

Załącznik 2

AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Dr n.biol KRZYSZTOF MARYCZ
UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WROCLAW 2014

- 1 -



1. Imię i nazwisko

Krzysztof Marycz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

W latach 1996-2000 uczęszczałem do Katolickiego Liceum Ogólnokształcącego w Legnicy im. św. Franciszka z Asyżu. Szkołę średnią ukończyłem z wyróżnieniem. W latach 1999 - 2000 otrzymywałem **stypendium naukowe Prezesa Rady Ministrów** za najwyższą średnią ocen końcowych wśród uczniów szkół średnich województwa dolnośląskiego.

W latach 2000 podjąłem studia na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej we Wrocławiu, uzyskując w 2005 roku tytuł magistra biologii stosowanej. W trakcie studiów brałem udział w pracach studenckiego koła naukowego medyków weterynaryjnych (SKN), na wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w sekcji anatomiczno-histologicznej.

W latach 2005-2008 przygotowywałem rozprawę doktorską dotyczącą zmian morfologicznych oraz ultrastrukturalnych komórek wątrobowych w różnych stanach fizjologicznych u żółwia czerwonołeciego (*Trachemys scripta elegans*). W lipcu 2008 obroniłem pracę doktorską zatytułowaną „Zmiany morfologiczne oraz ultrastrukturalne wątroby żółwia czerwonołeciego *Trachemys scripta elegans* po hibernacji” (promotor Prof. dr hab. Grzegorz Gabryś) i uzyskałem tytuł doktora nauk biologicznych na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Aktualnie: adiunkt w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Kierownik Pracowni Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt - Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Kierownik zadania badawczego nr 5.2 we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ we Wrocławiu.



2005-2008: specjalista w Pracowni Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z np. 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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Dane ogólne: Mój dorobek naukowy obejmuje **44** oryginalne prace naukowe, w tym **37** znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) oraz **14** doniesień konferencyjnych o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* (IF) wszystkich prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, zgodnie z datą opublikowania, wynosi **33, 682** a suma punktów według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (z dnia 20 grudnia 2013) wynosi **713**. Całkowita liczba cytowań wszystkich prac w bazie Web of Science wynosi 29, a Indeks Hirscha 3.

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą złożonego przeze mnie wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego jest cykl sześciu publikacji pod wspólnym tytułem: „**Ocena potencjału regeneracyjnego ASCs (Adipose stem cells) oraz badanie ich interakcji z wybranymi materiałami implantacyjnymi**”. Łączna wartość bibliometryczna publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi: współczynnik oddziaływania (IF) - 8,376 oraz MNiSW- 180.

a. (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

- 3.1 **Marycz K.**, Grzesiak J., Wrzeszcz K., Golonka P.: „*Adipose stem cell combined with plasma-based implant bone tissue differentiation in vitro and in horse with phalanx digitalis distalis fracture: case report*” (2012) *Veterinaria Medicina* 57:610-617. (IF=0,679; MNiSW=25)
- 3.2 **Marycz K.**, Śmieszek A., Grzesiak J., Nicpoń J.: „*Effects of steroids on the morphology and proliferation of canine and equine mesenchymal stem cells of adipose origin – in vitro research*”. (2014) *Acta Veterinaria Hungarica*. 03/2014; 62(3). DOI: 10.1556/AVet.2014.001 (IF=1,173; MNiSW=25)
- 3.3 **Marycz K.**, Nezir T., Śmieszek A., Nicpoń J.: „*The morphology and proliferation rate of canine and equine adipose derived mesenchymal stem cells*”



cultured with Flunixin Meglumine- in vitro". (2014) Kafkas Univ Vet Fak Derg
DOI: 10.9775/kvfd.2013.9799 (IF=0, 429; MNiSW=15)

- 3.4 **Marycz K., Śmieszek A., Grzesiak J., Donesz-Sikorska J., Krzak-Roś J.:** „*Application of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells for testing the biocompatibility of metal-based biomaterials functionalized with ascorbic acid*”. (2014) Biomedical Materials. 8065004 (12pp), doi:10.1088/1748-6041/8/6/065004 (IF=2,174; MNiSW=30)
- 3.5 **Marycz K., Szarek D, Grzesiak J, Wrzeszcz K.:** „*Influence of modified alginate hydrogels on mesenchymal stem cells and olfactory bulb-derived glial cells cultures*”. (2014) Bio-Medical Materials and Engineering 00 (2014) 1-13 DOI-10.3233/BME-140966 (IF=1,087; MNiSW=20)
- 3.6 **Marycz K., Krzak-Roś J., Donesz-Sikorska A., Śmieszek A.:** „*The morphology, proliferation rate and population doubling time factor of adipose derived mesenchymal stem cells cultured onto non-aqueous SiO₂, TiO₂ and hybrid sol-gel derived oxide coatings*.” (2014) Journal of Biomedical Materials Research: Part A DOI: 10.1088/1748-6041/8/6/065004 (IF=2,834; MNiSW=40)

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.1 „Wpływ aktywnych biologicznie czynników organicznych i nieorganicznych na morfologię, ultrastrukturę, aktywność cytofizjologiczną oraz potencjał regeneracyjny mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASCs- *Adipose Stromal Cells*)”.

4.1.1 Wstęp:

Medycyna regeneracyjna jest jedną z najszybciej rozwijających się gałęzi nauk medycznych, której nadrzędnym celem jest odbudowa uszkodzonych tkanek i/lub narządów, a przez to przywrócenie im utraconej funkcji fizjologicznej [1, 2, 3]. Miniona dekada przyniosła gwałtowny rozwój technologii biomedycznych z zastosowaniem komórek macierzystych [4]. Mogą to być komórki embrionalne, dojrzałe komórki somatyczne, oraz komórki somatyczne przeprogramowane w macierzyste – tzw. indukowane komórki pluripotenne (iPSCs - *Induced Pluripotent Stem Cells*).



W przypadku komórek embrionalnych, badania ograniczone są jednak aspektami etycznymi, natomiast komórki indukowane charakteryzują się właściwościami teratogennymi, zatem najbardziej wskazane do badań w zakresie medycyny regeneracyjnej są mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs - *Mesenchymal Stem Cells*) lub opisane stosunkowo niedawno małe komórki pluripotenne (VSELs - *Very Small Embryonic Like Stem Cells*) [5]. Występują one w dojrzałych tkankach, a dzięki zdolnościom do samoodnowy zapewniają ciągłą wymianę komórek, które utraciły swoje pierwotne funkcje fizjologiczne. Komórki mezenchymalne charakteryzują się wysoką zdolnością do adhezji oraz proliferacji w hodowlach *in vitro*, zaś procesy mające na celu zwiększenie populacji MSCs – namnażanie nawet do 8 pasaży, nie mają wpływu na potencjał regeneracyjny tychże komórek. Dodatkowo, MSCs charakteryzują się wysoką plastycznością. Termin ten oznacza, iż wykazują one zdolności do różnicowania się w komórki innych tkanek np. osteoblasty, chondrocyty czy też mioocyty. Cechy te skłaniają badaczy do podejmowania prób wykorzystania MSCs w protezowaniu ubytków tkanek (np. nadżerki chrząstki, ubytki krytyczne kości, zawał mięśnia sercowego) [6, 7, 8, 9].

Możliwość pozaustrojowego namnażania MSCs pozwala z niewielkiej populacji komórek pozyskać odpowiednią pulę do aplikacji klinicznej, zachowując przy tym zalecenia *International Society of Cellular Therapy* [13, 14]. Wykorzystanie potencjału MSCs do adhezji, proliferacji i różnicowania w kontekście inżynierii biomateriałów jest podejściem, które może istotnie wpłynąć na proces regeneracyjny – zarówno skracając czas jego trwania jak i determinując odtworzenie funkcjonalnego narządu [10, 11, 12]. Komórki mezenchymalne dodatkowo pełnią funkcje odżywcze (np. podścielisko szpiku kostnego) jak również odgrywają istotną rolę immunomodulującą (np. regulując działanie makrofagów). Profil wydzielanych przez MSCs czynników działających immunosupresyjnie (zwłaszcza na limfocyty T), przy równocześnie niskim poziomie ekspresji kompleksu MHC klasy II, stwarza możliwość zastosowania MSCs w przeszczepach allogenicznych bez ryzyka odrzutu [15]. Najważniejszą jednak cechą MSCs jest ich zdolność do podjęcia regeneracji uszkodzonych tkanek [16, 17, 18, 19]. Proces ten, z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych odbywa się *inter alia* poprzez usprawnienie przekazywania sygnałów międzykomórkowych.



Oddziaływanie za pomocą mechanizmów parakrynych oraz/lub autokrynych pomiędzy komórkami przeszczepianymi a macierzą tkankową, do której zostają one wprowadzone, istotnie wpływa na przebieg odbudowy uszkodzonych tkanek. Komórki mezenchymalne syntezują i wydzielają mikropęcherzyki (mMVS – *mesenchymal microvesicles*), zawierające szereg czynników wzrostu m.in. czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF – *Fibroblast Growth Factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu typu - I (IGF-1 – *Insulin-like Growth Factor-1*), białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) oraz białka morfogenetyczne kości (BMPs – *Bone Morphogenetic Proteins*). Wymienione białka odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów regeneracyjnych, a niektóre w regulacji odpowiedzi immunologicznej [20]. Mikropecherzyki zawierają również szereg bioaktywnych lipidów takich jak np. fosforan-sfingozyny (S1P) oraz mogą przenosić pomiędzy komórkami mRNA i miRNA.

Pierwszą populacją komórek macierzystych opisaną w literaturze były komórki izolowane ze szpiku kostnego (BM-MSCs – *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego są uznawane za potencjalne komórki progenitorowe dla osteoblastów, chondroblastów, adipocytów oraz mięśni szkieletowych [5, 6]. Wykazano także, iż komórki te mogą różnicować się w niektóre komórki linii ektodermalnej np. komórki gleju czy keratynocyty. [7, 8] Komórki BM-MSCs wykazują ekspresję następujących antygenów powierzchniowych: CD73, CD90, CD105 oraz nie wykazują ekspresji antygenów hematopoetycznych. Rutynowo BM-MSCs izolowane są z podścieliska szpiku kostnego, najczęściej z talerza biodrowego a u zwierząt z mostka. Stanowią one zaledwie od 0,01 do 0,0001% jednojądrzastych komórek szpiku kostnego, a ich liczba maleje wraz ze wzrostem wieku organizmu [9, 10]. Każdorazowe pobranie szpiku kostnego wiąże się z koniecznością znieczulenia rdzeniowego lub ogólnego (a co najmniej miejscowego) oraz ryzykiem infekcji pooperacyjnej. Dodatkowo niewielka ilość pozyskiwanych MSCs ze szpiku kostnego w konsekwencji przekłada się na konieczność prowadzenia dłuższych hodowli *ex vivo*, co w istotny sposób skutkuje spadkiem tempa ich proliferacji. Dlatego też, Badacze skupiają swoją uwagę na ocenie potencjału regeneracyjnego komórek mezenchymalnych



izolowanych z podskórnej tkanki tłuszczowej (ASCs – *Adipose Stem Cells*). Podobnie jak w przypadku szpiku kostnego, tkanka tłuszczowa ma pochodzenie mezodermalne oraz zawiera heterogenną populację komórek zrębu [3, 5, 8]. Komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej charakteryzuje ekspresja podobnych antygenów powierzchniowych jak w przypadku BM-MSCs, wyróżnia je natomiast obecność markera CD49d oraz brak markera CD106. Komórki ASCs wykazują zdolność do indukcji między innymi w komórki tkanki kostnej czy też chrzęstnej. Wysoka plastyczność tej populacji MSCs, jak również wysoka dostępność tkanki tłuszczowej tj. źródła tychże komórek, czyni je doskonałym narzędziem terapeutycznym w protezowaniu ubytków min. tkanki kostnej [5, 8].

4.1.2 Morfologia, ultrastruktura oraz potencjał regeneracyjny mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASCs).

Ocena morfologii oraz ultrastruktury mezenchymalnych komórek macierzystych na różnych poziomach organizacji dostarcza cennych informacji z zakresu ich własności cytofizjologicznych, a tym samym stanowi pierwszy etap badania potencjału regeneracyjnego. Opisanie prawidłowej morfologii takich komórek w różnych stanach fizjologicznych było punktem wyjścia do oceny zmian morfologicznych komórek, propagowanych na wybranych biomateriałach. Planując zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASCs) w badaniach klinicznych u zwierząt, koniecznym była na tym etapie badań wnikliwa ocena ich morfologii, ultrastruktury oraz zachowanie się w warunkach *in vitro*. Pierwszy etap moich badań stanowił ocenę morfologii ASC pobranych od psów i koni. W badaniach tych zastosowałem techniki mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej, skaningowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej. W większości ocenianych obrazów, jądra komórkowe ASC izolowane od psów i koni lokalizowały się w centrum komórki ze sferycznie ułożonym jądrem komórkowym. Hodowle komórek ASC cechowały się prawidłowym rozkładem przestrzennym w warunkach *in vitro* i nie wykazywały tendencji do agregowania. Badania z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, EVO LS15, Zeiss) wykazały, że komórki te tworzą gęstą sieć połączeń międzykomórkowych. Dodatkowo, zaobserwowano charakterystycznie



układające się głównie na obwodzie badanych komórek pęcherzyki egzosomalne, świadczące o wysokiej aktywności cytofizjologicznej badanych komórek. Spostrzeżenie to dało podstawy, aby w dalszych etapach prac badawczych, przeprowadzać ocenę aktywności cytofizjologicznej komórek w oparciu o analizę mikropęcherzyków pochodzących z tych komórek (mMVs – mesenchymal microvesicles). Kolejnym parametrem wykorzystywanym do oceny potencjału regeneracyjnego ASCs był stopień wykształcenia cytoszkieletu komórkowego. Analiza w tym zakresie wykazała, że ASCs charakteryzują się regularną organizacją białek cytoszkieletu, co zasadniczo było wyjściowym parametrem w ocenie cytotoxycywności biomateriałów.

