

AUTOREFERAT

dr n. med. Marta Pokrywczyńska

**Katedra Urologii,
Zakład Medycyny Regeneracyjnej, Bank Komórek i Tkanek
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Bydgoszcz, 2017

1. IMIĘ I NAZWISKO

Marta Pokrywczyńska

2. WYKAZ POSIADANYCH DYPLOMÓW STOPNI NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH– Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

13 lipca 2005 r. ukończyłam studia licencjackie na kierunku biotechnologia, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując **tytuł licencjata**. Pracę licencjacką pt.: „Leczenie cukrzycy poprzez przeszczep komórek wydzielających insulinę” wykonałam pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Drewy.

27 lipca 2007 r. ukończyłam studia magisterskie na kierunku biotechnologia, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując **tytuł magistra**. Pracę magisterską pt.: „Opracowanie metody izolacji wysp trzustkowych szczura” wykonałam pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Drewy. Studia ukończyłam z tytułem Najlepszego Absolwenta Wydziału Lekarskiego oraz Najlepszego Absolwenta Collegium Medicum UMK.

14 grudnia 2011 r. uzyskałam **stopień naukowy doktora** nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Rozprawę doktorską pt.: „Rola komórek macierzystych w remodelingu rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego szczura”, wykonałam pod kierunkiem prof. dr. hab. Tomasza Drewy.

20 lipca 2016 r. ukończyłam studia podyplomowe w zakresie Analityki Medycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, dnia 10 marca 2017 r. otrzymałam Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego (nr 16064).

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ ARTYSTYCZNYCH

01 wrzesień 2005- 30 września 2007, **technik** w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01 października 2007- 31 marca 2012, **asystent** w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01 kwietnia 2012- 01 listopada 2015, **adiunkt** w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

02 listopada 2015- 30 czerwca 2017, **p.o. kierownika** Zakładu Medycyny Regeneracyjnej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01 lipca 2017, **p.o. kierownika** Zakładu Medycyny Regeneracyjnej, Banku Komórek i Tkanek, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ.U. NR 65, POZ.595 ZE ZM.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

„Rekonstrukcja pęcherza moczowego technikami inżynierii tkankowej, badania eksperymentalne” na podstawie cyklu 7 wybranych publikacji.

4.2. WYKAZ PUBLIKACJ WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 7 przedstawionych poniżej prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku oddziaływania (IF) równym 16.669 i sumarycznej liczbie punktów wg MNiSW równej 175.000. Publikacje uszeregowano tematycznie, a nie chronologicznie z rokiem publikacji.

1. **Pokrywczynska M.** Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering- an analysis of 131 clinical cases. Exp Biol Med (Maywood) 2014; 239: 264-71. **IF= 2.165; MNiSW=30.000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu tabel, korekcie ostatecznej wersji tekstu, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje.

** Mój udział procentowy szacuję na 48%.*

2. Jundzill A*, **Pokrywczynska M***, Adamowicz J, Kowalczyk T, Nowacki M, Bodnar M, Marszałek A, Frontczak- Baniewicz M, Mikulkowski G, Kloskowski T, Gatherwright J, Drewa T. Vascularization Potential of Electrospun Poly(L-Lactide-co-Caprolactone) Scaffold: The Impact for Tissue Engineering. Med Sci Monit. 2017; 23:1540-1551.***równoważny udział autorów w pracy, IF=1.585; MNiSW=15.000**

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na merytorycznej i statystycznej analizie danych, napisaniu manuskryptu i przygotowaniu rycin, korekcie ostatecznej wersji tekstu, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

3. **Pokrywczynska M.** Jundzill A, Adamowicz J, Kowalczyk T, Warda K, Rasmus M, Buchholz L, Krzyzanowska S, Nakielski P, Chmielewski T, Bodnar M, Marszałek A, Debski R, Frontczak-Baniewicz M, Mikułowski G, Nowacki M, Kowalewski TA, Drewa T. Is the poly (L- lactide- co- caprolactone) nanofibrous membrane suitable for urinary bladder regeneration? PLoS One. 2014; 9: e105295. **IF= 3.234; MNiSW= 40.000**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badania, izolacji i hodowli komórek macierzystych, przygotowaniu wszczepów do rekonstrukcji, wykonaniu analiz cytotoksyczności biomateriałów, analizie merytorycznej i statystycznej wyników, przygotowaniu manuskryptu, tabel oraz rycin, korekcie

ostatecznej wersji tekstu, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

4. Adamowicz J,* **Pokrywczyńska M***, Tworkiewicz J, Kowalczyk T, van Breda SV, Tyloch D, Kloskowski T, Bodnar M, Skopinska-Wisniewska J, Marszałek A, Frontczak-Baniewicz M, Kowalewski TA, Drewa T. New Amniotic Membrane Based Biocomposite for Future Application in Reconstructive Urology. PLoS One. 2016; 11: e0146012 ***równoważny udział autorów w pracy, IF=2.806; MNiSW=35.000**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badania, izolacji i hodowli komórek macierzystych, przygotowaniu wszczepów, analizie cytotoksyczności biomateriałów, merytorycznej i statystycznej analizie danych, odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

5. **Pokrywczynska M**, Czapiewska M, Jundzill A, Bodnar M, Balcerczyk D, Kloskowski T, Nowacki M, Marszalek A, Drewa T. Optimization of porcine urothelial cell cultures: Best practices, recommendations, and threats. Cell Biol Int. 2016; 40: 812-20. **IF=1.831, MNiSW= 15.000**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badania, izolacji i hodowli komórek, analizie merytorycznej i statystycznej wyników, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu tabel oraz rycin, korekcie ostatecznej wersji tekstu, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje. Mój udział szacuję na 90%.

6. **Pokrywczynska M**, Balcerczyk D, Jundzill A, Gagat M, Czapiewska M, Kloskowski T, Nowacki M, Gastecka AM, Bodnar M, Grzanka A, Marszalek A, Drewa T. Isolation, expansion and characterization of porcine urinary bladder smooth muscle cells for tissue engineering. Biol Proced Online 2016;18:17. **IF=2.042; MNiSW=15.000**

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badania, izolacji i hodowli komórek, analizie merytorycznej i statystycznej wyników, przygotowaniu manuskryptu, tabel oraz rycin, korekcie ostatecznej wersji tekstu, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje. Mój udział szacuję na 85%.

7. **Pokrywczynska M**, Jundzill A, Warda K, Buchholz L, Rasmus M, Adamowicz J, Bodnar M, Marszalek A, Helmin- Basa A, Michalkiewicz J, Gagat M, Grzanka A, Frontczak-Baniewicz M, Gastecka AM, Kloskowski T, Nowacki M, Ricordi C, Drewa

T. Does mesenchymal stem cell source influence smooth muscle regeneration in tissue engineered urinary bladder? Cell Transpl. 2017; IF= 3.006; MNiSW=25.000

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badania, izolacji i hodowli komórek, przygotowaniu wszczepów, analizie ekspresji genów techniką PCR w czasie rzeczywistym, analizie merytorycznej i statystycznej wyników, przygotowaniu manuskryptu, tabel oraz rycin, korekcie ostatecznej wersji tekstu, korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje. Mój udział szacuję na 80%.

