

PIOTR MICHAŁ WILCZEK

Dane biograficzne:

Data urodzenia: 09.04.1965

Miejsce urodzenia: Zabrze

Stan cywilny: żonaty, 1 dziecko

Narodowość: polska

Obywatelstwo: polskie

Adres i telefon prywatny

Ul. Dąb 67

43-608 Jaworzno

woj. Śląskie

Tel.: +48 32 616 60 32

Tel. kom.: +48 660 404 371

E-mail : mildes@post.pl

Adres i telefon służbowy

Instytut Protez Serca Fundacji

Rozwoju Kardiologii

Pracownia Bioinżynierii

ul. Wolności 345A

41-800 Zabrze

Tel. +48 32 373 5631

Edukacja:

1980 – 1984	II Liceum Ogólnokształcące im. Gen. W. Świerczewskiego, Zabrze
Maj 1984	Egzamin maturalny
1984 – 1986	Medyczne Studium Zawodowe, Zabrze
1988 – 1993	studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Czerwiec 1993	Złożenie egzaminu magisterskiego w Katedrze Fizjologii Człowieka i Zwierząt „pracy Aktywność karboksyloesteraz u pajaków w warunkach zanieczyszczonego środowiska”
Marzec 2004	Obrona Dysertacji na Stopień Doktora Nauk Medycznych „Zmiany wybranych komórek immunokompetentnych u pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca w krążeniu pozaustrojowym oraz bez krążenia pozaustrojowego” promotor - prof. dr hab. Zbigniew Religa

Zatrudnienie:

1990 – 1993	Katedra Fizjologii Człowieka i Zwierząt (obecnie Katedra Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii) Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
1993 do nadal	Instytut Protez Serca Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrzu

Staż i szkolenia zagraniczne:

1. 1993: Niemcy, Heilderberg, Training Centre Neckargemund, szkolenie w zakresie techniki cytometrii przepływowej; 1 tydzień
2. 1999: Włochy, Pomezia-Rzym, Laboratory of Tissue Engineering, Istituto Dermatologico dell' Immacolata Pomezia, techniki hodowli keratynocytów; 1 tydzień
3. 2000: Niemcy, Berlin, Charite Klinikum Berlin, szkolenie w zakresie badań immunologicznych ze szczególnym uwzględnieniem typowania HLA oraz oznaczania PRA (panelu reaktywnych przeciwciał) w odniesieniu do przeszczepów serca; 1 tydzień

4. 2007: Belgia, Ghent – Szkolenie w firmie Becton Dickinson w zakresie sortowania komórkowego; 1 tydzień
5. 2010: USA, Columbus, Ohio State University, Stem Cell Research Group Training. 1 tydzień
6. 2010: Francja, Grenoble, Nanotechnology Research Group Training on „Cardiovascular biomedical engineering” ; 1 tydzień

Szkolenia odbyte w Polsce:

1. 1997: International Course in Confocal Imaging, Flow Cytometry & Image Analysis”, Kraków
2. 2000: Zakażenia HIV i AIDS – zagadnienia kliniczno-epidemiologiczne, profilaktyka i postępowanie poekspozycyjne, Zabrze
3. 2004: Clinical trials and pharmacovigilance impact of EU legislation, Katowice
4. 2008 – Brytyjsko Polskie Forum Ochrony Zdrowia, 18 czerwca 2008, Zabrze
5. 2008 – WG2 Cost 537 – Training Scholl - Core Laboratories for the improvement of the medical devices in Clinical Practices from the failure of the explanted prostheses analysis, 15-17 Maj 2008, Zabrze.
6. 2008 – Warsztaty Transplantacyjne “ Przeszczep Płuca – co poza opieką lekarską jest niezbędne do funkcjonowania programu”, 28 sierpień 2008, Zabrze
7. 2008 – Warsztaty Leczenie wad zastawek serca - nowe wyzwania – Fundacja Rozwoju Kardiologii w Zabrzu (organizator warsztatów).
8. 2008 – WG2 Cost 573 – Training School – Core Laboratories for the improvement of medical devices in Clinical Practices from the failure of the explanted prostheses analysis (FEPA) Zabrze.
9. 2009 – Kliniczne możliwości przygotowania preparatów allogenny przygotowanych przez NZOZ “FRK Homograft”, Zabrze
10. 2009 – IV Śląskie Warsztaty Immunologii Klinicznej – Immunologia Kliniczna Wspólna Droga wielu specjalności, Michał Zembala, Piotr Wilczek – Komórki pnia/progenitorowe mięśnia sercowego – jak daleko do aplikacji klinicznej, 18 Maj 2009, Zabrze
11. 2009 – Warsztaty naukowe w ramach grupy „Cardio Team” - Wilczek P. : Heart Valve Prosthesis – Is This A Right Time For Tissue Engineering, Zabrze
12. 2010 – Konferencja „Nauka i Technika Zmieniają Zabrze” - współorganizowana przez Urząd Miejski w Zabrzu. Patronat honorowy objął Wicepremier i Minister Gospodarki Waldemar Pawlak
R. Przybylskiego, P. Wilczka i M. Zembalę - : „W jaki sposób Zabrzeńska kardiologia i Kardiologia podejmuje wyzwanie wobec najtrudniejszych chorych z uszkodzonymi zastawkami serca”
Wilczek P, Zembala M. „Macierzyste komórki sercowe – gdzie jesteśmy w 2010 roku i dlaczego trzeba intensywnie rozwijać program możliwej naprawy serca”
13. 2010 – CardioBioMat – Nanostructural Materials for Implants and Cardiovascular Biomedical Devices. 15-16 grudnia 2010, Kraków-Zabrze (organizator konferencji).
14. 2011 – Szkolenie dla personelu banków tkanek i komórek oraz osób uczestniczących w pobieraniu i przeszczepianiu narządów, Narodowy Program Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej. Szkolenie realizowane przez Ministerstwo Zdrowia pod nadzorem merytorycznym Centrum Organizacyjno – Koordynacyjnego do spraw transplantacji „POLTRANSPLANT” i Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek, 7-8 października 2011, Chorzów.

15. 2011 – Conference and Workshop on Human Transplants Identification and Monitoring in European Union Quality and Safety Standards, 7-8 października 2011, Chorzów
16. 2011 – Narodowy Program Rozwoju Medycyny Transplantacyjnej. Szkolenie realizowane przez Ministerstwo Zdrowia pod nadzorem merytorycznym Centrum Organizacyjno-Koordynacyjnego do spraw transplantacji „POLTRANSPLANT” i Krajowego Centrum Bankowania Tkanek i Komórek, 7-8 października 2011, Chorzów

Zainteresowania naukowe ogólne

Zainteresowania naukowe koncentrują się na zagadnieniach związanych z medycyną regeneracyjną oraz inżynierią tkankową i obejmują:

- badania cech morfologicznych i biomechanicznych biologicznych rusztowań tkankowych poddanych procesom fizycznej i chemicznej modyfikacji
- badania architektury i mikrośrodowiska macierzy zewnątrzkomórkowej
- badania oddziaływań macierzy zewnątrzkomórkowej z elementami układu płytkowego
- badanie dotyczące analogów tkankowych
- modyfikacja powierzchniowa tkanek kolagenowych oraz materiałów syntetycznych dedykowanych do zastosowań biomedycznych.
- badania potencjału regeneracyjnego komórek progenitorowych i macierzystych

Bieżące szczegółowe zainteresowania naukowe

- Biomechanika tkanek kolagenowych obejmująca analizę wartości krytycznych naprężeń w funkcji deformacji tkanki, granicy plastyczności i sprężystości tkanki.
- Badanie zmian morfologicznych tkanek poddanych modyfikacji z zastosowaniem czynników fizycznych i chemicznych w korelacji do zmian ich własności biomechanicznych.
- Badania zależności cech biomechanicznych tkanek w odniesieniu do hemodynamiki układu sercowo-naczyniowego. W tym ocena wpływu właściwości biomechanicznych zastawek serca na dynamikę pracy, rozkład deformacji oraz naprężeń zastawek.
- Badania efektywności procesów acellularyzacji wykorzystujących czynniki enzymatyczne oraz chemiczne. Ocena zdolności do zasiedlania komórkowego acellularnych matryc, adhezji i migracji komórkowej w aspekcie możliwości stymulowania procesów remodelowania tkanek z uwzględnieniem mechanizmów mechanotransdukcji.
- Badanie mechanizmów aktywacji układu płytkowego i adhezji płytek krwi w kontakcie z powierzchnią modyfikowanych tkanek kolagenowych oraz materiałów syntetycznych dedykowanych do długoterminowego kontaktu z krwią.
- Modyfikacja powierzchniowa i funkcjonalizacja materiałów biologicznych oraz syntetycznych jako czynnik modulujący oddziaływanie komórek somatycznych z modyfikowaną powierzchnią.
- Badania efektów parakrynowych mesenchymalnych komórek zrębu poddanych enkapsulacji w biozgodnych kapsułach alginianowych.