Badania z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, wykazały iż jądro komórkowe lokalizuje się centralnie, zajmując znaczną część komórki, zaś jąderka są rozmieszczone sferycznie. Wysoki stosunek pola powierzchni jądra komórkowego do cytoplazmy wskazuje na duży potencjał komórek do podziałów, pośrednio zaś na znaczący potencjał regeneracyjny. Analiza ultrastrukturalna potwierdziła również wyniki badań morfologicznych w zakresie topografii mikropęcherzyków (mMVS) w obrębie badanych komórek. Układają się one głównie na obwodzie komórki tworząc charakterystyczne, struktury pęcherzykowe. Badanie ultrastrukturalne w zakresie oceny stopnia wytwarzania połączeń międzykomórkowych w obrębie macierzy tkankowej wykazały, że ASC wytwarzają rozbudowaną, gęstą sieć połączeń międzykomórkowych. Zjawisko powstawania połączeń międzykomórkowych, w kontekście dalszych badań biomateriałowych, odgrywa istotną rolę w ocenie cytobiokompatybilności materiałów mogących znaleźć zastosowanie w medycynie rekonstrukcyjnej. Komórki mezenchymalne, po wyizolowaniu z tkanki, pozbawione zostają swojej naturalnej macierzy zewnątrzkomórkowej, która zapewnia im możliwość *homingu* tkankowego jak również pozwala na przestrzenny wzrost. Z tego też powodu, kluczowym było zgromadzenie jak największej ilości danych dotyczących cytofizjologii komórek hodowanych w warunkach kontrolnych, w celu jednoznacznej interpretacji właściwości komórek z wybranymi czynnikami bioaktywnymi oraz biomateriałami.

Opracowanie modelu badania aktywności cytofizjologicznej komórek mezenchymalnych w hodowli *in vitro* pozwoliło na zbadanie odpowiedzi komórkowej ASC w warunkach



ich stymulacji określonymi substancjami czynnymi. Do takich zaliczyć można między innymi sterydowe (SAIDs – *Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) i niesterydowe leki przeciwzapalne (NSAIDs - *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) oraz materiały metaliczne, biodegradowalne oraz funkcjonalizowane.

4.1.3 Odpowiedź komórkowa ASC, na sterydowe (SAIDs) oraz niesterydowe leki przeciw zapalne (NSAIDs).

Schorzenia aparatu ruchu, małych jak i dużych zwierząt, rodzą konieczność poszukiwania nowatorskich, a zarazem skutecznych strategii terapeutycznych. Jak podaje *National Animal Health Monitoring Systems Programme*, ponad 20% populacji wszystkich psów, tylko na terytorium Stanów Zjednoczonych Ameryki (USA), cierpi na chroniczne zapalenie i zwyrodnienia stawów (OA - *Osteoarthritis* /DJD – *Degenerative Joint Disease*) [21, 22]. Na fakt ten składa się kilka czynników. Do najważniejszych zaliczamy predyspozycje genetyczne wybranych ras psów, urazy mechaniczne oraz zbyt intensywną aktywność ruchową. Z kolei uszkodzenia aparatu ruchu u koni, wynikają głównie z nieprawidłowego ich użytkowania i/lub są skutkiem powikłań we wcześniejszym leczeniu. Mając na uwadze powyższe, oraz plany klinicznego zastosowania ASC, postanowiłem w pierwszej kolejności poddać ocenie wpływ rutynowo stosowanych leków sterydowych (*Betametason/Depomedrol*) oraz niesterydowych (*Flunixin meglumine*) na morfologię, ultrastrukturę oraz aktywność cytofizjologiczną komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej. Leki sterydowe stosowane są jako terapia z wyboru zarówno u małych jak i dużych zwierząt w leczeniu schorzeń układu kostno-stawowego. Wiadomo jednak, że długotrwałe stosowanie tych medykamentów może prowadzić do licznych efektów ubocznych, takich jak zespół Cushinga, zanik mięśni, hepatopatia, lub owrzodzenia błony śluzowej żołądka [23]. Z drugiej jednak strony, wyniki badań niektórych autorów wskazują na pozytywne efekty terapii sterydowej, na przykład podwyższony poziom testosteronu u ogierów kryjących lub wzrost liczby czerwonych krwinek. W zaburzeniach aparatu ruchu u zwierząt wpływ leków sterydowych ogranicza się do zmniejszenia bólu oraz częściowego hamowania postępu choroby. Dlatego też, zastosowanie autologicznych komórek



macierzystych jest naturalną alternatywą dającą szansę na regenerację zniszczonych tkanek, a tym samym odzyskanie utraconej sprawności fizycznej. Jednak w okresie poprzedzającym aplikację ASCs w celu min. złagodzenia bólu rutynowo stosuje się leki sterydowe jak i niesterydowe. W związku z tym, postanowiłem zbadać odpowiedź komórkową ASCs zarówno na leki sterydowe jak i niesterydowe leki przeciwzapalne w celu określenia ich wpływu na właściwości cytofizjologiczne ASCs. W tej części badań, skupiłem się również na określeniu odpowiedniego stężenia obu grup leków, które stymulowałyby ASCs do wzmożonej proliferacji. Odpowiednie podawanie leków sterydowych bądź niesterydowych w łączonej terapii komórkowej może skutkować znaczną stymulacją ASC do proliferacji, a przez to dawać lepszy efekt kliniczny.

Przeprowadzone badania wykazały pozytywny efekt działania Betametazonu w dawce 0,01 mg/ml oraz 0,1 mg/ml na tempo proliferacji EqASC (*Equine Adipose Stem Cells*), podczas gdy CaASC (*Canine Adipose Stem Cells*) charakteryzowały się niemal dwukrotnie niższym tempem proliferacji. Dodatek z kolei Depomedrolu w hodowli EqASC oraz CaASC w dawce 0,01 mg/ml oraz 0,1 mg/ml skutkowała podwyższonym tempem proliferacji komórek ASC obu badanych gatunków. Wyższe stężenia (1 mg/ml) zarówno Bethametazonu oraz Depomedrolu wywierały cytotoksyczny efekt na EqASC oraz CaASC. Komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej psa i konia, hodowane w obecności obu leków o stężeniach 0,01 i 0,1 mg/ml, nie wykazywały zmian morfologicznych w trakcie siedmiu dni prowadzonego doświadczenia. Obraz taki utrzymywał się we wszystkich konfiguracjach prowadzonego doświadczenia, za wyjątkiem hodowli EqASC w obecności metyloprednizolonu. W tym przypadku, po pięciu dniach hodowli, zaobserwowałem tworzenie się licznych ciał apoptotycznych oraz nieprawidłowy wzrost komórek. Najwyższa dawka leków stosowanych w badaniu (1 mg/ml) indukowała znacznego stopnia zmiany morfologiczne w obu badanych populacjach komórek, prowadząc do powstania apoptozy w prowadzonej hodowli. Komórki macierzyste izolowane od psów (CaASC) stymulowane Betametazonem w dawkach 0,01mg/ml oraz 0,1mg/ml utrzymywały prawidłowy, fibroblastopodobny morfotyp z dużym centralnie ulokowanym jądrem komórkowym. Wyższe stężenia badanego leku w konsekwencji prowadziły do istotnych zmian morfologicznych komórek



jak również miały silnie działanie cytotoksyczne. W prowadzonych hodowlach z podwyższoną dawką leku zaobserwowano wysoki odsetek komórek apoptotycznych zwłaszcza w piątym dniu hodowli. Oba badane leki, w stężeniach 0,1 mg/ml oraz 0,01 mg/ml poza pro-proliferacyjnym efektem działania istotnie stymulowały komórki EqASC oraz CaASC do wytwarzania cytonici komórkowych oraz sekrecji mikropęcherzyków (mMV). Wysoka sekrecja mMV w istotny sposób przekłada się na aktywność funkcjonalną ASCs wprowadzanych do środowiska tkanki, która utraciła swoją pierwotną funkcję fizjologiczną, a tym samym może wpływać na poprawę procesu regeneracji. Uzyskane wyniki pozwoliły opracować model oceny żywotności ASC oraz strategii stymulacji ASC mającej na celu podnieść ich aktywność cytofizjologiczną. Otrzymane dane są cenną wskazówką dla lekarzy klinicystów zajmujących się medycyną regeneracyjną z zastosowaniem komórek macierzystych. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie publikacji pt. *„Effects of steroids on the morphology and proliferation of canine and equine mesenchymal stem cells of adipose origin – in vitro research”* (2014) Acta Veterinaria Hungarica, 03/2014; 62(3). DOI: 10.1556/AVet.2014.001

Drugą grupą badanych leków były niesterydowe leki przeciwzapalne (NSAIDs) [23]. Są one powszechnie stosowane w medycynie weterynaryjnej w leczeniu min. stanów zapalnych oraz bólu zwłaszcza w okresie pooperacyjnym. Leki te są oficjalnie sklasyfikowane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO – *World Health Organisation*), jako terapia z wyboru [23]. Niesterydowe leki przeciwzapalne stosuje się również w leczeniu chorób zakaźnych, zaburzeniach mięśniowo-szkieletowych, a często również w przypadku leczenia obrzęków [24]. Niekwestionowaną zaletą NSAIDs jest możliwość relatywnie długotrwałego ich stosowania, dlatego też leki te znajdują często zastosowanie w leczeniu przewlekłych stanów zapalnych. Niektóre jednak doniesienia naukowe wskazują na wysokie ryzyko przedłużającego się stosowania NSAIDs, co może prowadzić do zaburzenia krzepnięcia krwi oraz/i wrzodów żołądka. Działanie leków niesterydowych opiera się na hamowaniu aktywności katalitycznej dwóch różnych izoenzymów cyklooksygenazy tj. COX-1 oraz COX-2, a przez to inhibowaniu syntezy mediatorów prozapalnych takich jak prostaglandyny (PGs – *Prostaglandins*) czy



tromboksany (TXs – *Thromboxanes*) [25, 26]. W drugiej części moich badań postanowiłem poddać ocenie morfologicznej, ultrastrukturalnej oraz funkcjonalnej ASC w hodowli z lekiem *Flunixin meglumine*. Jest to jeden z najczęściej stosowanym leków niesterydowych używanych w leczeniu układu kostno-stawowego u dużych i małych zwierząt. Przeprowadzone badania *in vitro* z zastosowaniem EqASC wykazały stymulujący efekt *Flunixin meglumine* w dawce 0,01 mg/ml na tempo proliferacji, utrzymujący się do ostatniego dnia hodowli. Komórki macierzyste izolowane od psów odpowiedziały inną dynamiką wzrostu na wprowadzony do hodowli lek. Tempo ich proliferacji gwałtownie wzrastało do 24h od rozpoczęcia testu, jednak w 120h odnotowano istotny spadek proliferacji CaASC. Dane te potwierdzają wyniki obliczonego, dla obu badanych populacji komórek, współczynnika podwojenia populacji (PDT – *Population Doubling Time*). W przypadku EqASC był on niższy od nie stymulowanej lekiem kontroli podczas gdy w przypadku CaASC był niemal dwukrotnie wyższy. Stężenie 0,1 mg/ml znacząco hamowało tempo proliferacji obu badanych populacji komórek macierzystych. Najwyższa dawka *Flunixin meglumine* (1 mg/ml) w obu badanych populacjach komórek wywoływała silny efekt cytotoksyczny skutkujący apoptozą w prowadzonej hodowli. Dane te korelują ze współczynnikiem podwojenia populacji, gdzie zaobserwowano nieznacznie niższy PDT w przypadku hodowli CaASC. Ocena morfologiczna komórek EqASC oraz CaASC propagowanych w hodowli *in vitro* z *Flunixin meglumine* wykazała, że w stężeniu 0,01mg/ml skutkowało zachowaniem fibroblasto-podobnego morfotypu obu badanych populacji komórek. Nie zaobserwowałem znamion degeneracyjnych hodowli w doświadczeniu prowadzonym z dodatkiem najniższego stężenia badanego leku. Wyższe stężenie (0.1mg/ml) powodowało równomierny rozkład komórek CaASC w prowadzonej hodowli. W przypadku EqASC zaobserwowałem nieznaczny stopień zmiany morfologiczne oraz pojawienie się w prowadzonej hodowli ciał apoptotycznych. Najwyższe stężenie *Flunixin meglumine* (1mg/ml) skutkowało pojawieniem się pojedynczych komórek apoptotycznych w obu badanych populacjach ASC. Uzyskane obserwacje morfologiczne oraz współczynnik proliferacji (PF – *Proliferation Factor*) korelowały z topografią mikropęcherzyków macierzystych na powierzchni badanych komórek. Najniższe stężenie



Flunixin meglumine skutkowało intensywną syntezą oraz obwodową sekrecją mMVS w przypadku CaASC, podczas gdy to samo stężenie wywoływało skąpą sekrecję mMVS w końskich ASC. Wyższe stężenia badanego leku nie stymulowały komórek do syntezy i sekrecji badanych mikro pęcherzyków. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, iż w terapii łączonej NSAIDs z komórkami macierzystymi izolowanymi od konia, najniższa (0,01mg/ml) i pośrednia (0.1mg/ml) dawka działały zarówno protekcyjnie jak i stymulująco. W przypadku, jednak CaASC tylko najniższa dawka charakteryzowała się podobnym efektem. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie publikacji pt. „*The Morphology and Proliferation Rate of Canine and Equine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured with Flunixin Meglumine-in vitro*”. (2014) Kafkas Univ Vet Fak Derg DOI: 10.9775/kvfd.2013.9799.