4.3. OPIS MERYTORYCZNY OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO PRZEDSTAWIONEGO DO OCENY

4.3.1. ISTNIEJĄCY STAN WIEDZY W ZAKRESIE TEMATU BADAŃ

Istnieje wiele wrodzonych i nabytych stanów chorobowych wymagających operacji rekonstrukcyjnych pęcherza moczowego. Najczęstszym wskazaniem do rekonstrukcji pęcherza moczowego jest naciekający warstwę mięśniową rak pęcherza moczowego. Metodą leczenia naciekającego warstwę mięśniową raka pęcherza moczowego jest usunięcie całego pęcherza moczowego (cystektomia radykalna) i odprowadzenie moczu poprzez zastosowanie tzw. kontynentnych (zapewniających trzymanie moczu) lub niekontynentnych technik. Kontynentne techniki odprowadzenia moczu obejmują metody mające na celu wytworzenie wewnątrzystrojowych zbiorników na mocz takich jak szczelny zbiornik jelitowy czy ortotopowy pęcherz jelitowy (Abol-Enein i Ghoneim, 2008; Dhar i Studer, 2008; Hautmann, 2008). Do technik niekontynentnych, mających na celu odprowadzenie moczu bezpośrednio na zewnątrz organizmu zaliczamy wstawkę jelitową czy przetokę moczowodowo- skórną (ureterokutaneostomia) (Patel i Fergany, 2008).

Poza najliczniejszą grupą pacjentów onkologicznych wymagających operacji odtwórczych dolnych dróg moczowych, istnieje szereg nienowotworowych schorzeń urologicznych, których leczenie oparte jest na rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego. Do chorób tych zalicza się wady wrodzone i rozwojowe dolnych dróg moczowych, jatrogenne uszkodzenia popromienne pęcherza moczowego, przewlekłe zapalenia pęcherza moczowego, gruźlicę, uszkodzenia rdzenia kręgowego, choroby układu nerwowego czy urazy (Reyblat i Ginsberg, 2008). Podstawowym założeniem terapeutycznym w ww. stanach chorobowych

jest wytworzenie warunków anatomicznych zapewniających niskociśnieniowy odpływ moczu z nerek (Zhang i wsp, 2016). W przypadku znacznego wzrostu ciśnienia śródpecherzowego lub istotnego zalegania moczu po mikcji, dochodzi do refluksów pecherzowo-moczowodowych i postępującej niewydolności nerek (Sillén i wsp, 2010).

Najczęstszą techniką rekonstrukcji ściany pecherza moczowego, mającą na celu uzyskanie niskociśnieniowego pecherza moczowego o odpowiedniej pojemności jest augmentacja ściany pecherza moczowego z wykorzystaniem unaczynionego fragmentu jelita cienkiego (illeocystoplastyka), rzadziej fragmentów jelita grubego (kolonocytoplastyka) czy żołądka (gastrocystoplastyka) (Casale, 2008).

Użycie ściany przewodu pokarmowego w operacjach rekonstrukcyjnych dróg moczowych obarczone jest wieloma niepożądanymi powikłaniami. Najczęstszymi są zaburzenia wynikające ze skrócenia powierzchni wchłaniania jelita oraz odmiennych właściwości ściany przewodu pokarmowego i dróg moczowych. Wchłanianie składników moczu prowadzi do zaburzeń elektrolitowych i równowagi osmotycznej, zaburzeń neurologicznych oraz demineralizacji kości (Cho i wsp, 2017; Roosen i wsp., 2004; Tanrikut i McDougal, 2004). Innymi powikłaniami są zwiększone wydzielanie śluzu i kamica, zakażenia układu moczowego czy nowotworzenie w obrębie nabłonka jelita oraz miejscach zespolenia z nabłonkiem dróg moczowych (N'Dow i wsp. 2004; Woodhouse i Robertson, 2004; Piccard, 2004; Wullt i wsp, 2004). Konieczność wykonania dodatkowego zabiegu chirurgicznego na jelicie wydłuża całkowity czas trwania operacji oraz zwiększa liczbę okołoperacyjnych i pooperacyjnych powikłań (Drewa i wsp. 2010).

Techniki inżynierii tkankowej stwarzają możliwość konstrukcji pecherza moczowego (ang. neo-bladder) oraz sztucznej wstawki do odprowadzenia moczu (ang. neo- conduit) *de novo* bez konieczności dodatkowego zabiegu chirurgicznego na jelicie (Drewa i wsp, 2012). Wyróżnia się dwie podstawowe techniki rekonstrukcji ściany pecherza moczowego technikami inżynierii tkankowej. Pierwsza metoda wykorzystuje rusztowania, które po wszczepieniu zasiedlane są przez komórki gospodarza, ulegają przebudowie i degradacji stymulując regenerację tkanki *in vivo*. W drugiej metodzie wykorzystywane są rusztowania wysiane komórkami. Namnożone w warunkach *in vitro* komórki wysiewane na rusztowaniach tworzą pseudotkanki *in vitro*, a następnie tkanki *in vivo* (Koh i Atala, 2004).

Pierwsze badanie kliniczne, w którym do rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego wykorzystano wytworzone *in vitro* wszczepy wysiane komórkami przeprowadzone zostało w latach 1998- 2005 (Atala i wsp, 2006.) Badanie przeprowadzono na grupie 7 pacjentów z małym, wysokociśnieniowym, neurogennym pęcherzem moczowym. Do rekonstrukcji zastosowano bezkomórkowe rusztowania ze ściany pęcherza moczowego (ang. Bladder Acellular Matrix, BAM) lub kompozyty kolagenu i kwasu poliglikolowego (ang. Collagen, C; Polyglycolic-Acid, PGA) wysiane autologicznymi komórkami nabłonka urotelialnego i mięśni gładkich. W tym celu komórki urotelialne i mięśni gładkich izolowane z małej 1-2 cm² biopsji ściany pęcherza moczowego, namnażano przez okres 7-8 tygodni i wysiewano na 70- 150 cm² rusztowaniach BAM lub C/PGA. U części pacjentów rekonstruowane pęcherze moczowe pokryto siecią większą celem wspomoczenia procesu rewaskularyzacji. W pęcherzach rekonstruowanych kompozytami C/PGA wysianymi komórkami obserwowano poprawę podatności ściany i zwiększenie pojemności. Biopsja wykonana 31 miesięcy po rekonstrukcji wykazała prawidłową trzywarstwową strukturę rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego. Nie obserwowano żadnych efektów ubocznych. Znacznie gorsze wyniki uzyskano w przypadku pęcherzy rekonstruowanych rusztowaniami BAM wysianymi komórkami. Należy jednak podkreślić, że u 3 z 4 pacjentów, u których rekonstruowano pęcherze moczowe tym biomateriałem nie pokryto wszczepu siecią. Dyskusyjne pozostaje więc to, czy gorsze wyniki obserwowane w tej grupie pacjentów były wynikiem użycia rusztowania BAM czy braku pokrycia wszczepu siecią. Badanie to wykazało po raz pierwszy, że skonstruowany technikami inżynierii tkankowej wszczep zbudowany z kompozytu C/PGA wysianego autologicznymi komórkami nabłonka urotelialnego i mięśni gładkich, pokryty siecią może być wykorzystywany do cystoplastyki pęcherza moczowego (Atala i wsp., 2006).

Kolejne badanie, w którym do rekonstrukcji pęcherzy moczowych użyto wytworzone *in vitro* wszczepy nie przyniosło oczekiwanych rezultatów (Joseph et al, 2014). Badanie przeprowadzono na grupie 10 pacjentów z pęcherzem neurogennym. Do augmentacji pęcherza zastosowano wszczepy zbudowane z kwasu poliglikolowego i polilaktydowanego (ang. Polylactic Acid, PLA) wysiane autologicznymi komórkami nabłonka urotelialnego i mięśni gładkich. U żadnego z 10 pacjentów nie zaobserwowano istotnej klinicznie poprawy w pojemności rekonstruowanych pęcherzy w 12 i 36 miesięcy po zabiegu. Poważne efekty uboczne, takie jak niedrożność jelit czy pęknięcie rekonstruowanej ściany wystąpiły u 4

pacjentów. W konsekwencji u 5 pacjentów wykonano tradycyjną cystoplastykę (Joseph et al, 2014).