Nagrody i wyróżnienia

1. 2004 – Wyróżnienie Rady Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej, 01.04. 2004, Katowice
2. 2009 – Nagroda naukowa Europejskiego Stowarzyszenia Chirurgii Sercowo Naczyniowej - 7th Cardiac Scientific Session. ESCVS Young Cardiac Surgeon Prize. Za pracę: Zembala M., Wilczek P., Cichoń T., Smolarczyk R., Śliwka J., Sokal A., Szala S., Zembala M.: Human

Cardiac Stem Cells are Present in Severely Damaged, Ischemic Myocardium. Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery. Suppl.1 Vol 8 (April 2009. 8-0- DOI: 10.1510/icvts.2009.0000S3. http://icvts.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/8/suppl_1/iii

3. 2010 – Konferencja: “5th World Congres on Preventive and Regenerative Medicine”, Hanover 2010 –członek Rady Naukowej Konferencji.
 4. 2011 – Brązowy Krzyż Zasługi - Za Szczególne Zasługi dla Rozwoju Kardiologii
 5. 2012 – Nagroda Naukowa im. Profesora Zbigniewa Religi w dziedzinie bioinżynierii
- Wykłady na zaproszenie**
6. 2010 – XIX Konferencja AMT; Advanced Materials and Technologies 2010 – Heart valve bioprosthesis; effect of different acellularization methods on the biomechanical and morphological properties of porcine aortic and pulmonary valve. 20 – 23 czerwca 2010, Zakopane
 7. 2012 – II konferencja naukowa Stowarzyszenia Kardiologów Interwencyjnych - Biological materials: obtaining and treatment. 6-8 września 2012, Ustron
 8. 2012 – II konferencja naukowa Stowarzyszenia Kardiologów Interwencyjnych – Cardiac Stem cells in the treatment of cardiovascular disease. 6-8 września 2012, Ustron
 9. 2012 – X – lecie Opolskiej Kardiologii– Inżynieria Tkankowa – nowe wyzwania i nadzieje. 30 listopada 2012, Opole
 10. Konferencja „Nauka i Technika Zmieniają Zabrze” pod patronatem honorowym wicepremiera i ministra gospodarki Wldemara Pawlaka - „W jaki sposób Zabrzeńska kardiologia i Kardiologia podejmuje wyzwanie wobec najtrudniejszych chorych z uszkodzonymi zastawkami serca” oraz „Macierzyste komórki sercowe – gdzie jesteśmy w 2010 roku i dlaczego trzeba intensywnie rozwijać program możliwej naprawy serca” data
 11. 2013 – II Konferencja Naukowa Sekcji Wad Zastawkowych Serca Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego– Niedopasowanie zastawki serca w opinii biofizyka. 5-6 kwietnia 2013, Wisła
 12. 2013 – XVII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego - Inżynieria tkankowa czy można wyprodukować „części zamienne”, 26-28 września 2013, Wrocław
 13. Webinarium - Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca ”POIG 1.3.1 data
 14. 2013 – Konferencja przedsiębiorczy, czyli innowacyjny. Czy warto inwestować w projekty innowacyjne? Katowice 12 listopada 2013 – członek panelu eksperckiego
 15. 2013 – Innovative Technologies for Medicine – For Heart. 5-7 grudzień, 2013, Białystok
 16. Kluczowe projekty innowacyjne integrujące środowisko medyczne i branże komplementarne w województwie śląskim – członek panelu eksperckiego. Katowice Urząd Marszałkowski data

