

## AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko: **Iwona Ewa Kochanowska**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

1988 – uzyskanie tytułu magistra biologii, ze specjalizacją mikrobiologia w Zakładzie Fizykochemii Drobnoustrojów Instytutu Mikrobiologii Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego; tytuł dyplomu: *Widmo cytochromowe Torulopsis glabrata i wstępna charakterystyka nietypowego składnika 585*.

1994 – uzyskanie stopnie doktora nauk przyrodniczych w dziedzinie biochemii, w Laboratorium Biochemii Zakładu Mikrobiologii w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu, tytuł rozprawy doktorskiej: *Wybrane parametry immunoenzymatycznego oznaczania niektórych immunoglobulin surowicy ludzkiej*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1988 - do dziś - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Zajmowane stanowiska:

1988 - 1995 – asystent

1995 - 2006 – adiunkt

2006 - do dziś - asystent

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Heterotopowa indukowana kość - model do badań procesów: osteoporozy i sposobów jej leczenia oraz kościotwórczego i sposobów wspomagania jego przebiegu.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy),

1. Kochanowska I.E. (2000): Osteoprotegerin – a member of tumor necrosis factor receptor family influencing bone mass. *Central European Journal of Immunology*; 25(2):97-101; Wydawca: TERMEDIA PUBLISHING HOUSE LTD

2. Kochanowska I.E., Niemira K., Włodarski K., Liberek I., Ostrowski K. (2005): Osteoinductive properties of urothelium depend on inherent bone morphogenetic proteins (BMP). *Medical Science Monitor*; 11(4):BR116-BR120; Wydawca: International Scientific Information, Inc.

3. Kochanowska I.E., Włodarski K., Wojtowicz A., Kinsner A., Ostrowski K. (2002): BMP-4 and BMP-6 involvement in the osteogenic properties of the HeLa cell line. *Experimental Biology and Medicine*; 227(1):57-62; Wydawca: SOC EXPERIMENTAL BIOLOGY MEDICINE

4. Kochanowska I.E., Włodarski K., Wojtowicz A., Niemira K., Ostrowski K. (2002): Osteogenic properties of various HeLa cell lines and the BMP family genes expression. *Annals of Transplantation*; 7(4):58-62; Wydawca: International Scientific Information, Inc.
  5. Kochanowska I., Włodarski K., Pieńkowski M., Ostrowski K. (2004): Influence of osteoprotegerin (OPG) on resorption of heterotopically induced ossicle. *Cell Tissue Banking*; 5(2):125-128; Wydawca: Springer
  6. Kochanowska I., Chaberek S., Wojtowicz A., Marczyński B., Włodarski K., Dytko M., Ostrowski K. (2007): Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC Musculoskeletal Disorders*; 8:128
- c) omówienie celu naukowego/~~artystycznego~~ ww. ~~pracy/prac~~ i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane cyklem pięciu prac oryginalnych i jednej przeglądowej, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Osiągnięcie naukowe zostało wypracowane podczas realizacji czterech projektów grantowych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych/Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz sześciu projektów badawczych finansowanych przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Osiągnięcie naukowe w liczbie trzech prac dotyczących mechanizmu indukcji heterotopowej kości zostało nagrodzone Nagrodą Zespołową III Stopnia Rektora Akademii Medycznej w Warszawie (2006). Osiągnięcie naukowe było również prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych - czterokrotnie w formie referatu i sześciokrotnie w formie doniesienia oraz stanowiło podstawę sześciu prac magisterskich.

Cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe dotyczył dwóch aspektów metabolizmu kości – procesu kościotwórczego i kościogubnego - w kontekście nieprawidłowości homeostazy kości. Poziom masy kostnej odzwierciedla równowagę pomiędzy tworzeniem kości a resorpcją, która na poziomie komórkowym zależy od aktywności komórek kościotwórczych (osteoblastów) i komórek kościogubnych (osteoklastów). Projekt opisany przez cykl prac miał na celu opracowanie modelu eksperymentalnego pozwalającego na ocenę skuteczności leczenia lub spowolnienia procesu osteoporozy, który jest specyficznym typem procesu kościogubnego. Drugim, nie mniej ważnym celem, było wyjaśnienie przyczyn różnic w tempie gojenia się kości, które jest odpowiednikiem procesu kościotworzenia. Wiedza medyczna dotycząca zalecanego czasu unieruchomienia złamanej kości w zależności od jej rodzaju jest pochodzenia empirycznego. Różnice w tempie gojenia się złamań są znane od dawna, ale nie zostały wyjaśnione na poziomie komórkowym ani molekularnym. Opisanie zależności czasu gojenia od zaangażowania określonych cząsteczek regulatorowych mogłoby