Pomimo tego, że koncepcja tych dwóch badań klinicznych, wskazania do rekonstrukcji pęcherzy moczowych oraz rodzaj użytych komórek były porównywalne, to różnice w typie zastosowanego biomateriału, metodach hodowli i liczbie użytych komórek, oraz powierzchni wszczepu mogły istotnie wpłynąć na uzyskane wyniki. Dlatego też konieczne są kolejne badania mające na celu potwierdzenie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania wszczepów skonstruowanych technikami inżynierii tkankowej w rekonstrukcji pęcherza moczowego. Badania te powinny być jednakże poprzedzone solidnymi badaniami podstawowymi mającymi na celu: optymalizację metod izolacji i hodowli komórek do transplantacji, badaniami porównawczymi mającymi na celu dobór optymalnego rodzaju biomateriału do rekonstrukcji dróg moczowych, czy w końcu badaniami eksperymentalnymi mającymi na celu dopracowanie technik chirurgicznych rekonstrukcji.

4.3.2. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Celami przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego opartego na cyklu prac były:

- 1) ocena właściwości rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (Poly(L-Lactide-co-Caprolactone), PLCL) w warunkach *in vivo* (praca 2),
- 2) ocena możliwości zastosowania biomateriałów sztucznych (PLCL) biomateriałów naturalnych (Small Intestinal Submucosa, SIS) oraz ich kompozytów (PLCL+ błona owodniowa) w regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego (prace 3-4),
- 3) opracowanie i optymalizacja metod izolacji i hodowli komórek nabłonka urotelialnego i mięśni gładkich do celów rekonstrukcyjnych w urologii (prace 5 i 6),
- 4) porównanie potencjału mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z różnych źródeł: szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej do regeneracji mięśni gładkich w rekonstruowanym pęcherzu moczowym (praca 7),
- 5) ocena wpływu liczby komórek na wynik regeneracji mięśni gładkich w rekonstruowanym pęcherzu moczowym (praca 7).

Praca nr 1

Wstęp do cyklu prac oparto na artykule poglądowym, w którym analizie porównawczej poddano różne rodzaje biomateriałów stosowanych do rekonstrukcji pęcherzy moczowych

człowieka. Analizę oparto na pracach opublikowanych w latach 1957- 2013. Wykazano, że w okresie tym operacjom rekonstrukcyjnym pęcherza moczowego technikami inżynierii tkankowej poddano 131 pacjentów. Biomateriałami wykorzystywanymi do rekonstrukcji pęcherzy moczowych były: plastikowe formy (n=36), żelatynowe gąbki (n=9), papier Japoński (n=17), psi pęcherz utrwalony formaliną (n=12), liofilizowana opona twarda (n=44), wołowe osierdzie (n=1), podśluzówka ściany jelita cienkiego (n=5), bezkomórkowe rusztowanie ze ściany pęcherza moczowego (n=4) oraz kompozyty kolagenu i kwasu poliglikolowego (n=3). Najczęstszym wskazaniem do rekonstrukcji był rak pęcherza moczowego (n=77). Rzadszymi wskazaniem były natomiast gruźlica dolnych dróg moczowych (n=20), pęcherz neurogeny (n=17), śródmiąższowe zapalenie pęcherza moczowego (n=9), wady wrodzone i rozwojowe pęcherza moczowego (n=6), jatrogenne uszkodzenia popromienne pęcherza (n=1) czy przetoka pęcherzowo-jelitowa (n= 1). Analiza uzyskanych wyników wykazała, dobre, złe i wątpliwe wyniki rekonstrukcji u odpowiednio 47, 45 i 39 pacjentów. Najczęstszymi powikłaniami rekonstrukcji pęcherzy moczowych były obkurczenie wszczepu, perforacja pęcherza i wyciek moczu, refluks pęcherzowo-moczowodowy oraz nietrzymanie moczu. Analiza regeneracji komponentów rekonstruowanego pęcherza moczowego wykazała, że nabłonek moczowy regeneruje całkowicie, niezależnie od rodzaju użytego biomateriału, w przeciwieństwie do warstwy mięśniowej, której regeneracja jest znikoma lub częściowa.

Prace 2, 3 i 4

Celem prac 2, 3 i 4 była ocena przydatności nowych biomateriałów do regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego. Ocenie poddano biomateriał sztuczny- poli-laktydo-ko-kaprolakton (ang. Poly(L-Lactide-co-Caprolactone), PLCL) biomateriał naturalny- podśluzówkę jelita cienkiego (ang. Small Intestinal Submucosa, SIS) oraz kompozyt biomateriału naturalnego i sztucznego- błonę owodniową pokrytą PLCL. Biomateriały wykorzystane w pracach 2, 3 i 4 zsyntetyzowano w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki, Polskiej Akademii Nauk w Warszawie pod kierunkiem dr inż. Tomasza Kowalczyka.

Przedmiotem badań pracy 2 była ocena właściwości nowego rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (ang. Poly(L-Lactide-co-Caprolactone, PLCL) w warunkach *in vivo*, w tym potencjału do angiogenezy, integracji z tkankami biorcy, zdolności do przebudowy czy indukcji odpowiedzi immunologicznej. Odpowiednio szybkie unaczynienie wszczepionego biomateriału jest czynnikiem warunkującym jego integrację z natywną

tkanką, stymulującym zasiedlenie przez komórki biorcy oraz zmniejszającym bliznowacenie. Z kolei, szybka angiogeneza biomateriału wysianego komórkami wpływa krytycznie na przeżywalność wszczepianych komórek. Rusztowania sztuczne w porównaniu do naturalnych cechują się mniejszym ryzykiem odpowiedzi immunologicznej biorcy oraz transmisji czynników chorobotwórczych, jak również szerszą dostępnością. Rusztowania PLCL przygotowano techniką elektroprzędzenia celem stworzenia trójwymiarowej struktury naśladującej macierz zewnątrzkomórkową tkanki. Celem oceny właściwości rusztowań PLCL *in vivo* wszczepiono je podskórnie i dootrzewnowo 20 szczurom. Analizy histologiczna oraz immunohistochemiczna na obecność markera komórek endotelialnych CD31 wykazały, że rusztowania PLCL charakteryzowały się dużym potencjałem do angiogenezy niezależnie od miejsca implantacji. Gęstość naczyń krwionośnych w rusztowaniach PLCL w 6 tygodni po implantacji była jednakże wyższa u szczurów, którym rusztowania wszczepiono dootrzewnowo w porównaniu do szczurów, którym PLCL wszczepiono podskórnie. Wykazano, również że rusztowania PLCL wszczepione dootrzewnowo lepiej integrowały z tkankami i nie indukowały odpowiedzi immunologicznej w przeciwieństwie do rusztowań PLCL wszczepionych podskórnie w przypadku, których stwierdzono nacieki zapalne. Analiza transmisyjnym mikroskopem elektronowym wykazała degradację i przebudowę wszczepionego rusztowania PLCL, którego nanowłókna były zastępowane przez natywne tkanki.

Podsumowując, praca 2 wykazała, że nowe rusztowanie PLCL charakteryzuje się wysokim potencjałem do indukowania angiogenezy, nie jest immunogenne i dobrze integruje z tkankami biorcy, może być więc stosowane do celów rekonstrukcyjnych w medycynie regeneracyjnej. Pozytywne wyniki uzyskane w tej pracy stały się jednocześnie podstawą do konstrukcji nowych rusztowań: pięciowarstwowego rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu oraz kompozytu błony owodniowej i poli-laktydo-ko-kaprolaktonu do rekonstrukcji pęcherza moczowego.