4.1.4 Wnioski:

Badania przeprowadzone w pierwszej części niniejszego opracowania dostarczają praktycznych informacji z zakresu wpływu wybranych leków sterydowych i niesterydowych na morfologię oraz aktywność cytofizjologiczną komórek macierzystych EqASC oraz CaASC. Uzyskane wyniki mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w praktyce kliniczno-weterynaryjnej w kontekście podawania wybranych leków w określonych dawkach w trakcie stosowania terapii z zastosowaniem autologicznych komórek macierzystych u dużych i małych zwierząt.

4.2 Biomateriały metaliczne syntezowane metodą zol-żel – ocena morfologii, ultrastruktury oraz potencjału ASC w regeneracji układu kostnego zwierząt.

Mezenchymalne komórki macierzyste są jednym z najważniejszych czynników zaangażowanych w procesy regeneracji uszkodzonych tkanek. W ostatnich latach, w ramach nowej gałęzi medycyny jaką jest medycyna regeneracyjna oraz w ramach inżynierii biomateriałowej poszukuje się odpowiednich strategii zarówno w odniesieniu do syntezy biomateriałów jak i zawieszania na ich powierzchni komórek macierzystych. Tak przygotowane implanty następnie przeszczepiane są w celu odbudowy uszkodzonych struktur tkankowych. Najbardziej powszechnymi materiałami metalicznymi stosowanymi w regeneracji tkanki kostnej małych i dużych zwierząt są materiały implantacyjne wykonane ze stali austenitycznej AISI 316L oraz stopu tytanu Ti6Al4V [27, 28].



Niekwestionowaną zaletą stopu AISI 316L jest akceptowalna biomechanika, jednak stale austenityczne charakteryzuje niesatysfakcjonująca biokompatybilność wynikająca z niskiej odporności na działanie płynów ustrojowych organizmu [27]. Z kolei implanty ze stopów tytanu charakteryzują się wysoką odpornością na korozję, jednak formująca się na powierzchni tego stopu naturalna ultra powłoka TiO_2 charakteryzuje się niską trwałością [28, 29]. Dlatego też, skłoniło mnie to do poszukiwania sposobów zabezpieczania/pokrywania stali austenitycznej powłokami mającymi na celu: (i) ochronę przed korozją oraz (ii) biologiczną aktywację powierzchni samego implantu. Zastosowanie odpowiedniej powłoki ochronnej na powierzchni metalicznego materiału implantacyjnego może w istotny sposób podnosić jego biokompatybilność, a tym samym znacznie przyspieszyć regenerację. Powłoka zastosowana do podniesienia biokompatybilności metalicznych materiałów implantacyjnych może mieć charakter zarówno trwały jak i być biodegradowalna. W ramach niniejszego opracowania omówiony zostanie wpływ materiałów biodegradowalnych, metalicznych oraz funkcjonalizowanych na komórki macierzyste izolowane z podskórnej tkanki tłuszczowej (ASCs) u wybranych gatunków zwierząt. Dodatkowo, omówiony zostanie przypadek kliniczny złamania kości kopytowej u konia, gdzie po raz pierwszy podjąłem próbę zespolenia kostnego z zastosowaniem funkcjonalizowanej stali austenitycznej autologicznymi komórkami macierzystymi zawieszonymi na biodegradowalnej warstwie fibryny. Uzyskanie pozytywnego wyniku klinicznego omawianego pacjenta było dla mnie motywacją do dalszej pracy badawczej w zakresie poszukiwania biomateriałów, które mogłyby zostać wprowadzone z czasem do praktyki kliniczno-weterynaryjnej.

Złamania kości u dużych zwierząt stanowią najwyższy odsetek kontuzji zaraz po zerwaniu ścięgna powierzchownego (SDFT - *Superficial Digital Flexor Tendon*) oraz zginacza głębokiego palców (DDFT – *Deep Digital Flexor Tendon*) [30]. Ich główną przyczyną są urazy mechaniczne puszki kopytowej oraz użytkowanie konia na zbyt twardym podłożu. Rutynowe postępowanie kliniczne sprowadza się do wykonania zespolenia kostnego z zastosowaniem śrub ortopedycznych wykonanych głównie ze stali austenitycznej 316L. Większość tego typu złamań ma pozytywne rokowania, jednak proces gojenia się złamania jest długotrwały i często towarzyszą mu liczne powikłania



[31, 32]. Stosowanie śrub ortopedycznych do tego typu zespoleń kostnych wiąże się z wysokim ryzykiem ich uszkodzenia (skrzywienia/pęknięcia/złamania) co w konsekwencji prowadzi do wydłużenia przebudowy kostnej. Dodatkowo, długotrwałe unieruchomienie kości kopytowej prowadzi do deformacji puszki kopytowej, degeneracji stawu kopytowego oraz koronowego. Dlatego też poszukuje się terapii, która w znacznym stopniu przyspieszałaby regenerację złamanej kości. Takie rozwiązania niesie za sobą inżynieria biomateriałowa łączona z terapią komórkami macierzystymi. W ramach niniejszego opracowania poddano badaniu *in vitro* oraz *in vivo* właściwości osteogenne autologicznych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASCs) konia ze złamaną kością kopytową. Zakwalifikowany do eksperymentalnego zabiegu pacjent, był użytkowany sportowo (skoki) na średnio zaawansowanym poziomie, miał 9 lat oraz pochodził z okolic Górnego Śląska. U pacjenta zdiagnozowano złamanie kości kopytowej w płaszczyźnie poziomej. Następnie pobrano z okolicy nasady ogona, w znieczuleniu miejscowym 2g tkanki tłuszczowej z której wyizolowano komórki macierzyste. Kolejno z pobranej wcześniej krwi pacjenta przygotowano macierz fibrynową a następnie propagowano na niej komórki macierzyste. Po 21 dniach hodowli *in vitro* zaobserwowano odkładanie się w macierzy zewnątrzkomórkowej ASCs znacznych ilości wapnia i fosforu szczególnie w miejscach połączenia implantu fibrynowego z komórkami macierzystymi. Kolejno na śrubę ortopedyczną nałożono fibrynową błonę z autologicznymi komórkami macierzystymi i zespolono złamaną kość. Wykonane po 12 tygodniach od zabiegu zdjęcia rentgenowskie wykazały całkowity zrost kostny, bez znamion deformacji puszki kopytowej. Kontrola lekarsko-weterynaryjna po 6 miesiącach od wykonanego zabiegu wykazała częściowy powrót sprawności ruchowej badanego konia, natomiast kolejne badanie wykonane po 9 miesiącach wykazało całkowity powrót sprawności fizycznej.

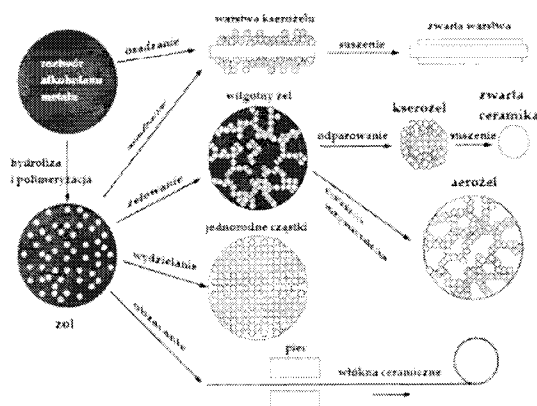
Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny efekt łączenia materiałów metalicznych z komórkami macierzystymi w celu usprawnienia regeneracji tkanki kostnej. Omówiony przypadek kliniczny potwierdza zasadność rozwijania technik inżynierii biomateriałowej opierającej się na łączeniu materiałów implantacyjnych z aktywnymi biofilamentami komórkowymi w celu leczenia wybranych złamań kości. Uzyskane wyniki zostały



zaprezentowane w formie publikacji pt. **“Adipose stem cell combined with plasma-based implant bone tissue differentiation in horse suffered *phalanx digitalis distalis* fracture and *in vitro*”**. (2012) *Veterinari Medicina*, 57, (11):610–617.

Pozytywne wyniki badań *in vivo* skłoniły mnie do dalszego poszukiwania metod modyfikacji stali austenitycznej w celu poprawy osteointegracji oraz osteoregeneracji. Jedną z nieustannie rozwijających się metod syntezy, powłok ochronno-funkcjonalnych materiałów implantacyjnych, jest metoda zol-żel [33]. Gwałtowny wzrost zainteresowania przemysłu tą metodą miał miejsce dopiero na początku lat 70-tych XX wieku, po tym jak poznano i zrozumiano czynniki wpływające na proces katalizy. Badania materiałów otrzymywanych metodą zol-żel, nastawione są głównie na opracowaniu etapów procesu technologicznego, w takim stopniu by umożliwiły uzyskanie materiałów o kontrolowanych parametrach struktury, które to decydują o ich właściwościach zarówno fizykochemicznych, mechanicznych jak i biologicznych. Technika zol-żel, opisywana jest jako jedna z niewielu umożliwiających modyfikację właściwości powierzchni materiału na poziomie molekularnym [34, 35]. Metoda ta polega na sporządzeniu roztworu koloidalnego prekursora, nazywanego zolem i przeprowadzeniu go w żel, co następuje w wyniku reakcji hydrolizy użytych prekursorów oraz polikondensacji cząsteczek tychże prekursorów i produktów pośrednich [36, 37]. Przyjmuje się, że zol (ang. *sol*) jest roztworem koloidalnym, w którym zdyspergowana faza stała składa się z niespolimeryzowanych cząsteczek. Natomiast pod pojęciem żel (ang. *gel*) rozumie się makroskopową cząsteczkę, zajmującą całą objętość roztworu, składającą się z ciągłego szkieletu wypełnionego fazą ciekłą [37]. Należy jednak nadmienić, iż czasowa izolacja reakcji hydrolizy i polikondensacji jest niemożliwa. Kluczową rolę w osteoregeneracji odgrywa zarówno materiał, jak i jego warstwa wierzchnia. Właściwości chemiczne, biomechaniczne i topograficzne samej warstwy powierzchniowej decydują o zachowaniu się komórek w początkowym etapie integracji implantu z otaczającymi go tkankami, dlatego też swoją uwagę skupiłem na syntezie aktywnych powłok z zastosowaniem omawianej metody. Poniżej przedstawiono schemat uzyskiwania różnych produktów z zastosowaniem metody zol-żel.





Rys 1. Produkty otrzymywane metodą zol-żel [37A].

W kolejnych etapach omawianego opracowania przedstawiono modyfikację właściwości warstwy wierzchniej komercyjnie dostępnych materiałów metalicznych poprzez pokrywanie ich powłokami tlenkowymi otrzymanymi metodą zol-żel. Bioaktywność, ciągłość oraz stabilność powłok mających stanowić swego rodzaju barierę pomiędzy środowiskiem tkankowym, a materiałem implantacyjnym, zapewniają odpowiednio dobrane: (i) reagenty, (ii) warunki reakcji hydrolizy i polikondensacji, jak również (iii) parametry procesu stabilizacji tj. temperatura, czas, sposób doboru poszczególnych etapów procesu syntezy. Aspekty te są istotne ze względu min. na: 1) zachowanie ciągłości struktury powłoki narażonej na wysokie naprężenia mechaniczne 2) zachowanie aktywności wprowadzanych domieszek w odniesieniu do sposobu oddziaływań (wiązań chemicznych) ze strukturami sieci tlenkowych, 3) właściwości samych sieci tlenkowych w odniesieniu do zastosowanych w reakcji zol-żel reagentów (wpływ na populację komórek macierzystych w zależności od zastosowanego prekursora). W ramach niniejszego opracowania wytworzyłem 5 różnych biomateriałów stanowiących swego rodzaju kompozyty, których komponenty przyjmowały różne konfiguracje chemiczne. Uzyskane biomateriały metaliczne: krzemionkowe, tytanianowe, jak również hybrydy krzemionkowo-tytanianowe, oraz tlenki domieszkowane kwasem L-askorbinowym o właściwościach farmakologicznie czynnych poddałem badaniom biologicznym. W modelu badawczym zastosowałem mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (ASCs). Badania biologiczne obejmowały ocenę morfologii oraz topografii komórek propagowanych na wybranych biomateriałach. Szczegółowa analiza

Henryk Kuzak

morfolologiczna umożliwiła porównanie odpowiedzi komórkowej na wybranych biomateriałach. Ponadto określono wartość normatywną tempa proliferacji komórek macierzystych propagowanych na komercyjnie stosowanych materiałach implantacyjnych (stal austeniczna AISI 316L oraz stop tytanu Ti6Al4V). Określenie parametru współczynnika proliferacji i dynamiki wzrostu komórek macierzystych jako wartości arbitralnej umożliwiło przeprowadzenie porównania stopnia udoskonalenia właściwości bioaktywnych podłoży pokrytych powłokami, w stosunku do podłoży kontrolnych (stal 316L oraz stop tytanu Ti6Al4V).