dać podstawy do opracowania skutecznej terapii wspomagającej leczenie trudno-gojących się złamań jak również terapii osteoporozy.

\* Ad Artykuł 1. \*

Za aktualny stan układu kostnego odpowiedzialne są dwie populacje komórek, a mianowicie komórki kościotwórcze (osteoblasty) i komórki kościogubne (osteoklasty), które kontrolują procesy przebudowy kości. Prekursory obu typów komórek znajdują się w szpiku. Prekursorami osteoblastów są totipotencjalne mezenchymalne komórki pnia. Prekursorami osteoklastów są hematopoetyczne komórki linii monocytarno-makrofagowej, które napływają do kości z układu krążenia, przeważnie z sąsiadujących tkanek łącznych. Rozwój i różnicowanie obu typów komórek kontrolowane są przez czynniki wzrostu i cytokiny produkowane w mikrośrodowisku kostnym, jak również przez cząsteczki adhezyjne pośredniczące w oddziaływaniach komórka-komórka oraz komórka-macierz kostna.

Nadrzędną rolę w metabolizmie kości przypisuje się osteoblastom, które regulują dojrzewanie i aktywację osteoklastów albo bezpośrednio przez kontakt komórkowy, albo pośrednio przez czynniki sekrecyjne. W obu przypadkach kluczową rolę odgrywa receptor na powierzchni komórki kościogubnej, tak zwany RANK. Wiąże się z nim cząsteczka liganda syntezowana przez komórki kościotwórcze i prezentowana na ich powierzchni, tak zwany RANKL (RANK ligand). Utworzenie połączenia  $RANK \Leftrightarrow RANKL$ , możliwe tylko w czasie kontaktu obu komórek, inicjuje dojrzewanie osteoklasta. Jednocześnie, komórka kościotwórcza syntezuje i wydziela rozpuszczalną formę RANK czyli osteoprotegerynę (OPG), która konkuruje o RANKL z receptorem błonowym osteoklasta, nie dopuszcza do powstania kompleksu  $RANK \Leftrightarrow RANKL$  i do kontaktu osteoklasta z osteoblastem, i hamuje w ten sposób procesy dojrzewania bądź aktywacji komórki kościogubnej. Osteoprotegeryna jest białkiem z rodziny receptorów czynnika nekrozy nowotworów (TNFR – tumor necrosis factor receptor) i jej sekwencja aminokwasowa cechuje się wysoką homologią międzygatunkową przekraczającą niekiedy 85%. Taki konserwatyzm sekwencji aminokwasowej spotykany jest często w przypadkach białek o kluczowym znaczeniu biologicznym. Osteoblast i syntezowane przez niego RANKL i OPG, to główne czynniki regulujące dojrzewanie i aktywację komórek kościogubnych.

\*\*

Komórki kościotwórcze budują kość w odpowiedzi na sygnał jakim są cząsteczki białek morfogenetycznych (BMP – bone morphogenetic proteins), które występują w znacznej liczbie izoform i są odpowiedzialne za rozwój, dojrzewanie i procesy regeneracyjne

organizmu przez całe jego życie. Wiele tkanek syntezuje białka morfogenetyczne kości. W układzie kostnym są one jednymi z głównych czynników rekrutujących osteoblasty i pobudzających je do procesu kościotworzenia.