W pracy 3, porównano potencjał dwóch rusztowań: nowego pięciowarstwowego rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (ang. Poly(L-Lactide-co-Caprolactone, PLCL) i wcześniej stosowanego, komercyjnie dostępnego rusztowania naturalnego z podsłuzówki ściany jelita cienkiego świni (ang. Small Intestinal Submucosa, SIS) do regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego szczura. W przypadku rekonstrukcji dróg moczowych, komórki wysiane na rusztowaniach bezpośrednio po transplantacji są ekspozowane na mocz. We wcześniej przeprowadzonym badaniu wykazaliśmy, że mocz wpływa cytotoksycznie

na komórki w hodowli *in vitro* i nawet jednogodzinna ekspozycja na mocz obniża istotnie żywotność komórek macierzystych (Adamowicz i wsp. 2012). Mając na względzie powyższe argumenty wytworzono nowe rusztowania PLCL o wielowarstwowej strukturze mającej na celu izolację komórek macierzystych od toksycznego środowiska moczu. Praca ta jest pierwszą, w której podjęto próbę oddzielenia komórek w rekonstruowanym pęcherzu od moczu z zastosowaniem nowego biomateriału. Badanie przeprowadzono na 20 szczurach. Pęcherze moczowe rekonstruowano rusztowaniami PLCL oraz SIS wysianymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived Stem Cells, ADSCs) lub rusztowaniami PLCL oraz SIS bez komórek. Badania cystograficzne wykazały prawidłowy kształt i wielkość pęcherzy moczowych rekonstruowanych rusztowaniem SIS, oraz deformacje i zrosty z okolicznymi narządami pęcherzy rekonstruowanych rusztowaniem PLCL. W pęcherzach moczowych rekonstruowanych rusztowaniem SIS wysianym komórkami ADSCs, w trzy miesiące po zabiegu obserwowano regenerację wszystkich komponentów prawidłowej ściany pęcherza moczowego. Jednakże, regeneracja warstwy mięśniowej była niepełna, a układ włókien nieuporządkowany w porównaniu do prawidłowej ściany pęcherza moczowego. W pęcherzach rekonstruowanych rusztowaniem SIS bez komórek obserwowano pełną regenerację nabłonka urotelialnego, przy braku regeneracji warstwy mięśniowej. Dużo gorsze wyniki obserwowano w pęcherzach moczowych rekonstruowanych rusztowaniem PLCL niezależnie od tego czy stosowano rusztowania wysiane komórkami ADSCs czy rusztowania bez komórek. Zastosowanie rusztowania PLCL prowadziło do wielu powikłań, takich jak pęknięcie wszczepu, tworzenie uchyłków, wciągnięcie rekonstruowanej ściany do światła pęcherza. Powikłania te związane były z wysoką 50% śmiertelnością. Analiza histologiczna wykazała, że wszczepiony materiał ulegał skręcaniu, pękał i nie integrował z rekonstruowaną ścianą pęcherza. Praca ta dowodzi, iż dobór rusztowania jest czynnikiem krytycznie wpływającym na wynik regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego. Nowe pięciowarstwowe rusztowanie z PLCL charakteryzuje się gorszym potencjałem do regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego w porównaniu do naturalnego rusztowania z podśluzówki jelita cienkiego.

Przedmiotem badań pracy 4, była ocena potencjału nowego biokompozytu z błony owodniowej i poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (ang. Poly(L-Lactide-co-Caprolactone, PLCL) do regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego szczura. Czynnikiem niekorzystnie wpływającym na wynik regeneracji jest reakcja zapalna. Wyniki moich wcześniejszych badań wykazały, iż mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego

stymulują regenerację rekonstruowanych pęcherzy moczowych, czemu towarzyszy wzrost ekspresji cytokin przeciwzapalnych (Pokrywczynska, 2013). Błona owodniowa charakteryzuje się unikalnymi przeciwzapalnymi i redukującymi włóknienie właściwościami, ale słaba wytrzymałość mechaniczna ogranicza możliwość jej zastosowania w operacjach rekonstrukcyjnych dróg moczowych. Wytworzony nowy biokompozyt zbudowany z błony owodniowej i PLCL cechuje się unikalną bioaktywnością i odpowiednią wytrzymałością mechaniczną. Opublikowana praca jest pierwszą dostępną w piśmiennictwie naukowym, w którym zastosowano kompozyt z błony owodniowej i PLCL do rekonstrukcji pęcherza moczowego. Badanie przeprowadzono na 20 szczurach, u których wykonano hemicystektomię, a następnie powstałe ubytki rekonstruowano biokompozytem błony owodniowej i PLCL. Wszczepione rusztowanie dobrze integrowało z natywną ścianą pęcherza moczowego. Nabłonek urotelialny pokrywał całkowicie światło rekonstruowanych pęcherzy moczowych. Barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność zróżnicowanych wykazujących ekspresję smootheliny komórek mięśniowych w rekonstruowanych pęcherzach moczowych. Układ włókien mięśniowych w rekonstruowanych pęcherzach moczowych na obrzeżach wszczepu był regularny, natomiast w centralnej części wszczepu chaotyczny i nieuporządkowany. Analiza morfometryczna wykazała, iż zawartość tkanki mięśniowej w pęcherzach rekonstruowanych biokompozytami błony owodniowej i PLCL była niższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednakże, porównując wyniki regeneracji warstwy mięśniowej w pęcherzach rekonstruowanych biokompozytami błony owodniowej i PLCL z wynikami uzyskanymi w pracy nr 3, w której do rekonstrukcji wykorzystano rusztowania SIS, należy zauważyć, iż wynik uzyskany dla nowego biokompozytu był dużo lepszy aniżeli dla rusztowania SIS i porównywalny do pęcherzy moczowych rekonstruowanych rusztowaniami SIS wysianymi komórkami macierzystymi. Analiza właściwości mechanicznych zrekonstruowanej ściany wykazała, iż jest ona sztywniejsza w porównaniu do natywnej ściany pęcherza moczowego, co jest wynikiem mniejszej zawartości włókien mięśniowych w rekonstruowanych pęcherzach. Podsumowując, należy stwierdzić, że stworzony na potrzeby tej pracy nowy biokompozyt błony owodniowej i PLCL jest bardzo obiecującym materiałem do rekonstrukcji pęcherza moczowego.

Prace 5 i 6

Celem prac 5 i 6 była optymalizacja metod izolacji i hodowli komórek nabłonka urotelialnego oraz mięśni gładkich pęcherza moczowego do celów medycyny regeneracyjnej w urologii.

Liczba i jakość przeszczepianych komórek są czynnikami wpływającymi krytycznie na wynik końcowy regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego. Dlatego też niezbędne jest opracowanie wydajnych i powtarzalnych metod izolacji i hodowli komórek, pozwalających na uzyskanie dużej liczby komórek, z małego fragmentu tkanki, w jak najkrótszym czasie.