Recenzje wydawnicze dla redakcji czasopism naukowych

1. Zhou J, Shu Y, Lü SH, Li JJ, Sun HY, Tang RY, Duan CM, Wang Y, Lin QX, Mou YC, Li X, Wang CY. The Spatiotemporal Development of Intercalated Disk in Three-dimensional Engineered Heart Tissues Based on Collagen/Matrigel Matrix **PlosOne**, 2013 Nov 15;8(11):e81420. doi: 10.1371/journal.pone.0081420. eCollection 2013.
2. Lígia Pereira Bré, Ray McCarthy, Wenxin Wang: Prevention of Bioprosthetic Heart Valve Calcification: Strategies and Outcomes. Special Issue: **Advanced Biomaterials for Current Drug Development**.
3. 27 recenzji dla czasopisma **Materials Science and Engineering C**

Autoreferat

Rozwój zawodowy i naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

Po studiach podjąłem pracę w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii w pracowni Biologicznej Zastawki Serca. W ramach działalności pracowni opracowywano sposób przygotowania biologicznych zastawek serca z zastosowaniem metod głębokiego mrożenia w oparach ciekłego azotu. Zastosowanie techniki krioprezerwacji tkanek miało na celu zachowanie optymalnej żywotności komórek w tworzonych bioprotezach zastawek serca, co powinno sprzyjać utrzymaniu naturalnych procesów remodelowania i naprawczych w protezach zastawek serca. Zadanie jakie zostało mi powierzone dotyczyło utworzenia laboratorium hodowli komórkowych i pracowni cytometrii przepływowej w zakresie doboru i zakupu sprzętu. Do moich zadań należało także opracowanie procedur służących ocenie jakościowej i ilościowej komórek izolowanych z krioprezerwowanych zastawek biologicznych, wykorzystując do tego techniki hodowli komórkowych oraz cytometrii przepływowej. Ze względu na model badawczy oraz zastosowane techniki prace te miały charakter innowacyjny. W tym czasie odbyłem szkolenie z zakresu cytometrii przepływowej w Training Centre Neckargemund w Heilderbergu (Niemcy). Odbyłem również szkolenie w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu z zakresu technik hodowli komórkowych. Podstawą prowadzonych badań było założenie, że proces przygotowywania bioprotez zastawkowych może oddziaływać na żywotność komórek w obrębie modyfikowanych tkanek kolagenowych. Czynniki, które w istotny sposób mogłyby wpływać na kondycję komórek są rodzaj i stężenie antybiotyków oraz substancji grzybobójczych, czas ekspozycji i temperatura zastosowanej kąpeli odżywczo sterylizującej. Również rodzaj zastosowanego czynnika krioprotekcyjnego został zidentyfikowany jako czynnik mogący w istotny sposób modulować żywotność komórek. W prowadzonych badaniach oceniany był wpływ kąpeli antybiotykowej zawierającej wankomycynę (50mg/L), linkomycynę (120mg/L), cefoxitin (240mg/L), polymyxin B (100mg/L) oraz Diflucan (20mg/L) na żywotność fibroblastów we fragmentach tkanek zastawki aortalnej i płucnej. Czas ekspozycji na działanie antybiotyków i czynników grzybobójczych wynosił 48 h. Dodatkowo oceniano również żywotność fibroblastów w tkankach poddanych procedurze głębokiego mrożenia i przechowywania w oparach ciekłego azotu (-170 °C). Badania te wykazały, że istotny spadek żywotności obserwowano w tkankach po procesie głębokiego mrożenia. W dalszej kolejności prowadzone przeze mnie badania miały na celu porównanie cytotoksyczności Polymixin B oraz Ciprobay zastosowanych w stężeniu 20 mg/L oraz 60 mg/L. Porównanie mechanizmu działania tych antybiotyków wskazuje, że Polymyxin oddziałuje na błonę komórek bakteryjnych, ale działa również niespecyficznie na błonę komórek eukariotycznych. W związku z tym, może istotnie wpływać na żywotność komórek w obrębie tkanki zastawek serca eksponowanych na działanie Polymyxin B jak również zwiększać czułość błony komórkowej na działanie innych stresorów. Tego rodzaju zależności nie były obserwowane w przypadku użycia Ciprobay, co potwierdzone zostało w przeprowadzonych przeze mnie badaniach. Prace badawcze dotyczące oceny żywotności komórek w krioprezerwowanych zastawkach serca były następnie kontynuowane w badaniach *in vivo* na modelu zwierzęcym. Badania te prowadziłem pod kierunkiem dr J. Nożyńskiego. Jako model eksperymentalny zostały wybrane młode jednoroczne owce. Zwierzętom tym wszczepiano w pozycję trójdzielną, sterylizowane antybiotykami i krioprezerwowane biologiczne zastawki serca na okres jednego roku. Po tym czasie zastawki wszczepiano i materiał tkankowy poddawany był analizie histologicznej, stosując barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E) oraz barwienie trichromem Massona (Trichromeme Massona). Dzięki temu możliwa była ocena ultrastruktury i morfologii eksplantowalnych tkanek. Z kolei żywotność komórkową oceniano z zastosowaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej, wykorzystując barwniki przyżyciowe: dwuoctan fluoresceiny (FDA), który wykazuje zieloną fluorescencję i barwi komórki żywe oraz jodek propidyny (PI) barwiący komórki nekrotyczne i wykazujący fluorescencję czerwoną. Otrzymane wyniki wskazywały, że sterylizacja tkanek z zastosowaniem kąpeli antybiotykowej oraz proces głębokiego mrożenia indukują zmiany w obrębie badanych tkanek w postaci obrzęków płatków zastawek oraz zmian degeneracyjnych w ultrastrukturze. Powodują również nekrozę i apoptozę komórek. Zaobserwowano, że w eksplantowanych po roku tkankach zachowana jest warstwa komórkowa, lecz jednak w jej obrębie widoczne są w badaniach mikroskopowych liczne zmiany degeneracyjne. W dalszej kolejności współuczestniczyłem w badaniach dotyczących