\* Ad Artykuł 2. \*

Doskonałym modelem doświadczalnym do badania procesu kościotworzenia jest zjawisko heterotopowej osteogenezy czyli indukcji heterotopowej kości, tak zwanej *ossicle*, która powstaje niezależnie od układu szkieletowego. Zjawisko to zachodzi miejscowo pod wpływem implantu wszczepionego do organizmu biorcy poddanego lekkiej immunosupresji. Istnieją trzy sposoby indukowania heterotopowej *ossicle* i polegają one na wszczepieniu w mięsień udowy myszy (i) odwapnionej matrycy tkanki kostnej, (ii) nabłonka przejściowego pęcherza moczowego albo (iii) komórek niektórych transformowanych linii komórkowych, a wytworzona kosteczka posiada wszelkie cechy prawidłowo uformowanej kości, tj: tkankę kostną, jamę szpikową ze szpikiem kostnym i otoczkę z tkanki chrzęstnej.

Tworzenie heterotopowej kosteczki pod wpływem przeszczepionego nabłonka przejściowego pęcherza moczowego zachodzi w przypadku kilku gatunków, ale mechanizm tego procesu nie został jeszcze wyjaśniony. Zjawisko to ma miejsce również w systemach ksenogenicznych, ale wymaga wtedy immunosupresji gospodarza, aby zapewnić ochronę implantu oraz jego osteoindukcyjnego potencjału. Zbadaliśmy źródło potencjału osteoindukcyjnego nabłonka pęcherza moczowego świnki morskiej w porównaniu z nabłonkiem ludzkim, który nie indukuje heterotopowej kości po wszczepieniu w mięsień udowy myszy. Badania histologiczne potwierdziły pojawienie się zrębów *ossicle* już po 9 dniach od wszczepienia nabłonka pęcherza moczowego świnki morskiej, podczas gdy wszczepienie nabłonka ludzkiego nie skutkowało kościotworzeniem nawet po 11 dniach. Analiza ekspresji genów dwóch białek morfogenetycznych kości w nabłonkach obu gatunków udowodniła, że źródłem potencjału osteoindukcyjnego nabłonka świnki morskiej są BMP-3 i BMP-4. Oddziaływanie BMP świnki morskiej na tkankę mięśniową myszy jest możliwe dzięki wysokiej międzygatunkowej homologii sekwencji aminokwasowej tych białek, co wykazałam poprzez sekwencjonowanie powielonych fragmentów mRNA tych białek. Oznaczona międzygatunkowa homologia przekraczała 86%. W ten sposób, pośrednio udowodnione zostało zaangażowanie białek morfogenetycznych syntezowanych przez komórki nabłonka pęcherza moczowego świnki morskiej w indukcję procesu kościotworzenia w tkance biorcy, a porównanie z urothelium ludzkim tylko to potwierdziło.

\*\*

W przeciwieństwie do ludzkiego nabłonka pęcherza moczowego inne ludzkie komórki posiadają zdolność indukcji heterotopowej kości, a są to nowotworowe komórki śluzówki szyjki macicy znane jako HeLa. Komórki te zostały pierwszy raz pobrane w 1951 roku ze śluzówki szyjki macicy 31-letniej, czarnej kobiety – Henrietty Lacks. Badania histopatologiczne potwierdziły, że komórki te pochodzą z niezwykle rzadkiej odmiany nowotworu złośliwego - gruczolaka szyjki macicy. Miały one rzadką cechę oporności na radioterapię i rosły w sposób nieograniczony w warunkach laboratoryjnych. Osiem miesięcy po zdiagnozowaniu, Henrietta Lacks zmarła. Komórki pobrane z jej ciała zostały nazwane HeLa od pierwszych dwóch liter imienia i nazwiska.

W celu rozpoznania czynników regulujących procesy kościotworzenia u człowieka celowe stało się wyjaśnienie źródła, notowanego już wcześniej, potencjału osteoindukcyjnego ludzkich komórek HeLa.

Udział białek morfogenetycznych w programowanym, celowym kościotworzeniu w układzie ksenogenicznym – mysz ↔ człowiek – jest możliwy również dzięki konserwatyzmowi sekwencji aminokwasowej białek morfogenetycznych. Wysoka homologia dotyczy wszystkich znanych izoform BMP i w większości przypadków przekracza 75%, co w oddziaływaniach ligand ↔ receptor czy antygen przeciwciało wystarczy do 100% aktywności biologicznej.