Przedmiotem 5 pracy była optymalizacja metod izolacji i zakładania hodowli pierwotnej komórek nabłonka urotelialnego świni. W tym celu porównano 5 metod izolacji/ hodowli komórek nabłonka urotelialnego w tym metodę zakładania hodowli pierwotnej bezpośrednio z wycinka tkanki- eksplantatu (metoda I) oraz 4 metody trawienia enzymatycznego: kolagenazą II (metoda II), dyspazą II (metoda III), dyspazą II i trypsyną (metoda IV) oraz samą trypsyną (metoda V). Wykonano 175 izolacji komórek nabłonka urotelialnego. W hodowli komórek wykorzystano komercyjnie dostępne medium CnT-58 rekomendowane do hodowli komórek nabłonka urotelialnego. Wykazano, iż najskuteczniejszą i najwydajniejszą metodą izolacji i zakładania hodowli komórek nabłonka urotelialnego jest metoda III, w której komórki izolowano poprzez trawienie enzymatyczne dyspazą II. Metoda ta pozwoliła na wyizolowanie statystycznie wyższej liczby komórek ($\sim 23 \times 10^5$) w porównaniu do innych testowanych metod ($\sim 6-18 \times 10^5$). Metoda ta charakteryzowała się również największą wydajnością zakładania hodowli. Sukces zakładania hodowli dla metody III wynosił $>90\%$. Najmniej skuteczną metodą zakładania hodowli komórek nabłonka urotelialnego była metoda eksplantatów. Homogenność hodowli założonych metodami II, III i V była porównywalna. Ponad 80% komórek wykazywało ekspresję pancytokeratyny i 10-50% ekspresję białka p63. Znacznie gorsze wyniki uzyskano izolując komórki metodą IV, w której obserwowano najwyższe zanieczyszczenie hodowli fibroblastami. Tylko 10-50% komórek izolowanych tą metodą wykazywało ekspresję pancytokeratyny. Liczba komórek z pierwszego pasażu dla metody III była wyższa ($\sim 7 \times 10^6$) w porównaniu do innych testowanych metod ($\sim 1-6 \times 10^6$). Podsumowując, należy stwierdzić, że metoda III, w której stosowano trawienie enzymatyczne dyspazą II jest wydajną i powtarzalną metodą izolacji i zakładania hodowli pierwotnej komórek nabłonka urotelialnego. Zoptymalizowana w tej pracy metoda może być stosowana do izolacji i hodowli komórek nabłonka urotelialnego do celów medycyny regeneracyjnej w urologii.

Przedmiotem 6 pracy była optymalizacja metod izolacji i zakładania hodowli pierwotnej komórek mięśni gładkich pęcherza moczowego świni. Porównano 5 metod izolacji komórek mięśni gładkich w tym 4 metody enzymatyczne: trawienie kolagenazą i dyspazą II (metoda I),

trypsyną i kolagenazą II (metoda II), tylko kolagenazą II (metoda III), kolagenazą II po wcześniejszym trawieniu trypsyną (metoda IV) oraz metodę eksplantatów (metoda V). Hodowle pierwotne założono z wykorzystaniem 3 różnych mediów hodowlanych. Media hodowlane A i B składały się z pożywki DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z wysoką zawartością glukozy suplementowanej surowicami wołowymi różnego pochodzenia oraz antybiotykami. Medium hodowlane C stanowiła komercyjnie dostępna pożywka hodowlana SmGM-2 przeznaczona do hodowli komórek mięśniowych. Celem wybrania optymalnej metody założono 135 hodowli komórek mięśni gładkich. Liczby komórek izolowane kolagenazą II i dyspazą II (metoda I) oraz samą kolagenazą II (metoda III) były pięciokrotnie wyższe w porównaniu do liczb komórek izolowanych trypsyną z kolagenazą II (metoda II) czy kolagenazą II po trawieniu trypsyną (metoda IV). Sukces zakładania hodowli pierwotnej był najwyższy, gdy wyizolowane komórki hodowano w medium SmGM-2 ($s=100\%$). Najmniej skuteczną metodą zakładania hodowli komórek mięśni gładkich podobnie jak w przypadku zakładania hodowli komórek nabłonka urotelialnego była metoda eksplantatów. Analiza immunofluorescencyjna komórek wykazała, iż odsetek komórek wykazujących ekspresję markerów mięśni gładkich: alfa aktyny mięśni gładkich i smootheliny był najwyższy dla komórek izolowanych kolagenazą II i dyspazą II (metoda I) i hodowanych w medium SmGM-2 (medium C) i wynosił odpowiednio 98% i 83%. Cytometria przepływowa potwierdziła wysoką homogenność fenotypową tych hodowli. 99.5% komórek wykazywało ekspresję alfa aktyny mięśni gładkich. Analiza wzrostu komórek oraz ekspresji beta-galaktozydazy nie wykazały cech starzenia hodowli komórek mięśni gładkich do 8 pasażu.

Podsumowując, izolacja komórek kolagenazą II i dyspazą II i hodowla w medium SmGM-2 jest wydajną i powtarzalną metodą izolacji i zakładania hodowli pierwotnej komórek mięśni gładkich pęcherza moczowego. Zoptymalizowana w tej pracy metoda może być stosowana do izolacji i hodowli komórek mięśni gładkich w medycynie regeneracyjnej w urologii.

Praca 7

Celem pracy 7 było porównanie potencjału mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z dwóch różnych źródeł- tkanki tłuszczowej i szpiku kostnego do regeneracji mięśni gładkich w rekonstruowanym pęcherzu moczowym szczura. Oceniono również wpływ liczby komórek na wynik regeneracji mięśni gładkich w rekonstruowanym pęcherzu moczowym szczura.

U pacjentów z naciekającym warstwę mięśniową rakiem pęcherza moczowego nie można użyć komórek pęcherza moczowego do celów rekonstrukcyjnych ze względu na duże ryzyko przeniesienia choroby nowotworowej. Dlatego też konieczne jest znalezienie innych, łatwo dostępnych i wolnych od komórek nowotworowych źródeł komórek do rekonstrukcji pęcherza moczowego. Do tej pory nie zdefiniowano jakie źródło i typ komórek są optymalne do rekonstrukcji pęcherza moczowego u pacjentów onkologicznych. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (ang. Bone Marrow- Mesenchymal Stem Cells, BM-MSCs) oraz komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived Stem Cells, ADSCs) wykazują zbliżoną morfologię, profil markerów powierzchniowych oraz potencjał do różnicowania w kierunku komórek wywodzących się z mezodermy. Przypuszcza się, iż komórki te mogą jednak różnić się potencjałem regeneracyjnym. Regeneracja mięśnia wypieracza jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na funkcję rekonstruowanego pęcherza moczowego, dlatego też przedmiotem pracy 7 była szczegółowa ocena regeneracji tkanki mięśniowej w rekonstruowanym pęcherzu moczowym. Praca ta jest pierwszą, dostępną w piśmiennictwie naukowym publikacją, w której porównano potencjał komórek ADSCs i BM-MSCs do regeneracji mięśnia wypieracza w rekonstruowanym pęcherzu moczowym oraz oceniono wpływ liczby komórek na wynik regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego. Badanie przeprowadzono na 48 szczurach. Pęcherze moczowe rekonstruowano bezkomórkowym komercyjnie dostępnym rusztowaniem z podśluzówki jelita cienkiego (ang. Small Intestinal Submucosa, SIS) wysianym komórkami ADSCs lub BM-MSCs w gęstościach 4×10^6 lub 10×10^6 kom./cm² lub rusztowaniem SIS pozbawionym komórek. Analiza detekcji komórek po transplantacji wykazała, że duży odsetek wszczepionych komórek obumiera po transplantacji. Wszczepione komórki w pęcherzach rekonstruowanych matrycami SIS wysianymi komórkami ADSCs i BM-MSCs w mniejszej i większej gęstości stanowiły odpowiednio jedynie ~10% i ~30% całkowitej liczby komórek rekonstruowanej ściany. Analizy histologiczna i immunohistochemiczna na obecność łańcucha ciężkiego miozyny mięśni gładkich (α Smooth Muscle Myosin heavy chain α -SMM) wykazały, że komórki MSCs izolowane ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej mają porównywalny potencjał do regeneracji mięśni gładkich w rekonstruowanym pęcherzu moczowym. Czynnikiem wpływającym krytycznie na zawartość włókien mięśniowych w rekonstruowanej ścianie pęcherza moczowego była natomiast liczba użytych komórek. W pęcherzach rekonstruowanych wszczepami wysianymi komórkami w większej gęstości (10×10^6 kom./cm²) zawartość tkanki mięśniowej była porównywalna do grupy kontrolnej, w przeciwieństwie do pęcherzy rekonstruowanych