Obecnie ze względu na relatywnie niskie koszty produkcji w medycynie weterynaryjnej stosuje się przede wszystkim stale austenityczne AISI 316L. Pomimo wystarczających właściwości mechanicznych, materiały te charakteryzuje niesatysfakcjonująca biokompatybilność wynikająca z małej odporności na działanie płynów ustrojowych organizmu. Dlatego, też najkorzystniejsza, z punktu widzenia inżynierii biomateriałowej, byłaby modyfikacja powierzchni materiałów implantacyjnych poprzez pokrywanie ich bioaktywnymi powłokami tlenkowymi, będącymi jednocześnie swego rodzaju barierą pomiędzy materiałem metalicznym a środowiskiem tkankowym. Pierwszymi ocenianymi w omawianym cyklu badań były powłoki: TiO_2 , SiO_2 oraz powłoka hybrydowa $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$. Komórki ASC w hodowlach na materiałach pokrytych warstwą TiO_2 utrzymywały prawidłową fibroblastopodobną morfologię oraz tworzyły rozbudowaną monowarstwę komórkową typu CAL (ang. *Cellular Active Layer*). Ponadto wykazano, wysokie tempo proliferacji ASC co determinowane było pośrednią hydrofobowością badanej powłoki jak również atrakcyjną dla komórek topografią badanego materiału. Analiza z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych (AFM) wykazała, że powłoka tytanianowa (TiO_2) charakteryzowała się najwyższą chropowatością równą $R_a = 300 \text{ nm}$ (R_a – ang. *arithmetic average roughness*) co znacznie stymulowało komórki ASC do adhezji jak również skutkowało najniższym czasem potrzebnym do podwojenia populacji (PDT). Komórki macierzyste propagowane na powłoce krzemionkowej (SiO_2) charakteryzowały się najniższą żywotnością oraz tempem proliferacji co mogło wynikać z najniższej chropowatości uzyskanej powłoki. Analiza topografii SiO_2 z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych wykazała



chropowatość badanej powłoki równą $R_a=100\text{nm}$. Dodatkowo ASCs hodowane na powłoce krzemionkowej charakteryzowały się najdłuższym okresem koniecznym do podwojenia populacji (PDT). Powłoka hybrydowa $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ tylko w pierwszych dniach doświadczenia stymulowała komórki ASC do intensywnej proliferacji. Warto jednak podkreślić, że wskaźnik proliferacji (PF- ang. *proliferation factor*) w pierwszej dobie był najwyższy spośród wszystkich ocenianych powłok. W kolejnych dniach testu odnotowano znaczny spadek żywotności ASCs jak również ich nieregularny wzrost na powłoce hybrydowej. Jednakże, komórki propagowane na powłoce hybrydowej przyjmowały zbliżony czas podwojenia populacji w porównaniu do stali austenitycznej AISI 316L. Takie zachowanie się ASCs może wynikać z obecności jonów krzemu w analizowanej powłoce, które stymulowały komórki do agregacji, natomiast obecność jonów tytanu przyspieszała tempo proliferacji badanych komórek. Właściwości topograficzne powłoki hybrydowej, były zbliżone do stali austenitycznej. Badana powłoka charakteryzowała się chropowatością równą $R_a=130\text{nm}$ podczas gdy czysta stal przyjmowała chropowatość na poziomie $R_a=160\text{nm}$. Spośród wszystkich ocenianych powłok najkorzystniejsze, z punktu widzenia medycyny rekonstrukcyjnej, właściwości biologiczne wykazywała powłoka tytanianowa, jednak materiał hybrydowy ze względu na pozytywne topograficzne własności, również może znaleźć szerokie zastosowanie w implantologii u małych jak i dużych zwierząt. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie publikacji pt. :***“The morphology, proliferation rate and population doubling time factor of adipose derived mesenchymal stem cells cultured onto non-aqueous SiO2, TiO2 and hybrid sol-gel derived oxide coatings.”*** (2014) Journal of Biomedical Materials Research: Part A DOI: 10.1088/1748-6041/8/6/065004.

W ostatnich latach zauważa się zwiększone zainteresowanie badaczy biomateriałami funkcjonalizowanymi aktywnymi czynnikami w celu przyspieszenia regeneracji uszkodzonych tkanek [38, 39]. Czynniki aktywnymi biologicznie mogą być np. leki, biofosfolipidy oraz/lub witaminy [38]. Wszystkie charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną, a przez to mogą istotnie wpływać na tempo proliferacji komórek macierzystych. Najczęściej w procesie funkcjonalizacji biomateriałów stosuje się jako substrat polimery i/lub hydrożele jak również materiały tlenkowe otrzymywane

metodą zol-żel, które poddaje się odpowiedniej obróbce chemicznej w celu przyłączenia określonych grup chemicznych [39, 40, 41]. Aktywne biologicznie czynniki jak np. kwas L-askorbionowy (witamina C) mogą w znaczący sposób regulować zachowanie się komórek macierzystych propagowanych na takich materiałach. Kwas L-askorbinowy, w zależności od zastosowanego stężenia może wykazywać właściwości przeciwutleniające, jak również prooksydacyjne [A, B, C]. Wcześniejsze badania wykazały znaczący wpływ witaminy C na aktywność mezenchymalnych komórek macierzystych. Dodatkowo, zaobserwowano wzrost tempa proliferacji MSC podczas stymulacji kwasem L-askorbinowym [38, 39]. Badania z zastosowaniem polimerów funkcyjalizowanych witaminą C, potwierdziły ich działanie antyoksydacyjne, a tym samym wpływ na opóźnienie procesu starzenia się komórek użytych w modelu badawczym [59]. **Mając na uwadze powyższe postanowiłem sfunkcyjalizować metaliczne materiały implantacyjne, stosowane w warunkach klinicznych, kwasem L-askorbinowym w celu oceny ich bio-reaktywności.** W celu immobilizacji kwasu L-askorbinowego (LAA) na powierzchni implantu, opisane w poprzednim rozdziale niniejszego opracowania powłoki tytanianowe i krzemionkowe domieszkowano odpowiednio dobranym stężeniem kwasu. Uzyskane materiały poddano badaniom biologicznym z zastosowaniem komórek macierzystych izolowanych zarówno z tkanki tłuszczowej (ASC) oraz szpiku kostnego (BM-MSCs). W toku przeprowadzonych badań zaobserwowano wysoką aktywność biologiczną obu badanych populacji komórek propagowanych na powłokach SiO₂ i TiO₂ domieszkowanych 0,4M wodnym roztworem kwasu L-askorbinowego. Komórki macierzyste zarówno, ASCs jak i BMMSCs charakteryzowały się najwyższym tempem proliferacji oraz prawidłową morfologią podczas hodowli na powłoce SiO₂ domieszkowanej 0,4M wodnym roztworem kwasu L-askorbinowego. Warto podkreślić, że otrzymane aktywne powłoki wywierały podobny efekt biologiczny niezależnie od zastosowanego podłoża metalicznego. Uzyskane pozytywne wyniki biologiczne BMSCs na badanych materiałach sugerują konieczność aktywacji powłok implantów jeśli rozważane jest zastosowanie tej puli komórkowej w implantach kostnych. Dodatkowo zaobserwowałem, iż powłoki krzemionkowe są lepszym nośnikiem kwasu L-askorbinowego w porównaniu do powłok tytanianowych. Uzyskane wyniki zostały



zaprezentowane w formie publikacji pt. :*“Application of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells for testing the biocompatibility of metal-based biomaterials functionalized with ascorbic acid”*. (2014) Biomedical Materilas. doi:10.1088/1748-6041/8/6/065004.

4.3 Biodegradowalne hydrożele na bazie alginianów- ocena morfologii, ultrastruktury oraz potencjału regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej.

Droga dostarczenia mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) do uszkodzonych tkanek jest jednym z kluczowych elementów decydujących o powodzeniu terapii regeneracyjnej. Bezpośrednie podanie MSCs do uszkodzonej tkanki, jest najczęściej stosowaną oraz najlepiej poznaną metodą iniekcji komórek macierzystych. Drugim sposobem dostarczania MSC do uszkodzonych tkanek jest droga do żylna (*intra venus*), jednak metoda ta jest wysoce sporna w ocenie badaczy ze względu na mechaniczne zatrzymanie komórek macierzystych w naczyniach krwionośnych płuc [42]. Podawanie domiejskowe komórek mezenchymalnych, poprzez iniekcje np. dostawowe (*intra articular*) dają zdecydowanie lepsze rezultaty kliniczne. Z kolei taka droga podania wymaga stosowania odpowiednich bioaktywnych nośników, które będą nie tylko zastępować utraconą pierwotną macierz komórkową ale również stymulować MSCs do proliferacji oraz regeneracji uszkodzonej tkanki [13]. W celu zoptymalizowania sposobów podawania MSCs do uszkodzonych tkanek rozważa się zawieszanie ich w biodegradowalnych hydrożelach, które z czasem ulegają rozpuszczeniu w tkance docelowej dostarczając zawieszonych w nich uprzednio MSCs. Dodatkowo, w przypadku dużego ubytku tkanki koniecznym jest wprowadzenie komórek macierzystych zawieszonych na macierzy, która imitować będzie brakujący element tkankowy. Bioaktywne macierze komórkowe powinny charakteryzować się określonym chemizmem, biomechaniką oraz zwiększać aktywność biologiczną komórek zastosowanych w określonej terapii. Takie biomateriały powinny dodatkowo naśladować mimikę tkanki docelowej a przez to podnosić wartość biologiczną materiału. W tym celu opracowano szereg różnorodnych biodegradowalnych materiałów tj. biofilmy, biodegradowlane gąbki, hydrożele oraz mikrokapsułki, które charakteryzują się różną

mikro-mechaniką a co za tym idzie wykazują różne efekty kliniczne po przeszczepieniu [14 , 15, 16 , 17 , 18]. Istotnym jest, również z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej, aby biodegradowalny materiał stymulował komórki do wytwarzania gęstych połączeń międzykomórkowych, zachowania prawidłowej morfologii, a co najważniejsze zachowania pierwotnego fenotypu zawieszanych w nich MSCs [19]. Jednym z zapowiadających się biodegradowalnych materiałów implantacyjnych są hydrożele alginianowe, które można zastosować jako nośniki dla komórek macierzystych. Ich niekwestionowaną zaletą jest neutralność immunologiczna, bioabsorbowalność oraz przepuszczalność dla płynów tkankowych. Wadą natomiast jest niska adhezja oraz znikome tempo proliferacji komórek MSCs do ich powierzchni. Modyfikacje chemiczne oraz biologiczne hydrożeli alginianowych mogą skutkować poprawą ich właściwości biologicznych. Dlatego też, postanowiłem zmodyfikować hydrożel alginianowy (CA:NA) dodatkiem autologicznej fibryny. Aktywność biologiczną uzyskanego materiału zbadałem z zastosowaniem min. komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC). Fibryna wprowadzona do materiału spowodowała utworzenie się bioaktywnej, trójwymiarowej sieci, która promowała adhezję komórek ASCs do badanego materiału. Dodatkowo 10% udział fibryny w materiale skutkował porównywalnym do hodowli 2D tempem proliferacji ASCs. W trakcie prowadzonego doświadczenia, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej potwierdziłem utrzymanie fenotypu CD44 oraz CD105 w prowadzonej hodowli. Oznacza to, że materiał promował utrzymanie markerów powierzchniowych komórek. Taki efekt daje nadzieję, że przeszczepione MSC, zawieszane wcześniej w hydrożelu alginianowym, będą podejmować prawidłowo swoje funkcje biologiczne.

Podsumowując, można stwierdzić, że hydrożele alginianowe wzbogacone 10% dodatkiem fibryny mogą być skutecznym i trwałym nośnikiem komórek mezenchymalnych. Zaprojektowane żele nie wpływają na zmianę fenotypu propagowanych w nich MSCs, a dodatkowo stymulują je do szybszej adhezji i proliferacji. Uzyskane wyniki dają nadzieję na skuteczne wykorzystanie hydrożeli alginianowych w medycynie regeneracyjnej.



Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie publikacji pt. *“Influence of modified alginate hydrogels on mesenchymal stem cells and olfactory bulb-derived glial cells cultures”*. Bio-Medical Materials and Engineering 00 (2014) 1-13 DOI-10.3233/BME-140966.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo badawczych (artystycznych).

Z uwagi na charakter prowadzonych przeze mnie badań oraz zainteresowań po uzyskaniu tytułu doktora nauk biologicznych, moje publikacje mogę podzielić na trzy moduły tematyczne:

5.1 „Ocena możliwości regeneracji układu mięśniowo-szkieletowego u małych i dużych zwierząt z zastosowaniem autologicznych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) oraz z zastosowaniem wybranych biodegradowalnych materiałów implantacyjnych”.