\* Ad Artykuły 3 i 4. \*

Prawdopodobieństwo, że potencjał osteoindukcyjny linii komórkowej HeLa ma swoje źródło w białkach morfogenetycznych kości zostało potwierdzone w trzech publikacjach tego cyklu. Heterotopowa kosteczka indukowana przez te komórki w mięśniu udowym myszy osiągała pełną formę po 19 dniach od implantacji komórek HeLa i w badaniu histologicznym wykazywała obecność tkanki kostnej, jamy szpikowej ze szpikiem kostnym oraz otoczki z tkanki chrzęstnej. Po tym czasie w miejscu wszczepienia nie ma już komórek HeLa. Zostały one usunięte przez organizm biorcy. Immunohistochemiczna analiza *ossicle* przeprowadzona 7 dni po implantacji HeLa, a więc w czasie kiedy powstaje już zrąb tkanki chrzęstnej, ale komórki HeLa występują jeszcze w miejscu wszczepienia, wykazała obecność w tych komórkach dwóch białek morfogenetycznych kości - BMP-4 i BMP-6. Równoczesna immunoenzymatyczna analiza medium po hodowli HeLa, przeprowadzona techniką Western blot, potwierdziła oznaczenia immunohistochemiczne i dowiodła sekrecji jednego z tych białek, tu: BMP-4, przez komórki HeLa do medium hodowlanego. Zdolność komórek HeLa do sekrecji BMP zapewnia bezpośrednie oddziaływanie tych białek na osteoblasty biorcy przeszczepu, tu: myszy. Reasumując: (i) sekrecja białek morfogenetycznych kości przez

komórki HeLa, (ii) obecność tych białek w implantowanych komórkach HeLa na początku procesu kościotworzenia, aż wreszcie (iii) zanik komórek HeLa po 19 dniach od implantacji wskazują, że powstanie pełnego *ossicle* nie jest reakcją gospodarza na stan zapalny wywołany implantacją, ale jest swoistą reakcją komórek kościotwórczych biorcy na obecność białek morfogenetycznych kości.

Wymienione powyżej oznaczenia zrodziły pytanie o ilość izoform białek morfogenetycznych kości syntezowanych przez komórki HeLa. Do badań wybrano izoformy o najsilniejszych właściwościach osteoindukcyjnych, a mianowicie - BMP-1, -2, -3, -4, -5, -6 i -7. Podczas oznaczeń ekspresji tych genów uwidoczniła się zmienność fenotypu linii komórkowej HeLa. Porównawnie ekspresji techniką półilościowego PCR podzieliło linię HeLa na trzy sublinie różniące się panelem ekspresjonowanych genów. Sublinie te zostały przez nas nazwane HeLa-K, HeLa-F i HeLa-R. Oznaczone różnice w ekspresji genów BMP znalazły bezpośrednie odzwierciedlenie w jakości indukowanej heterotopowej kosteczki. Linia HeLa-F, która ekspresjonowała wszystkie izoformy, od BMP-1 do BMP-7, indukowała pełne *ossicle* po około 20 dniach od wszczepienia. Linia HeLa-K, która wykazała aktywność mniejszej ilości genów, brak było ekspresji BMP-5 i BMP-7, po 20 dniach indukowała tkankę chrzęstną. Linia HeLa-R natomiast, okazała się najuboższa pod względem ilości aktywnych genów i ekspresjonowała zaledwie 4 izoformy, tj.: BMP-1, -3, -4 i -6. W przypadku tej linii, nawet 20-dniowy okres oczekiwania od implantacji nie był wystarczający do indukcji *ossicle* i po tym czasie w badaniu histologicznym widoczne były zaledwie wysepki tkanki chrzęstnej. Pomiary masy mineralnej wszystkich trzech stadiów *ossicle* wykazały znaczące różnice, doskonale korelujące z obrazami badań histologicznych i pomiarami aktywności genów dla oznaczanych siedmiu izoform BMP. Okazało się, że im mniej izoform BMP tym słabszy proces kościotworzenia.

\*\*\*

Podstawą dobrego zrostu kostnego jest zapewnienie złamanej kości tak zwanej "ciszy mechanicznej". Metodami nieoperacyjnymi osiąga się ją poprzez prawidłowe unieruchomienie kończyny w opatrunku gipsowym, a w przypadku metod operacyjnych poprzez repozycję ze stabilizacją odłamów za pomocą implantów zespalających.