matematycznej analizy kalcyfikacji w implantowanych zastawkach serca. Podobnie jak w poprzednich badaniach, model eksperymentalny stanowiły młode jednoroczne owce, którym wszczepiono krioprezerwowane stentowe zastawki płucne. Zastawki te były wyszczepiane po 12 miesiącach. Analizy histologiczne opierały się na barwieniach hematoksyliną i eozyną, trichromem Massona oraz w celu uwidocznienia miejsc kalcyfikacji zastosowano również barwienie Van Kossa. Do analiz matematycznych wybrano: obszar i średnicę równoważoną, długość, szerokość, obwód, wydłużenie, okrągłość oraz współczynnik wypełnienia miejsc kalcyfikacji. W wyniku przeprowadzonych badań wysunięto wnioski mówiące o tym, że proces wstępnej obróbki i kriokonserwacji zastawki biologicznej przyczynia się do zwiększenia wymiaru i zaburza kształt mikrozwapnień. Krioprezerwowane zastawki biologiczne serca po okresie jednego roku od wszczepienia wykazywały mikrozwapnienia i ogniska zwapnienia. Stwierdzono również, że wielkość mikrozwapnień maleje wraz z nasileniem procesów zwyrodnieniowych tkanki łącznej, w szczególności z nasileniem procesów zwyrodnienia szklanego. Wysunięto wnioski, że zwyrodnienie szkliste obserwowane w krioprezerwowanych biologicznych zastawkach serca, wydaje się oddziaływać korzystnie na trwałość zastawek serca, powodując jednocześnie ograniczenie procesów wapnienia. Analiza matematyczna wykazała morfologiczną i morfometryczną autonomię wapnienia charakterystyczną dla zmian patomorfologicznych w analizowanej grupie zastawek serca. W innych pracach opartych na tym samym modelu badawczym, porównując procesy wapnienia, zwyrodnienia szklanego oraz reakcji zapalnej stwierdzono podobieństwo zmian generowanych przez zwyrodnienie szkliste oraz proces zapalny. Kontynuując temat związany z oceną żywotności komórkowej w obrębie tkanek zastawek serca współuczestniczyłem również w opracowywaniu powtarzalnej i szybkiej metody oceny żywotności komórkowej. W tym celu materiał tkankowy podzielono na dwie grupy: a) tkanki pobierane przy czasie ciepłego niedokrwienia nie przekraczającym 3 godzin, b) tkanki pobierane przy czasie ciepłego niedokrwienia przekraczającym 3 godziny. Analiza wyników wykazała, że w grupie tkanek, w której czas ciepłego niedokrwienia nie przekraczał 3 godzin, obserwowana była liczna grupa żywych komórek i jedynie nieliczne komórki nekrotyczne. W tkankach pobieranych przy czasie ciepłego niedokrwienia przekraczającym 3 godziny odnotowano istotnie większą liczbę komórek nekrotycznych. Badania te jednocześnie potwierdziły, że jednostopniowe barwienie z zastosowaniem barwników przyżyciowych jest prostą i szybką metodą umożliwiającą różnicowanie komórek żywych i martwych i może być przydatna w rutynowej ocenie jakości homograftów pobieranych ze zwłok.