1. **Marycz K**, Grzesiak J: *Behavior, morphology and morphometry of Equine adipose – derived mesenchymal stem cells in culture*. (2009) Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 14 (2) 09.
2. Grzesiak J, **Marycz K**, Czogała J, Wrzeszcz K, Nicpoń J: *“Comparison of Behavior, Morphology and Morphometry of Equine and Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Culture”*. (2011) Int. J. Morphol., 29(3):1012-1017,
3. Grzesiak J, **Marycz K**, Wrzeszcz K, Czogała J: *“Isolation and Morphological Characterisation of Ovine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Culture”*, International Journal of Stem Cells Vol. 4, No. 2, 2011
4. **Marycz K**, Toker N, Grzesiak J, Wrzeszcz K, Golonka P: *“The therapeutic effect of autogenic adipose derived stem cells combined with autogenic platelet rich plasma in tendons disorders in horses-in vitro and in vivo research”*(2012) Journal of Animal and Veterinary Advances 11(23):4324-4331
5. Szarek D, Laska J, Jarmundowicz W, Blazewicz S, Tabakow P, **Marycz K**, Wozniak Z, Mierzwa J: *“Influence of Alginates on Tube Nerve Grafts of Different Elasticity— Preliminary in Vivo Study”* (2012) Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2012, 3, 20-30



6. Szarek D, **Marycz K**, Bednarz P, Tabakow P, Jarmundowicz W, Laska J: "*Influence of calcium alginate on peripheral nerve regeneration: In vivo study*". (2013) doi: 10.1002/bab.1096.
7. Wrzeszcz K, **Marycz K**, Zimoch A, Jarmoluk A: "*Crosslinking of sodium alginate to hydrogels for tissue engineering*".(2013) Przem. Chem. 92, 6, 1018
8. Grzesiak J, **Marycz K**, Szarek D, Wrzeszcz K: "*Morphological characterization of gecko's (*Eublepharis macularius*) glial cells in culture*" (2013) International Journal of Morphology 31(3):826-831
8. Szarek D, **Marycz K**, Laska J, Bednarz P, Jarmundowicz W: "*Assessment of in vivo behavior of polymer tube nerve grafts simultaneously with the peripheral nerve regeneration process using scanning electron microscopy technique*".(2013) The Journal of Scanning Microscopes- SCANNING 35(4):232-45
9. Nicpoń J, **Marycz K**, Grzesiak J: „*The therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cells injection in horses suffering from bone spavin*".(2013) Polish Journal of Veterinary Sciences, 16(4):753-754. DOI:DOI 10.2478/pjvs-2013-0107
10. Marędziaek M, **Marycz K**, Śmieszek A, Lewandowski D, Toker N: „*The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue*" (2013) In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal DOI: 10.1007/s11626-013-9730-1.

Badania z tego zakresu tematycznego prowadziłem we współpracy z Panem dr med. wet. Jakubem Nicponiem z Katedry i Kliniki Chirurgii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Panem prof. dr hab. Kuno von Plocki ze Schwarzwald-Tierklinik z Niemiec, Panem dr n med. Dariuszem Szarkiem z kliniki Neurochirurgii Akademii Medycznej we Wrocławiu, Panem prof. dr hab. Włodzimierzem Jarmundowiczem - kierownikiem Kliniki Neurochirurgii Akademii Medycznej we Wrocławiu, Panią dr hab. inż. Jadwigą Laską z Katedry Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie, Panem prof. dr hab. Stanisławem Błazewiczem kierownikiem Katedry Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie oraz z



Panem dr inż. Danielem Lewandowskim z Instytutu Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej Politechniki Wrocławskiej.

Prace z tego modułu tematycznego obejmują 10 publikacji (8 znajduje się na liście filadelfijskiej) oraz 5 doniesień konferencyjnych prezentowanych na międzynarodowych konferencjach oraz kongresach naukowych. Zaliczane do wyżej omawianego modułu tematycznego publikacje dotyczą głównie:

- Oceny klinicznej, iniekcji autologicznych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) u dużych zwierząt w przypadku wybranych schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego.
- Oceny możliwości zastosowania w praktyce klinicznej wybranych biodegradowalnych alginianów w regeneracji układu mięśniowo-szkieletowego zwierząt.

Zaburzenia układu mięśniowo-szkieletowego (MSD - musculoskeletal disorders) zaliczane są do grupy najczęściej występujących jednostek chorobowych zwierząt [19, 21, 22]. Schorzenia te dotyczą dysfunkcji w układzie mięśniowym, kostno-stawowym, nerwowym jak również uszkodzeń ścięgien. Zaburzenia w aparacie ruchu skutkują kulawizną różnego stopnia, a nieleczone w konsekwencji mogą prowadzić do konieczności eutanazji zwierzęcia. Układ mięśniowo-szkieletowy dużych zwierząt, zwłaszcza koni sportowych, z powodu dużych obciążeń biomechanicznych narażony jest stale na kontuzje, często o charakterze przewlekłym. Każde uszkodzenie ścięgien oraz/lub stawów przekłada się na istotne ryzyko ponownej kontuzji co dyskwalifikuje z dalszego użytkowania zwierzęcia [42]. Dodatkowo, okres kontuzji i jej leczenie wiąże się z koniecznością reżimu ruchowego oraz przerwy w treningach. Nieprawidłowe wykorzystywanie koni w sporcie, najczęściej skutkuje uszkodzeniem ścięgien: powierzchownego (SDFT – *Superficial Digital Flexor Tendon*) oraz głębokiego zginacza palców (DDFT – *Deep Digital Flexor Tendon*). Ponad 80% populacji koni, które uległy uszkodzeniu któregoś z w/w ścięgien w perspektywie następnych kilku lat, z powodu powstawania blizn ścięgowych ulega ponownej kontuzji [43]. Standardowe leczenie układu mięśniowo-szkieletowego u koni sprowadza się do stosowania terapii jedynie przeciwbólowej oraz przeciw zapalnej z zastosowaniem sterydowych i niesterydowych



leków przeciwzapalnych (SAIDs/NSAIDs) [19]. Taka jednak strategia leczenia nie promuje regeneracji uszkodzonych ścięgien, a jedynie jest doraźnym leczeniem bólu. Dlatego, też postanowiłem zastosować: autologiczne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (ASCs) oraz osocze bogato płytkowe, w terapii łączonej u koni z uszkodzonym ścięgiem zginacza powierzchniowego palców. W planowanych terapiach spodziewałem się uzyskać prawidłową odbudowę ścięgna ze stosunkowo niewielką blizną pourazową lub jej całkowitym brakiem. W pierwszym etapie prowadzonych badań skupiłem się na opracowaniu techniki pobierania tkanki tłuszczowej oraz ocenie morfologicznej, behawioralnej, morfometrycznej i ultrastrukturalnej wyizolowanych ASCs. Następnie scharakteryzowałem populację komórek CD105+/CD45+/CD20+ oraz opracowałem wydajny system ich izolacji. Większość protokołów opisujących metody izolacji ASCs opiera się na trawieniu enzymatycznym. W moich badaniach izolacje, kierowane do iniekcji terapeutycznych, opierałem na mechanicznej preparatyce tkanki tłuszczowej. Usunięcie frakcji naczyniowej, uniemożliwia dostawanie się do hodowli czynników naczyniowych inhibuje adhezję i proliferację ASCs. Istotnym z punktu widzenia klinicznego, było opisanie zachowania się populacji ASCs różnych gatunków zwierząt w tym konia, psa i owcy, w warunkach hodowli *in vitro* przed przystąpieniem do transplantacji. Komórki ASCs w hodowli *in vitro*, wykazują nieznaczne różnice morfologiczne zależne od gatunku dawcy. Ponadto, badania z zastosowaniem modelu owczego, wykazały że miejsce pobrania tkanki tłuszczowej koreluje z ilością i żywotnością izolowanych komórek ASC. Różnice w aktywności cytofizjologicznej ASCs pomiędzy wymienionymi gatunkami zwierząt polegały głównie na różnym tempie ich proliferacji oraz przeżywalności w warunkach *in vitro*. Po zakończeniu tego etapu badań, podjąłem próbę aplikacji klinicznej ASCs oraz osocza bogato płytkowego u koni z uszkodzonym ścięgiem powierzchniowym zginacza palca. Ocena kliniczna, wykonana po 12 tygodniach od iniekcji komórek macierzystych wykazała znaczną poprawę kliniczną u badanych osobników. Warto podkreślić, że połączenie terapii komórek macierzystych z osoczem bogato płytkowym skutkowało odbudowaniem się prawidłowych struktur ścięgna SDFT, co wykazano w badaniu obrazowym za pomocą ultrasonografii. Jedynie w przypadku 15% badanych zwierząt zaobserwowałem powstawanie nieznacznego stopnia



blizny pourazowej. Zatem można stwierdzić, że zastosowanie przeszczepu autologicznych komórek macierzystych, izolowanych z tkanki tłuszczowej, w przypadku uszkodzeń ścięgien jest bezpieczną i satysfakcjonującą metodą leczenia tego urazu.

Nawracające kontuzje ścięgien, niewłaściwie leczone mogą z kolei prowadzić do powstawania zapalenia stawu skokowego potocznie zwanego szpatem. Dotyka on głównie starszych koni w wieku od 8 do 10 lat, jednak występuje on również u koni młodych do 3 roku życia [44]. Czynnikiem predysponującym w szpacie jest w dużej mierze niepoprawna budowa anatomiczna stawu stępu. Większe siły nacisku działają na kość centralną stępu oraz kości stępu I i II od strony przyśrodkowej. Dodatkowo wady postawy, nieprawidłowe okucie oraz poruszanie się po twardej nawierzchni mogą skutkować rozwinięciem się ostrych zmian szpatowych [45, 46, 47]. Nieprawidłowe użytkowanie koni sportowych, chęć osiągnięcia dobrych wyników sportowych w relatywnie krótkim czasie, oraz narażanie konia na długotrwałe przeciążenia biomechaniczne stawu skokowego skutkuje powstaniem charakterystycznych osteofitów, czego dowodem są deformacje szpatowe na przednio przyśrodkowej powierzchni stawu stępu [46]. W początkowym okresie rozwoju choroby zmiany te są nieznacznego stopnia i trudne do zdiagnozowania za pomocą diagnostyki obrazowej (RTG). Na skutek postępującej degeneracji chrząstki stawowej dochodzi do utraty płynu stawowego czego efektem jest ankyloza stawu. Proces ten jest długotrwały oraz przejawiają się kulawizną dużego stopnia. Standardowe metody leczenia tej jednostki chorobowej opierają się głównie na śródstawowym podawaniu leków kortykosteroidowych, jednak taka strategia leczenia przynosi jedynie czasową poprawę kliniczną [48]. Dodatkowo, podawanie leków sterydowych w przypadku szpatu budzi wśród lekarzy wiele kontrowersji. Część badaczy uważa, że leki sterydowe działają chondroprotekcyjnie podczas gdy inni podają, iż działają one chondrodegeneracyjnie. Stosowanie leków sterydowych zwłaszcza w przypadku koni sportowych jest bardzo ograniczone, co regulują odpowiednie przepisy antydopingowe [49]. Zaawansowane formy szpatu leczone są operacyjnie poprzez trwałe usztywnienie stawu stępu, co skutkuje unieruchomieniem kości wchodzących w jego skład. Metody te jednak, są wysoce inwazyjne i często na ich skutek obserwuje się powikłania pooperacyjne. Z tego też powodu, podjąłem próbę iniekcji autologicznych



komórek macierzystych u koni ze zdiagnozowanym wczesnym zapaleniem stawu stępu. Przeprowadzone badania wykazały silny efekt immunomodulujący ASCs, polegający na zmniejszeniu się ilości komórek układu immunologicznego w płynie stawowym. Poprawę kliniczną manifestującą się ustąpieniem kulawizny, zaobserwowano dopiero po 180 dniach od iniekcji komórek ASCs. Natomiast w grupie zwierząt gdzie stosowane były leki kortykosterydowe poprawę kliniczną odnotowano już w 30 dniu doświadczenia, poprawa jednak utrzymywała się tylko przez kolejne 20 dni, a kulawizna nawracała. W ocenie scyntygraficznej, po 180 dniach doświadczenia stwierdziłem brak aktywności radioizotopów w badanych stawach, podczas gdy w grupie z lekami sterydowymi utrzymywała się nieznacznego stopnia aktywność kontrastu świadcząca o toczącym się stanie zapalnym. Otrzymane wyniki potwierdzają, również działanie przeciwzapalne komórek macierzystych, co koreluje z obserwacjami innych autorów. Operacyjne leczenie szpātu, może prowadzić do powikłań pooperacyjnych do których zaliczamy min. uszkodzenia nerwów piszczelowego i/lub strzałkowego [50]. W związku z tym podjąłem próbę oceny możliwości regeneracji krytycznego ubytku nerwu kulszowego w modelu szczurzym (10 mm), z zastosowaniem wybranych biodegradowalnych biomateriałów. Badanie to zostało przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych, co niemożliwe jest w przypadku koni. W omawianym doświadczeniu zastosowano rurki wykonane z następujących materiałów: polietylenu, polilaktydu oraz poliuretanu. Wytworzone implanty charakteryzowały się różnym stopniem elastyczności, co zasadniczo koreluje z ich poręcznością chirurgiczną. Dodatkowo, wymienione materiały wypełniono alginianem sodu w formie włókien alginianowych, w celu wypełnienia pomostu implantacyjnego jak również w celu przyspieszenia neuro-regeneracji. Kolejno wykonano krytyczny ubytek nerwu kulszowego u doświadczalnych zwierząt oraz przeszczepiono wytworzone biomateriały. Analizę histologiczną operowanych nerwów wykonano w okresie od 3 do 20 tygodni od przeszczepu. Pośród badanych implantów najlepsze wyniki zaobserwowano w przypadku rurek wykonanych z mieszaniny poliuretanu oraz polilaktydu, głównie ze względu na ich prawidłowe właściwości biomechaniczne. Pozostałe materiały charakteryzowały się zbyt dużą sztywnością i niską poręcznością chirurgiczną, co w konsekwencji przełożyło się na nieznaczną regenerację



uszkodzonego nerwu. Wypełnienie badanych biomateriałów alginianem sodu skutkowało, powstaniem gęstego żelu wewnątrz materiału, co znacząco zwalniało infiltrację komórek Schwanna, a przez to regenerację całego nerwu. Wnikliwa ocena histologiczna oraz badanie z zastosowaniem skaningowej mikroskopii elektronowej wykazały, że rurki poliuretanowo-polilaktydowe stymulowały regenerację nerwu kulszowego w stopniu porównywalnym do przeszczepu nerwu własnego. Uzyskane wyniki dają nadzieję, na stosowanie wytworzonych biomateriałów poliuretanowych, w przypadku uszkodzeń nerwów obwodowych, u dużych zwierząt.