Na zrost kości ma wpływ wiele czynników: lokalizacja złamania, czas jaki upłynął od urazu, sposób dotychczasowego leczenia, aktualny obraz radiologiczny oraz wiek i ogólny stan zdrowia pacjenta. Przez lokalizację złamania należy rozumieć rodzaj kości i rodzaj budującej ją tkanki kostnej. Istnieją dwie tkanki kostne - kość korowa inaczej zbita i kość beleczkowa inaczej gąbczasta, różniące się strukturą i intensywnością procesów

metabolicznych. Kość korowa buduje trzony kości długich oraz powierzchnię kości płaskich i różnokształtnych, a jej wpływ na przemianę materii jest stosunkowo niewielki. Kość gąbczasta buduje nasady kości długich oraz wnętrza kości różnokształtnych i niektórych płaskich, i cechuje się znacznie większą zawartością komórek kostnych, a przez to większym udziałem w przemianie materii.

\* Ad Artykuł 5. \*

Istnieje praktyczna, obiegowa wiedza na temat wymaganego czasu unieruchomienia złamanej kości. Czas ten jest on różny dla różnych kości i zwykle wynosi: 4-8 miesięcy w przypadku tkanki kostnej korowej i 3-6 miesięcy w przypadku tkanki kostnej beleczkowej. Porównanie różnych kości wskazuje, że do ich zagojenia potrzeba różnego czasu:

1. kości czaszki - od kilku tygodni do 2-3 lat (5 lat w przypadkach ciężkich złamań);
2. żuchwa - 4-6 tygodni;
3. kości miedniczne - od kilku tygodni do kilkunastu miesięcy;
4. kość ramienna - 6-8 tygodni;
5. kość udowa - 3-6 miesięcy;
6. kości piszczelowej - kilka miesięcy.

Oceny zrostu dokonuje się nie częściej niż co miesiąc na podstawie RTG.

Dotychczasowa wiedza na temat różnic w czasie gojenia się różnych tkanek kostnych, jakkolwiek dobrze opisana w literaturze jako obserwacja, jest niepełna pod względem poznania przyczyn tego zjawiska.

Rezultaty przedstawione w artykule 4 wskazujące bezpośrednią zależność procesu kościotworzenia od ilości uczestniczących w nim izoform BMP oraz kliniczne obserwacje zmienności czasu zrastania się kości dały podstawę do podjęcia próby wyjaśnienia tego zjawiska na poziomie molekularnym.

Badania przeprowadzono na siedmiu próbkach kości ludzkich pobranych *post mortem* od ofiar wypadków komunikacyjnych. Próbkę reprezentowały wszystkie typy kości oraz oba rodzaje tkanki kostnej.

Za podstawę do oceny zaangażowania BMP w proces gojenia się złamania przyjęty został poziom ekspresji genów wybranych izoform białek morfogenetycznych kości. Do badań wybrano izoformy BMP -2, -4 i -6 jako najbardziej typowe dla tkanki kostnej. Ekspresję ich genów mierzono za pomocą PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). Stwierdzono, że ekspresja mRNA dla BMP-2 i BMP-4 jest wyższa w tkance kostnej beleczkowej kości długich, płaskich kościach czaszki i trzonie żuchwy aniżeli w tkance kostnej korowej trzonu kości długiej. We wszystkich zbadanych próbkach ekspresja mRNA



dla BMP-4 była wyższa niż dla BMP-2. Ekspresji genu BMP-6 nie wykazano, ale obiektem badań były kości pochodzące od osób zdrowych, u których gen ten mógł nie wykazywać konstytutywnej aktywności w przeciwieństwie do BMP-2 i BMP-4, których obecność jest stale oznaczana we wszystkich tkankach organizmu. BMP-2 i BMP-4 są najbardziej aktywnymi białkami morfogenetycznymi kości, a heterodimery ich podjednostek,  $\alpha 2/\beta 4$  i  $\alpha 4/\beta 2$ , wykazują się wyższą aktywnością biologiczną niż cząsteczki wyjściowe ( $\alpha 2/\beta 2$ ,  $\alpha 4/\beta 4$ ). Uzyskane rezultaty pozwalają sądzić, że różnice w poziomie aktywacji genów różnych BMP mogą być jednymi z najważniejszych czynników determinujących różnice w czasie potrzebnym do zagojenia się różnych kości.

