca ich pozyskania. Wykorzystanie potencjału terapeutycznego macierzystych komórek mezenchymalnych stanowi istotny postęp w transplantologii i w medycynie regeneracyjnej a zastosowanie prawidłowych biologicznie MSC warunkuje skuteczność działania. Ponadto wyniki badań pozwolą na odpowiedzieć na pytanie czy istnieją alternatywne źródła komórek macierzystych o potencjale regeneracyjnym do zastosowania klinicznego w odniesieniu do MSC pozyskiwanych od dawców komórek.

.....

Do wniosku załączono (odpowiednie podkreślić):

- a) kserokopię decyzji Rektora o przyznaniu finansowania w ramach działalności statutowej Uczelni;
- b) informację dla osób poddanych eksperymentowi medycznemu zawierającą szczegółowe dane o celach i zasadach przeprowadzenia badań, spodziewanych dla tych osób korzyściach leczniczych i innych oraz ryzyku związanym z udziałem w badaniach;
- c) sygnowane przez badacza zobowiązanie do uzyskania świadomej zgody od wszystkich badanych osób lub ich przedstawicieli ustawowych;
- d) wzór formularza zgody pacjenta lub jego przedstawiciela ustawowego, w którym zawarte są stwierdzenia dotyczące:
  - dobrowolnego wyrażenia zgody na poddanie się eksperymentowi medycznemu po zapoznaniu się z informacją o której mowa w punkcie "c",
  - potwierdzenia możliwości zadawania pytań prowadzącemu eksperyment i otrzymania odpowiedzi na te pytania,
  - uzyskania informacji o możliwości odstąpienia od udziału w eksperymencie w każdym jego stadium;
- e) wzór oświadczenia osoby poddawanej eksperymentowi medycznemu lub jej przedstawiciela ustawowego, w którym wyrażona jest zgoda na przetwarzanie danych związanych z udziałem w eksperymencie;

Kierownik  
jednostki organizacyjnej  
w której projekt będzie realizowany

.....  
**dr hab. Jacek Rybka**  
podpis, pieczęć

Wrocław, ..... 19.04.2016 .....

Wnioskodawca

**Dr hab. Aleksandra Klimczak**  
**profesor nadzwyczajny**

.....  
podpis, pieczęć

---

*Adnotacje sekretariatu Komisji Bioetycznej*

Zwrócono dokumenty do uzupełnienia w dniu .....  
Sprawdzono i przyjęto w Sekretariacie Komisji Bioetycznej Uniwersytetu  
Medycznego we Wrocławiu w dniu .....

Skierowano do przygotowania projektu opinii przez .....  
w dniu .....

Przewodniczący Komisji

Rozpatrzone na posiedzeniu Komisji w dniu .....

Opinię wydano wnioskodawcy w dniu .....

.....

**KOMISJA BIOETYCZNA**

przy

Uniwersytecie Medycznym

we Wrocławiu

ul. Pasteura 1; 50-367 WROCŁAW

**OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 201/2016**

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 78/XV R/2014 z dnia 26 listopada 2014 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami) w składzie:

prof. dr hab. Maciej Bagłaj (chirurgia, pediatria)

prof. dr hab. Karol Bal (filozofia)

dr hab. Jacek Daroszewski (endokrynologia, diabetologia)

prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)

dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)

mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)

prof. dr hab. Jan Kolasa (prawo)

prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)

ks. dr hab. Piotr Mrzygłód (duchowny)

prof. dr hab. Krystyna Orzechowska-Juzwenko (farmakologia kliniczna, choroby wewnętrzne)

prof. dr hab. Zbigniew Rudkowski (pediatria)

dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)

Danuta Tarkowska (położnictwo)

dr hab. Andrzej Wojnar (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)

pod przewodnictwem

prof. dr hab. Jana Kornafela ( ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej, po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„Komórki macierzyste rezydujące w tkankach – lokalizacja, izolacja oraz charakterystyka biologiczna”



zgłoszonym przez **dr hab. Aleksandrę Klimczak, prof. PAN** zatrudnioną w Samodzielnym Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła wyrazić zgodę na przeprowadzenie badania w Samodzielnym Laboratorium Glikobiologii i Oddziaływań Międzykomórkowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu

Opinia powyższa dotyczy: projektu badawczego będącego podstawą działalności statutowej

Wrocław, dnia **26** kwietnia 2016 r.

BW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KOMISJA BIOETYCZNA  
przewodniczący  
prof. dr hab. Jan Kornafel