5.2 „Ocena cytobiokompatybilności oraz właściwości fizykochemicznych wybranych biomateriałów pochodzenia organicznego oraz nieorganicznego z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC)

1. Zimoch A, Jarmoluk A, **Marycz K**: „*Interaction characterisation of hydroxypropylmethylcellulose, chitosan and lysosym*” (2011) Przem.Chem 90;1103-1106
2. Donesz-Sikorska A, **Marycz K**, Śmieszek A, Grzesiak J, Kaliński K, Krzak-Roś J: „*Biologically active oxide coatings, obtained by the sol-gel method, on metallic implant materials.*” (2013) Przem. Chem. 92; 1110-1116
3. Starosta R, Brzuszkiewicz A, Bykowska A, Komarnicka K, Bażanów B, Florek M, Gadzała Ł, Jackulak N, Król J, **Marycz K**: „*A novel copper(I) complex, [CuI(2,2'biquinoline)P(CH₂N(CH₂CH₂)₂O)₃]-Synthesis, characterisation and comparative studies on biological activity*”. (2013) Polyhedron Vol 50, Issue 1;481-489
4. Krzak-Roś ., **Marycz K**, Donesz-Sikorska A, Śmieszek A, Grzesiak J: „*Evaluation of the cellular response to hybrid materials (SiO₂/TiO₂), depending on the used precursors in sol-gel method*”. (2013) Przem. Chem. 92; 1101-1105
5. **Marycz K**, Krzak-Roś J, Śmieszek A, Grzesiak J, Donesz-Sikorska A: „*Effect of oxide materials synthesized with sol-gel method on adhesion of mesenchymal stem cells*”. (2013) Przem. Chem. 92(6):1000
6. Zimoch A, Jarmoluk A, Ambrozik-Haba J, **Marycz K**, Semerlak K, Brychey E, Ulbin-Figielewicz N: „*Effect of 3-aminopropyltrethoxysilane on variability of selected physical properties of chitosan protective coatings*”. (2012) Przem. Chem. 91(05) 621-1104



Badania z tego zakresu prowadziłem we współpracy z Panią Dr inż. Justyną Krzak-Roś z Instytutu Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej, Politechniki Wrocławskiej, Panem Dr hab. inż. Jerzym Kaletą, Prof. nadzw. PWr z Instytutu Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej, Politechniki Wrocławskiej, Panią dr inż. Anną Zimoch z Katedry Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Panem Prof. dr hab. Andrzejem Jarmolukiem z Katedry Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Panią Dr med. wet. Barbarą Bażanów z Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Prace z tego modułu tematycznego obejmują 6 publikacji z listy filadelfijskiej oraz 4 doniesienia konferencyjne prezentowane na międzynarodowych konferencjach oraz kongresach naukowych. Zaliczane do wyżej omawianego modułu tematycznego publikacje dotyczą głównie:

- Oceny cytobiokompatybilności wybranych powłok tlenkowych: krzemionkowych (SiO_2), tytanianowych (TiO_2) oraz hybryd krzeminkowo/tytanianowych ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$) z zastosowaniem różnych prekursorów oraz parametrów optymalizacji warunków syntezy metodą zol-żel
- Oceny wybranych właściwości fizykochemicznych ww. materiałów oraz ich wpływu na mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (ASC).

Inżynieria biomateriałowa jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauk medycznych. Starzejące się społeczeństwa wymagają coraz częściej zastosowania zaawansowanych materiałów implantacyjnych w celu przywrócenia utraconej sprawności fizycznej. Powszechnie stosowanymi materiałami biomedycznymi służącymi do wytwarzania implantów kostnych są metale i ich stopy, jak również tworzywa ceramiczne oraz polimery [33]. Ceramika stosowana w medycynie rekonstrukcyjnej charakteryzuje się przede wszystkim odpowiednią porowatością, umożliwiającą tworzenie się trwałego połączenia tkanki z implantem, wysoką twardością, odpornością na ścieranie, dobrą biotolerancją ale również dużą kruchością. Materiały ceramiczne odznaczają się ponadto niską odpornością na cykliczne obciążenia, co znacząco



ogranicza ich zastosowanie w formie implantów kostnych [27]. Podobne cechy wykazują również materiały polimerowe, dlatego też ich zastosowanie w warunkach klinicznych jest na tym etapie rozwoju medycyny wciąż ograniczone. Materiały wykorzystywane w ortopedii, produkowane są najczęściej na bazie stali austenitycznej AISI 316L oraz stopu tytanu Ti6Al4V. Znajdują one powszechne zastosowanie w produkcji śrub, wkrętów, grotów, drutów lub płyt. Materiały te można podzielić zasadniczo na dwie grupy: krótkoterminowe, które nie powinny pozostawać w organizmie dłużej niż dwa lata oraz długoterminowe, które mogą pozostawać w kontakcie z płynami ustrojowymi nawet 10 lat. Te pierwsze produkowane są najczęściej na bazie stopów kobaltu oraz/lub stali AISI 316L, natomiast materiały długoterminowe wytwarzane są przede wszystkim ze stopu tytanu (Ti6Al4V). Głównymi zaletami implantów wykonywanych z materiałów metalicznych, produkowanych zarówno ze stopu AISI 316L jak również Ti6Al4V, jest ich odporność na pękanie, wysoka wytrzymałość, plastyczność oraz poprawna biokompatybilność [51, 52, 53, 54, 55]. Wystarczająca biokompatybilność jest wynikiem formowania się na powierzchni stopu AISI 316L pasywnej warstwy tlenku chromu oraz w przypadku stopu Ti6Al4V tlenku tytanu o bio-stymulującym działaniu. Pomimo wielu pozytywnych właściwości stopów austenitycznych (AISI 316L oraz/lub Cr-N-Mo), niekwestionowaną ich wadą jest niska odporność na korozję szczelinową, wżerową oraz naprężeniową, w środowisku tkankowym [53]. Elementy stalowe wprowadzone do organizmu, pod wpływem działania płynów ustrojowych uwalniają do przestrzeni tkankowej jony metali. Produkty korozji mogą wywoływać alergię, jak również prowadzić do powstania metalozy. Dodatkowo w tkankach otaczających implant, obserwuje się wysoki stopień zwłóknienia tkanek, co hamuje naturalne procesy regeneracji kości [56, 57, 58]. Z kolei pasywna warstwa tlenku tytanu, tworząca się naturalnie na materiałach produkowanych ze stopu Ti6Al4V, jest mało trwała a jej grubość ocenia się na ok. kilka nm. Stosunkowo szybkie jej utlenianie, prowadzi do tworzenia się wolnych przestrzeni pomiędzy tkanką a materiałem implantacyjnym, co w konsekwencji może prowadzić do obłuzowywania się przeszczepionych implantów. Korodujące materiały tracą swoje właściwości biomechaniczne, w związku z czym wymagają usunięcia i wymiany co sprowadza się do konieczności wykonania



powtórnego zabiegu operacyjnego. Wiąże się to z ryzykiem powikłań pooperacyjnych jak również naraża pacjenta na dodatkowy ból, koszty oraz skutkuje koniecznością ponownej hospitalizacji i rekonwalescencji. Dlatego też, poszukuje się substancji chemicznych pochodzenia zarówno organicznego jak i nieorganicznego, które mogłyby zostać zastosowane w formie bioaktywnych warstw ochronnych, nanoszonych na implanty stosowane obecnie w warunkach klinicznych [59, 60, 61]. Czynniki funkcjonalizujące/ochronne powinny działać na otaczające tkanki w dwojaki sposób: (i) jako warstwa aktywna biologicznie, stymulująca uszkodzoną tkankę (ii) jako warstwa chroniąca podłoże przed korozją oraz/lub poprawiająca pierwotne właściwości morfologiczne materiału. W celu modyfikacji materiałów metalicznych postanowiłem użyć hydrolizatów otrzymanych metodą zol-żel w celu otrzymania następujących powłok tlenkowych: tlenku krzemu (SiO_2), tlenku tytanu (TiO_2), oraz hybrydę krzeminkowo/tytaninanową ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$). Dodatkowo badaniom fizykochemicznym poddałem błony chitozanowe oraz hybrydę alginianowo-chitozanową w celu oceny ich przydatności do syntezy materiałów bio-reaktywnych o potencjale osteo-regeneracyjnym. Powłoki nieorganiczne syntezowane były przy użyciu bezwodnej metody zol-żel, wymagającej zastosowania odpowiednich reagentów, co wpływa na właściwości strukturalne oraz aktywność biologiczną otrzymywanych biomateriałów. Atomy centralne prekursorów, stosowanych w syntezie powłok, stanowią bazę dla docelowych sieci tlenkowych. Właściwości produktu końcowego - homogennej powłoki, ściśle zależą od procesu sieciowania/polikondensacji. Proces ten determinowany jest przez długość łańcuchów węglowych, stanowiących podstawniki w cząsteczkach stosowanych prekursorów, oraz inne grupy organiczne wchodzące w skład cząsteczek związków, użytych w trakcie syntezy.

W celu otrzymania wyżej wymienionych powłok zastosowałem następujące prekursory:

- dla powłoki krzemionkowej (SiO_2) - izobutyltrimetoksylan (iBtMOS, Alfa Aesar), tetraetoksylan (TEOS, Alfa Aesar), tetrametoksylan (TMOS, Alfa Aesar).



- dla powłoki tytanianowej (TiO_2) n-butoksy tytan(IV) (Ti-nBO, Alfa Aesar), izopropoksy tytan(IV) (TIPO, Alfa Aesar).
- dla hybrydykrzemionkowo-tytanianowej ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$) izobutyltrimetoksyilan (iBtMOS, Alfa Aesar), n-butoksy tytan(IV) (Ti-nBO, Alfa Aesar).

We wszystkich syntezach jako rozpuszczalnika użyto butanolu (BuOH, Chempur), natomiast stabilizatorem dla powłoki TiO_2 był acetyloaceton (AcAc, Sigma Aldrich). We wszystkich przypadkach prowadzono katalizę kwaśną. Z kolei organiczne folie biokompozytowe sporządzono w wyniku przeprowadzenia reakcji polikondensacji w warunkach kontrolowanych z zastosowaniem komory klimatycznej. Do syntezy błon polielektrolitowych zastosowano alginian sodu, roztwór chitozanu oraz połączone obie badane substancje z zastosowaniem glicerolu w celu uzyskania materiału hybrydowego. Przeprowadzone badania fizykochemiczne wykazały, że powłoki krzemionkowe (SiO_2), hybrydowe ($\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$), chitozanowe oraz alginianowo-chitozanowe były homogenne, ciągłe oraz transparentne. W przypadku powłoki tytanianowej (TiO_2) zaobserwowałem charakterystyczną rozbudowaną morfologię powierzchni, z lokalnymi zgrubieniami. Wyniki analizy widm uzyskanych przy użyciu spektrometru Ramanowskiego potwierdziły obecność sieci krzemionkowej, tytanianowej, grup wodorotlenowych oraz ugrupowań chemicznych charakterystycznych dla zastosowanych reagentów. Badania mikromechaniczne, analizowanych materiałów wykazały znikomy wpływ powłoki na właściwości mechaniczne podłoża, ponadto zaobserwowałem silną adhezję badanych powłok do podłoża wykonanego ze stali AISI 316L, co przejawiało się brakiem złuszczeń oraz pęknięć w obszarze przzerwania ciągłości próbki. Dodatkowo materiały hybrydowe na bazie alginianu sodu oraz chitozanu charakteryzowały się wyższymi wartościami biomechanicznymi co wskazuje na ich przydatność w projektowaniu materiałów implantacyjnych. Zastosowane kompozyty alginianowo-chitozanowe należą do związków biodegradowalnych a możliwość tworzenia z ich udziałem biokompleksów polielektrolitowych daje szerokie spektrum możliwości ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej, zwłaszcza jako substancji silnie biologicznie-aktywnych. Materiały organiczne, nanoszone na podłoża metaliczne mogłyby spełniać rolę cyto-aktywatorów lub wspierać proces osteoregeneracji, w zależności od użytej substancji aktywnej.



Dodatkowo znaczące właściwości higroskopijne powłok hybrydowych (alginianowo-hitozanowych) umożliwiają ich zastosowanie w sterowaniu dynamiką uwalniania substancji aktywnych. Uzyskanie pozytywnych wyników fizykochemicznych badanych biomateriałów skłoniło mnie do dalszego etapu testów, polegających na ocenie ich cytobiokompatybilności. Badania z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (ASCs) wykazały najbardziej wyrównane tempo proliferacji ASC na modyfikowanych materiałach hybrydowych ($\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$), jednak najwyższy współczynnik proliferacji (WP) osiągnięty został dla powłoki tytanianowej (TiO_2). Współczynnik WP informujący o stopniu namnażania się populacji ASCs hodowanych na badanych podłożach wskazuje na pozytywny efekt tlenku tytanu zastosowanego w syntezie badanych biomateriałów. Może to wynikać z atrakcyjnej-rozbudowanej topografii powłoki tytanianowej stymulującej ASCs do namnażania się, jak również z zastosowania prekursora Ti-nBO użytych do syntezy. Dodatkowo uzyskane wyniki wykazały, że zachowanie odpowiednich proporcji pomiędzy siecią krzemionkową z grupami butylowymi, a siecią tytanianową otrzymaną z prekursora Ti-nBO pozwala na syntezę wysoce bioreaktywnych materiałów hybrydowych znacząco stymulujących komórki macierzyste do proliferacji. Uzyskane wyniki umożliwiają syntezę aktywnych biologicznie materiałów mogących znaleźć zastosowanie w projektowaniu materiałów implantacyjnych o przeznaczeniu osteo-regeneracyjnym.