\*\*

Uszkodzenie szkieletu u osób zdrowych prowadzi do uwolnienia dwóch aktywujących osteoblasty czynników – białek morfogenetycznych kości oraz prostaglandyny 2.

Osteoporoza to choroba charakteryzująca się niską masą kostną i strukturalnym uszkodzeniem tkanki kostnej, co prowadzi do kruchości kości i zwiększonego ryzyka złamań. Paradoksalnie, największym zniekształceniom podczas zmian osteoporotycznych ulega tkanka kostna beleczkowa charakteryzująca się wyższym zaangażowaniem w procesy metaboliczne niż tkanka kostna korowa. Powstało zatem pytanie czy większa sprawność metaboliczna tej tkanki kostnej mogłaby zostać wykorzystana do zapobiegania rozwojowi osteoporozy i czy leczenie nie powinno być skierowane na zmniejszenie procesu aktywacji osteoklastów.

\* Ad Artykuł 6. \*

Badania kinetyki przebudowy indukowanej heterotopowej tkanki kostnej wykazały, że *ossicle* osiąga największy rozmiar po około 20 dniach od przeszczepu. Po tym czasie nie ma już komórek stymulującego implantu, a po usunięciu immunosupresji zaczyna się proces resorpcji *ossicle*, który swoim przebiegiem przypomina proces obserwowany w osteoporozie, gdzie resorpcja przeważa nad kościotworzeniem.

Podawanie osteoprotegeryny (OPG), białka przeciwdziałającego różnicowaniu, dojrzewaniu i aktywacji osteoklastów, skutkowało spowolnieniem procesu resorpcji kości, co zostało sprawdzone histologicznie i zmierzone ilościowo. Osteoprotegerynę stosowano od 9 do 11 dnia procesu kościotworzenia w dawce 50  $\mu$ g na mysz co drugi dzień. Fragmenty mięśni zawierające *ossicle* trawione były mieszaniną proteaz, a zmineralizowaną tkankę ważono z wysoką dokładnością. Dzięki podawaniu OPG ponad 340-540% minerału kostnego zostało zachowane w badanych *ossicle*, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt



nieleczonych osteoprotegeryną. Ocena histologiczna objęła analizę struktury indukowanej *ossicle* i wykazała jej prawidłowość.

\*\*\*

Przedstawione badania dotyczyły dwóch kluczowych czynników sprzyjających wytworzeniu i zachowaniu prawidłowego szkieletu. Oba te czynniki, rodzina białek morfogenetycznych kości jak i osteoprotegeryna, wiążą się z aktywnością i funkcją komórki kościotwórczej. Opracowany i scharakteryzowany model doświadczalny wykazał swoją przydatność do studiów nad regulacją procesów obrotu kostnego ze szczególnym uwzględnieniem roli zaangażowanych komórek kostnych – osteoblastów i osteoklastów.

Przedstawione osiągnięcie uzyskano w trzech etapach realizujących postawione cele. W powyższym opisie zawarłam koncepcyjny warsztat wytyczania celów.

Osiągnięte cele/etapy:

- I - Określenie białek morfogenetycznych kości jako źródła potencjału osteoindukcyjnego śluzówki pęcherza moczowego świnki morskiej oraz linii ludzkich komórek epitelialnych Hela;
- II – Wskazanie białek morfogenetycznych kości jako potencjalnych przyczyn różnic w tempie gojenia się kości;
- III – Zbadanie kinetyki indukcji i resorpcji heterotopowej *ossicle* oraz wykazanie ochronnego wpływu OPG na *ossicle* poprzez hamowanie jej resorpcji.

Opracowany model doświadczalny nie tylko umożliwia prognozowanie przydatności osteoprotegeryny do leczenia lub hamowania zmian osteoporotycznych, ale także opisuje zależności pomiędzy procesem kościotworzenia a obecnością izoform BMP.