wszczepami wysianymi komórkami w mniejszej gęstości (4×10^6 kom./cm²) oraz pęcherzy rekonstruowanych samymi rusztowaniami SIS, w których obserwowano odpowiednio dwukrotnie lub pięciokrotnie niższą zawartość tkanki mięśniowej w porównaniu z grupą kontrolną. Układ włókien mięśniowych w rekonstruowanych pęcherzach moczowych niezależnie od źródła i liczby użytych komórek, był chaotyczny i nie przypominał uporządkowanej struktury obserwowanej w prawidłowym pęcherzu moczowym. W pęcherzach rekonstruowanych matrycami SIS bez komórek obserwowano włóknienie. Analiza molekularna techniką PCR w czasie rzeczywistym wykazała natomiast wyższą ekspresję markerów tkanki mięśniowej w tym: łańcucha ciężkiego miozyny, kaldesmonu i winkuliny w pęcherzach rekonstruowanych rusztowaniami SIS wysianymi komórkami ADSCs w porównaniu z pęcherzami rekonstruowanymi rusztowaniami SIS wysianymi komórkami BM-SCs, jednakże ekspresja tych markerów była niższa odpowiednio o ~60, 30 i 20% w porównaniu z grupą kontrolną. Nie obserwowano natomiast różnic w ekspresji desminy, transgeliny, kalponiny i smootheliny w zależności od użytego źródła komórek. Należy podkreślić, że ekspresja markerów tkanki mięśniowej w pęcherzach rekonstruowanych rusztowaniami SIS wysianymi komórkami macierzystymi w mniejszej gęstości (4×10^6 kom./cm²) była porównywalna z ekspresją w pęcherzach rekonstruowanych matrycami SIS bez komórek.

Podsumowując, praca ta jest pierwszą publikacją, która dowiodła, że liczba komórek użytych do rekonstrukcji pęcherza moczowego wpływa krytycznie na wynik regeneracji. Mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej charakteryzują się porównywalnym potencjałem do regeneracji tkanki mięśniowej rekonstruowanego pęcherza moczowego. Zarówno tkanka tłuszczowa jak i szpik kostny mogą być potencjalnie wykorzystywane jako źródło komórek do operacji odtwórczych dróg moczowych.

4.3.3. PODSUMOWANIE

Przedstawione do recenzji osiągnięcie naukowe dotyczy rekonstrukcji pęcherza moczowego z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej i składa się z 7 wybranych publikacji naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania IF= 16.669 i 175.000 pkt. wg MNiSW. Na tle aktualnego stanu wiedzy podjęte przeze mnie badania są innowacyjne, oryginalne i ważne dla opracowania nowych metod rekonstrukcji pęcherza moczowego.

Za elementy nowości naukowej i najważniejsze osiągnięcia o charakterze praktycznym należy zawarte w monotematycznym cyklu prac pt. „Rekonstrukcja pęcherza moczowego technikami inżynierii tkankowej, badania eksperymentalne” należy uznać:

1. scharakteryzowanie właściwości nowego rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu w warunkach *in vivo* (praca 2),
2. zastosowanie nowych biomateriałów w rekonstrukcji pęcherza moczowego w tym pięciowarstwowego rusztowania z poli-laktydo-ko-kaprolaktonu oraz biokompozytu z błony owodniowej i poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (prace 3 i 4),
3. wykazanie, że mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej i szpiku kostnego mają porównywalny potencjał do regeneracji warstwy mięśniowej rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego i mogą mieć zastosowanie u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (praca 7),
4. wykazanie, że liczba komórek macierzystych krytycznie wpływa na wynik regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego, gęstość komórek macierzystych wysiewanych na biomateriałach stosowanych do rekonstrukcji pęcherza moczowego powinna wynosić co najmniej 10×10^6 komórek/cm² (praca 7),
5. opracowanie wydajnych i powtarzalnych metod izolacji i hodowli komórek mięśni gładkich i nabłonka urotelialnego do celów medycyny regeneracyjnej w urologii, które mogą mieć zastosowanie u pacjentów nieonkologicznych (prace 5 i 6).

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO- BADAWCZYCH

Poza omówionym powyżej cyklem 7 publikacji wybranych jako podstawa do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego w skład mojego dotychczasowego dorobku naukowego wchodzi 46 innych publikacji naukowych w tym 22 prace oryginalne, 19 prac poglądowych oraz 5 rozdziałów w podręcznikach o łącznej wartości 78.102 IF oraz 758.000 pkt. wg MNiSW, w tym 9 publikacji o łącznej wartości 19.427 IF i 200.000 pkt. wg MNiSW jako pierwszy autor.

5.1 OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką 17 publikacji naukowych o łącznej wartości 8.443 IF i 117.000 pkt. wg MNiSW i 12 doniesień zjazdowych.

Pracę naukową rozpoczęłam w roku 2005 w Studenckim Kole Naukowym Inżynierii Tkankowej przy Katedrze Biologii Medycznej pod kierunkiem dr Tomasza Drewy. Moje pierwsze badania dotyczyły izolacji i hodowli wysp trzustkowych. Zagadnienia te były również przedmiotem moich prac licencjackiej i magisterskiej, a ich efektem były dwie publikacje naukowe, w których przedstawiono aspekty izolacji i hodowli wysp trzustkowych (Med. Biol. Sci, 2008; 22: 65-69; Pol. Merkuriusz. Lek, 2008; 25: 240-243). Po obronie pracy licencjackiej zatrudniona zostałam na stanowisku technika (lata 2005-2007), a po obronie pracy magisterskiej na stanowisku asystenta (lata 2007-2012) w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

W okresie tym odbyłam również dwa staże naukowe na Uniwersytecie Louvain (Belgia) u dr. Denis Dufrane oraz na Uniwersytecie Miami (USA) u prof. Camillo Ricordi. Przedmiotem badań prowadzonych w ramach ww. staży było opanowanie technik izolacji i hodowli ludzkich wysp trzustkowych oraz ich zastosowanie w leczeniu cukrzycy typu I. Studia ukończyłam z tytułem Najlepszego Absolwenta Collegium Medicum, a za wybitne osiągnięcia naukowe otrzymałam stypendium Ministra Zdrowia. Po obronie pracy magisterskiej odbyłam kolejny staż w Instytucie Medycyny Klinicznej i Eksperymentalnej w Pradze (Czechy) u prof. Frantisek Saudek.

W kolejnych latach brałam udział w realizacji projektu naukowego dr Rafała Czajkowskiego dotyczącego izolacji i hodowli melanocytów ludzkich. Badania te miały na celu ocenę bezpieczeństwa hodowli melanocytów ludzkich *in vitro* celem możliwości ich późniejszej transplantacji pacjentom z bielactwem nabytym. Oceniano wpływ długotrwałej hodowli melanocytów w różnych mediach hodowlanych na ryzyko wystąpienia mutacji w genach *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* (Cell Transplant, 2010; 19: 639-43). Celem prowadzonych badań była również ocena roli mutacji w genach *BRAF*, *NRAS* i *HRAS* w patogenezie czerniaka ludzkiego (Przegl. Dermatol, 2009; 96: 265-270).