5.3 „Zastosowanie technik mikroskopowo-elektronowych łączonych z optyczną spektrometrią emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnej (ICP-OES) jako zaawansowane techniki poznawcze, analityczne oraz diagnostyczne”.

1. Michalak I, Chojnacka K, **Marycz K**: “Using ICP-OES and SEM-EDX in biosorption studies” (2011) *Microchimica Acta* 172,1-2,65-74
2. **Marycz K**, Toker N, Czogała J, Michalak I, Nicpoń J, Grzesiak J: “An investigation of the elemental composition of horse hair affected by Equine Metabolic Syndrome (EMS) using SEM EDX and ICP-OES” (2013) *Journal of Animal and Veterinary Advances* 12 (2) 146-152



3. Maksymowicz K, **Marycz K**, Szotek S, Kaliński K, Serwa E, Lukomski R, Czogała J „*Chemical composition of human and canine fascia lata*”(2012) Acta Biochemica Polonica 59(4):531-5
4. Kalinski K, **Marycz K**, Czogała J, Serwa E, Janeczek W:“*An application of scanning electron microscopy combined with roentgen microanalysis (SEM–EDS) in canine urolithiasis*”. (2012) Journal of Electron Microscopy (Tokyo) 61(1):47-55
5. Czogała J, **Marycz K**, Kuryszko J, Zawadzki M “*The occurrence of mast cells, dendritic cells, macrophages and other cellular elements of the skin immune system in dogs with the signs of atopic dermatitis*”. (2011), Acta Veterinaria Brno doi:10.2754/avb201180010011 80: 11-17
6. Brychy E, Jarmoluk A, Kaliński K, **Marycz K**, Skibiński K, Zimoch A, Gancarz R “*The effect of plant extract from dog rose and hibiscus on solubility of post-operative kidney stone*”. (2012) Przem. Chem. 91(05) 621-1104
7. Klećkowska-Nawrot J, **Marycz K**, Czogała J, Kujawa J, Janeczek M, Chrószcz A, Brudnicki W “*Morphology of the Lacrimal Gland and Superficial Gland of the Third Eyelid of Roe Deer (Capreolus Capreolus L.)*”. (2013) Pak Vet J, 33(2): 139-144
8. Toker N, **Marycz K**, Czogała J, Moll E, Grzesiak J, Janeczek M, Chrószcz A: “*Mast cell Morphological Heterogeneity: An Indicator of Skin Immune system Activation in Horse affected with Summer Eczema*” (2012) Journal of Animal and Veterinary Advances 11(21)4045-4045
9. Witek-Krowiak A, Podstawczyk D, Chojnacka K, Dawiec A, **Marycz K** “*Modelling and optimization of chromium^{III} biosorption on soybean meal*” (2013) Central European Journal of Chemistry 11, (9), 1505-1517
10. Kosiorowska A, Puggaard L, Hedemann MS, Sehested J, Jensen SK, Kristensen NB, Kuropka P, **Marycz K**, Vestergaard M.”*Gastrointestinal development of dairy calves fed low- or high-starch concentrate at two milk allowances*”. (2011) Journal of Animal Bioscience 5(2):211-9. doi: 10.1017/S1751731110001710.
11. Zimecki M, Kuryszko J, **Marycz K**. “*Calf thymus extract attenuates severity of experimental encephalomyelitis in Lewis rats*”.(2010) Folia Neuropathologica 48 (4): 246-257

12. Kaliński K, **Marycz K**, Czogała J, Serwa E: "*Mast cell identification and visualization by means of electron microscopy, immunohistochemistry and special staining methods in the course of canine atopic dermatitis*", (2012). EJPAU 15(1), #03.

Badania z tego zakresu prowadziłem we współpracy z: Panią dr inż. Izabelą Michalak z Instytutu Technologii Nieorganicznej oraz Nawozów Mineralnych Politechniki Wrocławskiej, Panią Prof. dr hab. Katarzyną Chojnacką z Instytutu Technologii Nieorganicznej oraz Nawozów Mineralnych Politechniki Wrocławskiej, Panią dr lek. wet. Joanną Klećkowską z Zakładu Anatomii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Panem dr hab. Maćkiem Janeczkiem z Zakładu Anatomii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Panem Prof. dr hab. Janem Kuryszko z Zakładu Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Panem dr n med. Krzysztofem Maksymowiczem z Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Prace z tego modułu tematycznego obejmują 12 publikacji z listy filadelfijskiej oraz 3 doniesień konferencyjnych prezentowanych na międzynarodowych konferencjach oraz kongresach naukowych. Zaliczane do wyżej omawianego modułu tematycznego publikacje dotyczą głównie:

- Zastosowania techniki łączonej SEM-EDX oraz ICP-OES w badaniu biosorpcji,
- Zastosowania mikroskopii elektronowej skaningowej i transmisyjnej w ocenie zmian morfologicznych oraz ultrastrukturalnych wybranych tkanek.

Mikroskopia elektronowa, zarówno transmisyjna jak i skaningowa stanowi cenne narzędzie poznawcze w naukach technicznych, biologicznych oraz medycznych. Wraz z postępem nauki oraz rozwojem zaawansowanych technologii, niezbędne staje się badanie coraz to mniejszych struktur, zarówno biologicznych jak i cząstek materii nieorganicznej. Dodatkowo, analiza morfologii oraz ultrastruktury materii organicznej, w tym komórek i tkanek pochodzenia zarówno roślinnego jak i zwierzęcego pozwala analizować przebieg



wybranych procesów fizjologicznych. Co więcej, zmiana warunków fizjologicznych znajduje swoje odzwierciedlenie w morfologii oraz ultrastrukturze już na poziomie komórki, co często jest pomijane w prowadzonych badaniach naukowych. Możliwość, nie tylko obrazowania zmian morfologicznych oraz ultrastrukturalnych jakie niesie za sobą mikroskopia elektronowa, ale również badanie rozmieszczenia poszczególnych pierwiastków chemicznych daje możliwość analizy min. procesów biosorpcji. Proces ten opiera się na wiązaniu jonów metali z roztworów wodnych przez biomasę. Ma on charakter bierny oraz nie podlega metabolizmowi komórkowemu [62]. Trwałe wiązanie pierwiastków chemicznych z materią nieożywioną może zachodzić na drodze absorpcji fizycznej lub chemicznej poprzez wymianę jonów, kompleksowanie, mikrostrącanie oraz chelatowanie [63]. Skuteczność procesu biosorpcji w dużej mierze zależy od morfologii komórki stanowiącej element wzbogacanej biomasy. Jej wielkość, kształt oraz topografia w tkance, stanowią między innymi o możliwych granicach wzbogacenia. Możliwość obserwacji zmian morfologicznych oraz ultrastrukturalnych wzbogacanej biomasy dostarcza informacji o skuteczności przeprowadzonego procesu biosorpcji. Ponieważ, większość prac traktujących o procesach sorpcyjnych wskazuje jedynie analityczną zawartość poszczególnych pierwiastków chemicznych w badanej biomacie istotnym wydaje się być precyzyjne wskazanie miejsca wiązania danego pierwiastka i jego rozkładu w komórce i/lub wzbogacanej tkance. Dlatego też podjąłem próbę analizy mikroskopowo-elektornowej z przystawką mikrorentgenowską (SEM-EDX) makroalg morskich z gatunku *Enteromorpha sp.*, w celu oceny ich zdolności sorpcyjnych następujących pierwiastków: Cu(II), Zn(II), Co(II) oraz Mn(II). Dodatkowo za pomocą optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnej (ICP-OES) oznaczono w biomacie ilościową koncentrację badanych pierwiastków. Przeprowadzone badania mikroskopowo-elektornowe wykazały, że w większości przypadków ściany komórkowe badanych alg adsorbowały analizowane pierwiastki. Jednocześnie zaobserwowano wypieranie naturalnie występujących tam jonów węgla, tlenu, siarki, chloru oraz wapnia. Powierzchniowe wiązanie pierwiastków chemicznych w obrębie ścian komórkowych świadczy o ograniczonych zdolnościach tego gatunku do biosorpcji. Jednak zestawienie obydwu technik badawczych umożliwiło komplementarną ocenę



procesów biosorpcji makroalgi *Enteromorpha sp* jony Cu(II), Zn(II), Co(II) oraz Mn(II). Podobne dane uzyskano w przypadku próby wzbogacania śruty sojowej w jony Cr³⁺. Łączone badania SEM-EDX oraz ICP-OES wykazały jedynie powierzchniowe zdolności wiązania jonów Cr³⁺ do ściany komórkowej śruty sojowej. Zupełnie inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku adsorpcji jonów chromu (III) w okrywie włosowej zwierząt dotkniętych syndromem metabolicznym. Z danych literaturowych wynika, iż chrom jest jednym z pierwiastków stosowanych w leczeniu insulinooporności u koni. Jednak w przypadku tego gatunku, nie opisane jest dzienne zapotrzebowanie chromu jak również jego zawartość w okrywie włosowej zdrowych zwierząt. Dlatego też, postanowiłem poddać badaniu strefę przymieszkową włosów, w celu określenia zawartości oraz rozkładu chromu u zdrowych jak i dotkniętych syndromem metabolicznym koni. Proces diagnostyczny tej jednostki chorobowej jest stosunkowo skomplikowany oraz nastęca wielu technicznych problemów terenowym lekarzom, którzy zazwyczaj nie dysponują zaawansowanym sprzętem diagnostycznym. Badanie łączone SEM-EDX oraz ICP-OES wykazało istotny deficyt tego pierwiastka w okrywie włosowej koni z insulinoopornością. Dzięki przeprowadzonym badaniom ustalono wartości normatywne zawartości jonów chromu w okrywie włosowej co stanowi łączone techniki pomocniczym narzędziem diagnostycznym w rozpoznaniu syndromu metabolicznego u koni. Podobnie w przypadku kamicy moczowej u psów, skaningowa mikroskopia elektronowa może stanowić cenne źródło informacji dotyczące procesu formowania się kamieni moczowych. Diagnostyka różnicowa tej jednostki chorobowej opiera się przede wszystkim na badaniu klinicznym, radiologicznym oraz ultrasonograficznym. Podstawowym materiałem badawczym w tej jednostce chorobowej są kamienie moczowe usuwane w trakcie zabiegów operacyjnych lub badanie sedymentów w moczu. Przeprowadzone badania mikroskopowo-elektronowe z zastosowaniem przystawki mikrorentgenowskiej (SEM-EDX) wykazały sferyczne układanie się wybranych pierwiastków na przekroju poprzecznym badanych kamieni moczowych. W związku z takim charakterem tworzenia się kamieni moczowych, możliwość obrazowania jądra krystalizacji jest cenną informacją kliniczną, ponieważ określenie typu kamienia uzależnione jest od pierwiastka tworzącego jego centralną część. W konsekwencji, taka



wiedza pozwala na zastosowanie odpowiedniego leczenia. Zaawansowane badanie obrazowe ze wskazaniem jakościowej zawartości jądra krystalizacji poszczególnych typów kamieni moczowych jest również miarodajną techniką oceny możliwości rozpuszczania kamieni pod wpływem określonych substancji chemicznych. W tym celu zgromadzone wcześniej kamienie moczowe, pobrane przez terenowych lekarzy weterynarii, poddałem próbie rozpuszczania z zastosowaniem ekstraktów z hibiskusa (*Hibiscus rosa-sinensis*) oraz dzikiej róży (*Rosa canina L.*). Substancje te w formie ekstraktów roślinnych mogłyby służyć jako dodatki paszowe dla zwierząt cierpiących na kamień moczową. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, iż ekspozycja szczawianów wapnia na badane ekstrakty prowadziła do uwalniania się jonów Ca^{2+} do medium hodowlanego. Zastosowanie skaningowej mikroskopii elektronowej pozwoliło na ocenę zmiany morfologii badanych kamieni poddanych działaniu ekstraktów roślinnych. Dodatkowo w łączonym badaniu z fotometrią płomieniową ustalono, iż 72h inkubacja szczawianów wapnia z badanymi ekstraktami prowadziła do istotnego wzrostu poziomu Ca^{2+} w medium z równoczesną zmianą kształtu i faktury powierzchni badanych kamieni. Uzyskane dane wskazują na przydatność skaningowej mikroskopii elektronowej w ocenie substancji aktywnie czynnych o potencjale terapeutycznym w przebiegu kamicy moczowej u małych zwierząt. Dodatkowo należy stwierdzić, że badania z zastosowaniem SEM-EDX mogą być cennym narzędziem pomocniczym w diagnostyce różnicowej kamicy moczowej u psów.