Przedstawiona wiedza może znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej, a w szczególności w leczeniu ciężkich przypadków osteopenii czy wspomaganiu leczenia lokalnych trudno gojących się złamań i stawów rzekomych. Mogłaby być również pomocna w medycynie regeneracyjnej, implantoprotetyce, przy wspomaganiu adaptacji biokompatybilnych, nieorganicznych implantów (wszczepów) wewnątrzkościowych. Szczególnie przydatna może okazać się przy wspomaganiu adaptacji implantów hybrydowych organiczno-nieorganicznych czy organicznych pochodzenia zwierzęcego stosowanych w augmentacji znacznych ubytków kostnych.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).

W 1989 roku wzięłam udział w opracowaniu szybkiego i swoistego testu immunofiltracyjnego do oznaczania ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG – human

chorionic gonadotropin) w moczu, w warunkach domowych i klinicznych. Test został wdrożony do produkcji jako zestaw diagnostyczny do wczesnego wykrywania oraz monitorowania ciąży. Produkowany był przez POCh w Gliwicach i sprzedawany w aptekach pod nazwą GRAVIPOL.

W latach 1989-1998 opracowywałam techniki immunoenzymatyczne do użytku laboratoryjnego, klinicznego oraz domowego, służące do oznaczania markerów ciąży, płodności, zawału serca i chorób nerek. Rezultaty tych opracowań zostały opublikowane. Diagnostyka i monitorowanie ciąży oraz niektórych nowotworów trofoblastycznych prowadzona była na podstawie pomiarów stężenia hCG obecnego w surowicy i moczu, a syntezywanego przez komórki łożyska lub nowotworowe. Diagnostykę płodności żeńskiej prowadzono na podstawie oznaczeń hormonu luteinizującego (hLH - human luteinizing hormone), hormonu glikoproteinowego syntezywanego przez przysadkę, obecnego w surowicy i moczu. Wczesna diagnostyka zawału serca możliwa była dzięki oznaczeniom mioglobiny, hemoproteiny występującej głównie w mięśniach sercowym i szkieletowych, której stężenie we krwi wzrasta gwałtownie w ciągu pierwszej godziny od wystąpienia bólu w klatce piersiowej. Transferryna, albumina, immunoglobulina G oznaczane były w moczu chorego w diagnostyce chorób nerek. Podczas opracowywania wymienionych technik immunoenzymatycznych prowadziłam badania struktury i antygenowości wymienionych białek z zastosowaniem syntetycznych polipeptydów.

W okresie 1998-2001 uczestniczyłam w badaniach wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnału mediowanych przez cAMP i cGMP. Opisana metoda oznaczania tych cząsteczek została opatentowana. Na realizację prac uzyskaliśmy dofinansowanie KBN w ramach projektu naukowego.

W latach 2000-2011 zaangażowałam się w badania metabolizmu kości. Prace nad komórkami odpowiedzialnymi za kościotworzenie i resorpcję kości oraz nad czynnikami regulującymi te procesy były realizowane w ramach 4 projektów KBN/MNiSW, które uzyskałam wspólnie z zespołem.

Równocześnie z badaniami homeostazy kości rozpoczęłam opracowywanie metody izolacji mitochondrialnego DNA z antycznych (neolitycznych) kości ludzkich. Celem była identyfikacja haplotypu mitochondrialnego DNA populacji Nuraghi'ch, antycznych Sardów i próba wyjaśnienia przyczyn wyginięcia tej populacji. Mitochondrialne DNA, dzięki swojej wysokiej konserwatywności, umożliwia określenie losów nosiciela mutacji i rozstrzygnięcie czy na przestrzeni wieków doszło do eksterminacji czy do asymilacji

populacji obdarzonej tą mutacją. Badania prowadzono również na próbkach kości z Neolitu pochodzących z rejonu Europy, Azji, Afryki i Australii.

W latach 2012-2016 zajmowałam się w ramach 2 projektów zleconych oraz jednego projektu rozwojowego NCBiR badaniami biogodności materiałów stosowanych do konstrukcji lub pokrywania implantów.

Od 2016 do chwili obecnej uczestniczę w wielośrodkowych badaniach charakteryzujących potencjał biologiczny nowych substancji chemicznych syntezowanych w celu uzyskania pożądaných i zdefiniowanych efektów, działających jako stymulatory bądź inhibitory komórek immunokompetentnych.

*Wronie Ewa Koczkodziej*