Kolejnym i zasadniczym etapem mojej pracy było rozpoczęcie badań nad zastosowaniem technik inżynierii tkankowej w urologii. Prace te od samego początku koncentrowały się na rekonstrukcji pęcherza moczowego. Obejmowały zagadnienia związane z doбором optymalnego typu komórek i rodzaju biomateriału oraz poznaniu molekularnych podstaw procesu regeneracji (Transplant Proc, 2009; 41: 4345-51; Central Eur J Urol, 2011; 64: 87-9). Badania nad zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego

w regeneracji rekonstruowanego pęcherza moczowego stały się przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

Pracę doktorską pt.: „Rola komórek macierzystych w remodelingu rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego szczura”, wykonaną pod kierunkiem prof. Tomasza Drewy obroniłam dnia 30 listopada 2011 r. Uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, dnia 14 grudnia 2011 r. uzyskałam stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Z wyników badań przedstawionych w pracy doktorskiej powstała publikacja naukowa wydana w czasopiśmie *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* (Arch. Immunol. Ther. Exp, 2013; 61: 483-93). Wyniki pracy doktorskiej zostały ogłoszone na 4 kongresach naukowych Polskiego i Europejskiego Towarzystwa Urologicznego i uhonorowane, Pierwszą Nagrodą Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Urologicznego (Bydgoszcz, 2010), Pierwszą Nagrodą Karl Storz (Ryga, 2010) oraz uznane za Najlepszą Pracę Sesji „Nauki Podstawowe i Inżynieria Tkankowa” (Wiedeń, 2011). Praca doktorska była też punktem wyjścia do kolejnych badań nad poznaniem molekularnych podstaw procesu gojenia w rekonstruowanym technikami inżynierii tkankowej pęcherzu moczowym.

5.2 OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Po nadaniu stopnia naukowego doktora nauk medycznych poza publikacjami stanowiącymi podstawę osiągnięcia habilitacyjnego byłam współautorką 29 publikacji naukowych o łącznej wartości 69.659 IF i 641.000 pkt. wg MNiSW i 59 doniesień zjazdowych.

W kwietniu 2012 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, a od listopada 2015 roku pełnię obowiązki Kierownika Zakładu Medycyny Regeneracyjnej (obecnie Zakładu Medycyny Regeneracyjnej, Banku Komórek i Tkanek). W 2016 roku odbyłam staż podoktorski w Instytucie Leczenia Cukrzycy (Diabetes Research Institute, Miami, USA) i Interdyscyplinarnym Instytucie Komórek Macierzystych (Miami, USA).

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk medycznych moje główne zainteresowania i tematyka badawcza nadal dotyczyły rekonstrukcji pęcherza moczowego, czego efektem jest stanowiący podstawę osiągnięcia habilitacyjnego cykl prac oraz wyniki opisanych poniżej projektów badawczych. Poza 7 publikacjami włączonymi do osiągnięcia naukowego powstało wiele

innych dotyczących zastosowania medycyny regeneracyjnej w urologii (Transplant Proc. 2012; 44:1439-41; J. Artif. Organs, 2014; 17:123-134; Med. Hypotheses, 2014; 82: 670-673; PlosOne 2014; 9: e106023; Central Eur. J. Urol. 2015; 68: 109-114; Med. Hypotheses, 2015; 84, 344-349; Arch. Med. Sci. 2016; 2: 1158-1173; Expert Opin. Biol. Ther. 2016; 16: 233-42).

W kierowanym przeze mnie projekcie badawczym pt. „Poznanie procesu gojenia pęcherza moczowego drogą do jego regeneracji” finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata IV, analizowałam molekularne podstawy procesu gojenia w rekonstruowanym technikami inżynierii tkankowej pęcherzu moczowym. Głównym założeniem projektu była szczegółowa szerokogenomowa analiza ekspresji genów w pęcherzach gojących się poprzez regenerację (rekonstruowanych przy pomocy matryc wysianych komórkami macierzystymi) i naprawę (rekonstruowanych przy pomocy samych matryc), a następnie wyodrębnienie czynników odgrywających kluczową rolę w procesie regeneracji i naprawy (reparacji).

Przeprowadzone w ramach projektu badania dowiodły, że:

1. Komórki macierzyste indukują zmianę sposobu gojenia w rekonstruowanych pęcherzach moczowych z naprawy na regenerację. Procesowi temu towarzyszy zmiana ekspresji zidentyfikowanych w tym badaniu setek genów należących do różnych szlaków molekularnych.
2. Komórki macierzyste modulują środowisko immunologiczne w rekonstruowanych pęcherzach moczowych.
3. Bezbliźnowe gojenie się pęcherzy rekonstruowanych matrycami wysianymi komórkami macierzystymi może być wynikiem wyciszenia odpowiedzi immunologicznej.
4. Komórki macierzyste obniżają ekspresję genów szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za odrzucenie wszczepu w rekonstruowanym pęcherzu moczowym.
5. Komórki macierzyste stymulują wzrost ekspresji genów szlaków sygnałowych regulujących organogenezę: Hedgehog, Wnt, TGF- β , Delta-Noch. Aktywacja tych szlaków może być kluczowa dla zainicjowania procesu regeneracji w rekonstruowanych pęcherzach moczowych.

Zidentyfikowane ścieżki sygnałowe będą podstawą do dalszych badań nad tzw. indukowaną regeneracją pęcherza moczowego, których celem jest skierowanie procesu gojenia z naprawy na regenerację poprzez wzbudzenie ekspresji określonych genów.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tego grantu zostały wygłoszone na 5 kongresach naukowych Polskiego i Europejskiego Towarzystwa Naukowego i uhonorowane Pierwszą Nagrodą Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Urologicznego (Katowice, 2016). Publikacje naukowe będące wynikiem przeprowadzonych badań znajdują się w recenzjach.

W innym kierowanym przeze mnie projekcie badawczym pt.: „Rola komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego świni” (MNiSW, Iuventus Plus IV) poszukiwałam odpowiedzi na pytanie w jaki sposób komórki macierzyste stymulują regenerację rekonstruowanego pęcherza moczowego. Przeprowadzone w ramach projektu badania dowiodły, że:

1. Tkanka tłuszczowa jest dobrym źródłem komórek do rekonstrukcji ściany pęcherza moczowego. Wyniki te są szczególnie istotne z punktu widzenia możliwości wytworzenia pęcherza moczowego dla pacjentów onkologicznych, u których nie można wykorzystać komórek pęcherza moczowego do celów rekonstrukcyjnych ze względu na ryzyko przeniesienia choroby nowotworowej.
2. Rusztowanie kolagenowe wytworzone ze ściany pęcherza moczowego wysiane komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej pozwala na regenerację dużych, klinicznie istotnych ubytków ściany pęcherza moczowego.
3. Komórki macierzyste stymulują regenerację rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego pośrednio stanowiąc źródło czynników troficznych.
4. Tylko niewielki odsetek wszczepionych komórek wspomaga regenerację rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego bezpośrednio różnicując się w komórki mięśni gładkich i naczyń krwionośnych.

Wyniki przeprowadzonego badania stanowią solidną podstawę do dalszych badań nad regeneracją pęcherza moczowego, których efektem końcowym będzie skonstruowanie pęcherza moczowego człowieka.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tego grantu zostały wygłoszone na 2 kongresach naukowych i uhonorowane wyróżnieniem Najlepsza praca sesji Nauki Podstawowe w Urologii w czasie Rocznego Kongresu Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (Londyn, 2017). Publikacje naukowe będące wynikiem przeprowadzonych badań znajdują się w recenzjach.