Możliwość obrazowania zmian morfologicznych jak i ultrastrukturalnych z zastosowaniem wysokich powiększeń zapewnia transmisyjna mikroskopia elektronowa. Narzędzie to dzięki możliwości obrazowania w wysokiej rozdzielczości pozwala na ocenę zmian ultrastrukturalnych na poziomie komórki. Własność ta znajduje szerokie zastosowanie w zaawansowanych technikach diagnostyczno-badawczych. Obraz powstający na skutek prześwietlania wiązką elektronową ultracienkich skrawków umożliwia obserwację obszarów o różnej gęstości elektronowej w obrębie pojedynczych komórek. Informacje te często korelują ze statusem fizjologicznym organizmu dostarczając informacji o toczących się, na poziomie komórkowym, procesach patologicznych organizmu. Mając na uwadze powyższe postanowiłem zastosować



transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) w badaniu cytoaktywności komórek tucznych, jako markera diagnostycznego w przebiegu atopowego zapalenia skóry u psów, jak również w przebiegu letniej egzemy u młodych koni. Komórki tuczne w obrębie cytoplazmy posiadają liczne, ciemne, zasadochłonne ziarnistości, zawierające głównie histaminę oraz heparynę. W stanie aktywnym wydzielają znaczne ilości prostaglandyn, cytokin (np. interleukinę 4 i TNF- α) oraz proteaz do przestrzeni międzykomórkowej przyczyniając się tym samym do rozwoju lokalnego stanu zapalnego. Sposób degranulacji mastocytów wydaje się być istotny z punktu widzenia określonej jednostki chorobowej. I tak, w przypadku atopowego zapalenia skóry u psów zaobserwowałem całkowitą degranulację mastocytów nazwaną w literaturze typem anafilaktycznym. Badania z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazały obecność gęstych elektronowo ziarnistości, występujących poza obwodem komórki w jej najbliższym otoczeniu. Dodatkowo, w trakcie całkowitej degranulacji mastocytów zaobserwowano obkurczanie się komórek oraz przesunięcie się jądra komórkowego na jeden z biegunów komórki. Z kolei letnia egzema u młodych koni przebiega z przewagą częściowej degranulacji komórek tucznych, zwłaszcza w początkowych fazach choroby. Sposób takiej aktywacji nazwano typem „piec meal”. Co ciekawe, obraz kliniczny u badanych koni ściśle korelował z typem aktywacji komórek tucznych. Wraz z nasileniem się zmian skórnych oraz wzrostem świądu mastocyty ulegały degranulacji typu mieszanego oraz anafilaktycznego. Podsumowując, należy podkreślić, iż zaawansowane techniki mikroskopowo-elektronowe mogą być, nie tylko cennym źródłem informacji w badaniach naukowych, ale również narzędziem pomocniczym w diagnostyce medyczo-weterynaryjnej.

6. Plany na przyszłość

W kolejnych etapach mojej pracy naukowej będę skupiał swoją uwagę na poszukiwaniu sposobów wydajnych metod protezowania ubytków tkanki kostnej oraz chrzęstnej z zastosowaniem wybranych technik inżynierii biomateriałowej. W tym celu chciałbym opracować autologiczne, bioaktywne rusztowania tkankowe z zawieszonymi w nich komórkami macierzystymi – różnego pochodzenia. Jako uzupełnienie terapii regeneracyjnej planuje zaangażować się w konstrukcję urządzeń rehabilitacyjnych, które



poprawiałyby zdolność proliferacyjną komórek mezenchymalnych po ich przeszczepieniu. Dodatkowo, planuje opisać morfologię, ultrastrukturę oraz właściwości cytofizjologiczne komórek pluripotentnych izolowanych z tkanki tłuszczowej wybranych gatunków zwierząt oraz opracować metodę wydajnej ich izolacji i hodowli. Ten etap badań chciałbym zakończyć porównaniem potencjału regeneracyjnego komórek macierzystych pochodzenia stromalnego z komórkami pluripotentnymi w leczeniu wybranych schorzeń aparatu ruchu u zwierząt.

7. Literatura:

- [1] Mason C., Dunnill P. "A brief definition of regenerative medicine" *Future Medicine* 3 (2008) 1-5
- [2] Andrae J., et al. "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine" *Genes & Dev.* 22 (2008) 1276-1312
- [3] Minguell J.J., et al. 'Mesenchymal stem cells' *Exp. Biol. Med.* 226 (2001) 507-520
- [4] Pittenger M.F., et al. 'Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells' *Science* 284 (1999) 143-147
- [5] Charriere G., et al. 'Preadipocyte conversion to macrophage' *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9850-9855
- [6] Barry F.P., Murphy J.M. 'Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization' *Stem Cells* 36 (2004) 568-584
- [7] Zhu, Y., et al. 'Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC' *Cell Bioch. Funct.* 26 (2008) 664-675
- [8] Zuk, P.A., et al. 'Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells' *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 4279-4295
- [9] Gimble J.M., et al. 'Adipose-derived stem cells for regenerative medicine' *Cir. Res.* 100 (2007) 1249-1260
- [10] Kern S., et al. 'Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue' *Stem Cells* 24 (2006) 1294-1301
- [11] Park K.H., et al. 'Treatment of Collagen Induced Arthritis with Human Adipose-Derived, Bone Marrow-Derived and Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells' *Arthritis & Rheumatism* 63 (2011) abstract supplement
- [12] Vidal M.A., et al. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow, *Vet. Surg.* 37 (2008) 713-724



- [13] Dominici M., et al. 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells' The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315-317
- [14] Strem B.M., et al. 'Multipotential differentiation of adipose-derived stem cells' *Keio J. Med.* 54 (2005) 132-141
- [15] Aggarwal S., Pittinger M.F. 'Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses' *Blood* 105 (2005) 1815-1822
- [16] Boquest A.C., et al. 'Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture' *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 1131-1141
- [17] Caplan A.I. 'Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine' *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 341-347
- [18] Keilhoff G., et al. 'Transdifferentiated mesenchymal stem cells as alternative therapy in supporting nerve regeneration and myelination' *Cell Mol. Neurobiol.* 7-8 (2006) 1233-1250
- [19] Harman R.J., et al. 'A retrospective review of 52 cases of suspensory ligament injury in sport horses treated with adipose-derived stem and regenerative cells' *Proc. Vet. Orthop. Soc.* 34/28 (2007)
- [20] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ: 'Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication'. *Leukemia* 20: 1487-1495, 2006.
- [21] Carter SD, Barnes A, Gilmore WH: Canine rheumatoid arthritis and inflammatory cytokines. *Vet Immunol Immunop*, 69(2-4): 201-214, 1999.
- [22] Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, Gingerich DA, Harman. "Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther* 8(4): 272-84.2007
- [23] Luna SPL, Basilio AC, Steagall PVM, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, Brandao CVS: "Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am J Vet Res*, 68 (3): 258-263, 2007
- [24] Erpek S, Kılıç N, Kozacı LD, Dikicioğlu E, Kavak T: "Effects of flunixin meglumine, diclofenac sodium and metamizol sodium on experimental wound healing in rats". *Rev Med Vet*, 157 (4): 185-192, 2006.



- [25] Crofford LJ: COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl* 1997, 49:15-19.
- [26] Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004, 56:387-437.
- [27] Marciniak J. „Biomateriały” Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002
- [28] Łaskawiec J., Michalik R. „Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach” Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002
- [29] Erli H.J., Ruger M., Rago C., Jahnen-Dechent W., Hollander D.A., Paar O., von Walter M. ‘The effect of surface modification of a porous TiO₂/perlite composite on the ingrowth of bone tissue in vivo’ *Biomaterials* 27 (2006) 1270-1276
- [30] Ross MW, Dyson SJ. “Diagnosis and Management of Lameness in the Horse”. 1 st ed. Saunders Co., Missouri. 616–628. (2003)
- [31] Keegan KG, Twardock AR, Losonsky JM, Baker GJ: “Scintigraphic evaluation of fractures of the distal phalanx in horses: 27 cases (1979–1988)”. *Journal of the American Medical Association* 202, 1993–1997.
- [32] Vanderweerd JME, Perrin R, Launois T, Brogniez L, Clegg PD, Desbrosse FG: “Use of computed tomography in standing position to indentify guidelines for screw insertion in the distal phalanx of horses: an ex vivo study”. *Veterinary Surgery* 38, 373–379, (2009)
- [33] Maruszewski K. “Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach.” Wyd. Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2000
- [34] Areva S, Paldan H, Peltola T, Närhi T, Jokinen M, Lindén M. “Use of sol-gel-derived titania coating for direct soft tissue attachment” *J Biomed. Mater. Res. A.* 70 169-78, 2004
- [35] Arcos D, Vallet-Regí M. “Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration”. *Acta Biomater.* 6 2874-88. 2010
- [36] Cao F, Li DX. 2009 Morphology-controlled synthesis of SiO₂ hollow microspheres using pollen grain as a biotemplate *Biomed. Mater.* 4 025009
- [37] Krzak-Roś J, Filipiak J, Pezowicz C, Baszczuk A, Miller M, Kowalski M, Bedziński R “The effect of substrate roughness on the surface structure of TiO(2), SiO(2), and doped thin films prepared by the sol-gel method” *Acta Bioeng Biomech* 11 21-9. 2009
- [37A] www.chemat.com
- [38] Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. “Biomaterials in orthopaedics” *J R Soc Interface* 5 1137-58. 2008



- [39] Zippel N, Schulze M, Tobiasch E. 2010 Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent Pat Biotechnol* 4 1-22
- [40] Falconi M, Salvatore V, Teti G, Focaroli S, Durante S, Nicolini B, Mazzotti A, Orienti I. 2013 Gelatin crosslinked with dehydroascorbic acid as a novel scaffold for tissue regeneration with simultaneous antitumor activity. *Biomed Mater.* 8 035011
- [41] Wang Y, Singh A, Xu P, Pindrus MA, Blasioli DJ, Kaplan DL 2006 Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer *Biomaterials* 27 3265-73.
- [42] Frisbie DD, Smith RK (2010): Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary Journal* 42, 86–89.
- [43] Smith, RK. and P.M Webbon, 2005 Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br. J. Sports Med*, 39:582-584
- [44] HaVememann, A.C.: Anleitung zur Beurteilung des äußeren Pferdes in Beziehung auf dessen Gesundheit und Tüchtigkeit zu verschiedenen Dinsten. Wien 1816.
- [45] Rooney J.R.: A Theoretical Analysis of Equine Arthritis. „*Equine Vet. J.*”, 1969, vol. 1, 117-126
- [46] Barneveld A.: Einzelne klinische Aspekte des Spates. “IV Tagung über Pferdekrankheiten im Rahmen der Equitana”, Essen 1981, 65-71.
- [47] Wintzer H.J.: Krankheiten des Pferdes. Verlag Parey, Berlin 1982, 230-242.
- [48] See Y.: Intra-synovial corticosteroid injections in juvenile chronic arthritis, A review *Annals. “Academy of Medicine”*, 1998, vol. 1, 105-111.
- [49] Ho ENM, Leung DKK, Wan TSM, Yu NH (2006) Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatography A* 1120: 38-53.
- [50] Adams, O.R. 1970 Surgical Arthrodesis for Treatment of Bone Spavin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 157, s. 1480-1485.
- [51] Nagrajan S., 2009 *Applied Surface Science*, 255, 3927-3932;
- [52] Malekmohammadi F., 2011 *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357, 1141-1146;
- [53] Viitala R., Jokinen M., Peltola T., Gunnelius K., Rosenholm J.B., 2002 *Biomaterials*, 23, 3073
- [54] Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA 2008 Biomaterials in orthopaedics *J R Soc Interface* 5 1137-58
- [55] Zippel N, Schulze M, Tobiasch E. 2010 Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Recent Pat Biotechnol* 4 1-22



- [56] Sella C, Martin JC, Lecoeur J, Bellier JP, Harmand MF, Naji A, Davidas JP, Le Chanu A. 1990 Corrosion protection of metal implants by hard biocompatible ceramic coatings deposited by radio-frequency sputtering *Clin Mater.* **5** 297-307
- [57] Okazaki Y, Gotoh E, Manabe T, Kobayash 2004 Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants *Biomaterials* **25** 5913-20
- [58] McGregor DB, Baan RA, Partensky C, Rice JM, Wilbourn JD. 2000 Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies - a report of an IARC Monographs Programme Meeting. International Agency for Research on Cancer. *Eur J Cancer.* **36** 307-13
- [59] Manivasagam G, Dhinasekaran D, Rajamanickam A 2010 Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention *Recent Patents on Corrosion Science* **2** 40-54
- [60] Zhenga CY, Niea FL, Zhenga YF, Chengb Y, Weic SC, Ruand L, Valieve RZ 2011 Enhanced corrosion resistance and cellular behavior of ultrafine-grained biomedical NiTi alloy with a novel SrO-SiO₂-TiO₂ sol-gel coating *App. Surf. Sci.* **257** 5913-18
- [61] Donesz-Sikorska A, Krzak-Roś J, Kochanowska IE, Będziński R and Kaleta J 2012. New specific metal-silica biocomposites for medical implants *J Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **8** 1-9
- [62] I. Davis T.A., Volesky B., Mucci A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal bio-sorption by brown algae. *Water Res.* **37**: 4311-4330
- [63] Veglio F., Beolchini F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* **44**: 301-316 [A] Owen R. Fennema: Food Chemistry. (Third Edition), University of Wisconsin – Madisin, Marcel Dekker, Inc., 1996, p. 559-568. [B] Praca zbiorowa pod redakcją Zdzisława E. Sikorskiego: Chemia żywności. Wydanie trzecie. Warszawa: Wyd. Naukowo – Techniczne, 2000, s. 404-406.
- [C] Czernecki T.: Słów parę o kwasie L-askorbinowym (witamina C), Journal of NutriLife, 2012, 05, ISSN:2300-8938, url: <http://www.NutriLife.pl/index.php?art=18>