W trzecim realizowanym obecnie projekcie badawczym, pn. "Nowoczesne protezy odprowadzające mocz dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego poddanych bezkontaktowym minimalnie inwazyjnym operacjom onkologicznym wycięcia pęcherza moczowego" finansowanym ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu STRATEGMED I, pracuję nad konstrukcją sztucznej wstawki do odprowadzenia moczu. Projekt realizowany jest przez konsorcjum naukowe SmartAUCI. W projekcie tym pełnię funkcję lidera zespołu naukowego Collegium Medicum i odpowiadam za przygotowanie i kontrolę jakości produktu leczniczego terapii zaawansowanej- sztucznej wstawki wysianej komórkami.

Drugim kierunkiem prowadzonych przeze mnie obecnie badań są zagadnienia związane z transplantacją komórek produkujących insulinę w leczeniu cukrzycy typu I. Przeprowadzone do tej pory badania dotyczyły możliwości różnicowania komórek macierzystych w komórki produkujące insulinę oraz wpływu diety na czynność izolowanych wysp trzustkowych (Arch Immunol Ther Exp, 2013; 61: 149-58; Arch Immunol Ther Exp, 2015; 63: 377-384; Pancreas, 2014; 43: 801-808). Efektem współpracy z Instytutem Badań nad Cukrzycą (Diabetes Research Institute, DRI, Miami, USA) są dwie publikacje dotyczące transplantacji wysp trzustkowych w leczeniu cukrzycy typu I (Nature Rev Endocrinol, 2017; 13, 268-277; CellR4, 2016; 4: e2128).

Nowym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań jest zastosowanie produktów inżynierii tkankowej w dermatologii estetycznej i chirurgii plastycznej. Przeprowadzone do tej pory badania dotyczyły możliwości zastosowania nowych biomateriałów w rekonstrukcji powłok brzusznych (Biomed Res Int. 2015;2015:890613), zastosowania wypełniaczy wzbogaconych w komórki macierzyste (Aesthet Surg J. 2014; 34: 1261-9), oraz użycia komórek macierzystych do stymulacji procesu gojenia się ran (Biomed Res Int. 2016;2016:2505601).

Odrębne badania, która stanowią część mojego dorobku prowadzone były we współpracy z innymi jednostkami Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. We współpracy z Wydziałem Chemii powstały prace dotyczące: nowych kompozytów kolagenu, chitozanu i kwasu hialuronowego (Int J Biol Macromol. 2016; 89, 442-448) oraz nowego systemu dostarczania leków antynowotworowych, z wykorzystaniem nanorurek połączonych z przeciwciałami anti-CD133 lub cisplatyną (Oncotarget. 2015; 6: 22776-98; Biomed Pharmacother. 2015; 69:349-54). W wyniku współpracy z Wydziałem Chemicznym Politechniki Gdańskiej powstała praca dotycząca poliuretanów modyfikowanych kwasem askorbinowym (React. Funct. Polym. 2015; 97, 105-115).

6. PLANY BADAWCZE NA PRZYSZŁOŚĆ

Moja przyszła działalność naukowa koncentrować się będzie głównie na wprowadzeniu stosowanych technik inżynierii tkankowej do praktyki klinicznej. W kwietniu 2017 r. Zakład Medycyny Regeneracyjnej przeniesiono do nowej siedziby, w której utworzono laboratoria czyste typu Clean Room do izolacji i hodowli komórek ludzkich do celów transplantacji. W laboratoriach tych przygotowywane będą wszczepy do celów rekonstrukcyjnych w urologii w tym: wstawki do odprowadzenia moczu oraz wszczepy do rekonstrukcji pęcherzy moczowych. Rozpocznie się również program kliniczny transplantacji wysp trzustkowych. W 2016 r. za moim pośrednictwem Uniwersytet Mikołaja Kopernika podpisał umowę współpracy z Instytutem Badań nad Cukrzycą (Diabetes Research Institute, DRI) w USA pod kierunkiem, którego będę wdrażać program transplantacji wysp trzustkowych w Polsce.

7. PIŚMIENICTWO CYTOWANE WE WSTĘPIE

Abol-Eneim H, Ghoneim MA. Continent cutaneous diversion: ileum, w Reconstructive Urologic Surgery, red. Montague DK, Gill IS, Angermeier KW, Ross JH, Informa UK, Ltd. 2008; 369-374.

Adamowicz J, Kloskowski T, Tworkiewicz J, Pokrywczyńska M, Drewa T. Urine is a highly cytotoxic agent: does it influence stem cell therapies in urology? Transplant Proc. 2012; 44: 1439-41.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. Lancet. 2006; 367: 1241-6.

Cho A, Lee SM, Noh JW, Choi DK, Lee Y, Cho ST, Kim KK, Lee YG, Lee YK. Acid-base disorders after orthotopic bladder replacement: comparison of an ileal neobladder and an ileal conduit. Ren Fail. 2017; 39: 379-384

Dhar NB, Studer UE. Ileal orthotopic bladder substitution w Reconstructive Urologic Surgery, red. Montague DK, Gill IS, Angermeier KW, Ross JH, Informa UK, Ltd. 2008;319-324.

Drewa T, Chlost P, Czajkowski R. Will tissue-engineered urinary bladders change indications for a laparoscopic cystectomy? Surg Innov. 2010; 17: 295-9.

Drewa T, Adamowicz J, Sharma A. Tissue engineering for the oncologic urinary bladder. Nat Rev Urol. 2012; 9: 561-72.

Hautmann RE. Ileal neobladder, w w Reconstructive Urologic Surgery, red. Montague DK, Gill IS, Angermeier KW, Ross JH, Informa UK, Ltd. 2008;311-318.

Joseph DB, Borer JG, De Filippo RE, Hodges SJ, McLorie GA. Autologous cell seeded biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: phase II study in children and adolescents with spina bifida. *J Urol*. 2014; 191: 1389-95.

Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1113-25.

Patel AR, Fergany A. Supravesical urinary diversion: conduits, w *Reconstructive Urologic Surgery*. red. Montague DK, Gill IS, Angermeier KW, Ross JH, Informa UK, Ltd. 2008;358-368.

Pickard R. Tumour formation within intestinal segments transposed to the urinary tract. *World J Urol*. 2004; 22: 227-34.

Pokrywczynska M, Jundzill A, Bodnar M, Adamowicz J, Tworkiewicz J, Szyłberg L, Debski R, Marszałek A, Drewa T. Do mesenchymal stem cells modulate the milieu of reconstructed bladder wall? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013; 61: 483-93.

Reyblat P, Ginsberg DA. Augmentation cystoplasty: what are the indications? *Curr Urol Rep*. 2008; 9: 452-8.

Roosen A, Gerharz EW, Roth S, Woodhouse CR. Bladder, bowel and bones--skeletal changes after intestinal urinary diversion. *World J Urol*. 2004; 22: 200-9.

Sillén U, Brandström P, Jodal U, Holmdahl G, Sandin A, Sjöberg I, Hansson S. The Swedish reflux trial in children: v. Bladder dysfunction. *J Urol*. 2010; 184: 298-304.

Smith JA Jr. Mucus production after transposition of intestinal segments into the urinary tract. *J Urol*. 2005;174:1860-1.

Tanrikut C, McDougal WS. Acid-base and electrolyte disorders after urinary diversion. *World J Urol*. 2004; 22: 168-71.

Woodhouse CR, Robertson WG. Urolithiasis in enterocystoplasties. *World J Urol*. 2004; 22: 215-21.

Wullt B, Agace W, Mansson W. Bladder, bowel and bugs-bacteriuria in patients with intestinal urinary diversion. *World J Urol*. 2004; 22: 186-95.

Zhang HC, Yang J, Ye X, Hu HF. Augmentation enterocystoplasty without reimplantation for patients with neurogenic bladder and vesicoureteral reflux. *Kaohsiung J Med Sci*. 2016; 32: 323-6

Bydgoszcz, dnia 25 lipca 2017 r.

Marta Pokrywczyńska