Ze względu na nabyte doświadczenie w zakresie technik hodowli komórkowych, w kolejnych latach mojego rozwoju zawodowego zainteresowałem się tematyką hodowli keratynocytów, które mogłyby być wykorzystane dla celów klinicznych. Powodem tego zainteresowania był fakt, że problem trudno gojących się ran stanowił wciąż istotny problem kliniczny, a dotyczył również pacjentów kardiochirurgicznych, u których obserwowane były incydenty przewlekłe gojących się ran mostka. Odrębną ważną grupą chorych, u których planowano wykorzystać hodowle keratynocytów są pacjenci oddziałów oparzeniowych, u których rozległość oparzeń uniemożliwia wykorzystanie opatrunków z własnej skóry. Hodowle keratynocytów wykonywane były z zastosowaniem metody Rheinwalda – Green. W metodzie tej izolowane ze skóry właściwej komórki hodowane są na warstwie odżywczej immobilizowanych fibroblastów linii 3T3. Ponadto podejmowane były próby hodowli fibroblastów z wykorzystaniem mediów hodowlanych bezsurowiczych zawierających zestaw syntetycznych czynników wzrostu. Prowadzone badania potwierdziły skuteczność metod izolacji i hodowli keratynocytów. Obserwowano prawidłową morfologię komórek i ich wzrost. W tym czasie odbyłem szkolenie dotyczące technik hodowli keratynocytów w Laboratory of Tissue Engineering, Istituto Dermatologico dell' Immacolata Włochy, Pomezia- koło Rzymu pod kierunkiem profesora Michele De Luca. Nawiązałem również współpracę z Centrum Leczenia Oparzeń w Siemianowicach Śląskich, gdzie wspólnie prace projektowe w ramach badań własnych prowadzone były pod kierunkiem ówczesnego Dyrektora Szpitala Dr Stanisława Sakiela. Ze względu na brak finansowania prace te nie były kontynuowane w późniejszym okresie.

Od samego początku swojej działalności Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii związana była ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrze. Ośrodek ten jest liderem w zakresie transplantacji serca i płuc lub serca i płuc w jednoczesnym przeszczepie. Należy zaznaczyć, że o powodzeniu przeszczepu w bardzo istotny sposób decyduje właściwe prowadzenie leczenia immunosupresyjnego. Jeden z częściej stosowanych schematów leczenia obejmuje cyklosporynę, której ograniczeniem jest jej

nefrotoksyczność. W związku z tym u pacjentów z uszkodzeniem wielonarządowym i polekową dysfunkcją nerek, leczeniem immunosupresyjnym z wyboru są leki cytolityczne. Do grupy tych leków należą przeciwciała monoklonalne (OKT3) lub poliklonalne (ATG, ALG). Mechanizm ich działania opiera się na łączeniu z receptorami limfocytów T, a następnie z liza tych komórek. Znaczne obniżenie ilości dojrzałych limfocytów T z jednej strony działa protekcyjnie w stosunku do przeszczepionego narządu, a z drugiej strony zbytne obniżenie ilości limfocytów zwiększa ryzyko wystąpienia zakażeń oportunistycznych. W związku z tym bardzo istotne w przypadku tego rodzaju immunoterapii jest stałe monitorowanie ilości limfocytów T. Wraz zespołem klinicystów zostałem poproszony o przygotowanie schematu monitorowania terapii cytolitycznej z użyciem przeciwciał mono- i poliklonalnych, wykorzystując do tego technikę cytometrii przepływowej. Ponieważ brak było w tym czasie standardowych procedur monitorowania i korelowania dawki leku z otrzymanym wynikiem oceny ilości dojrzałych limfocytów T, prace te miały charakter innowacyjny i autorski. Opracowany sposób monitorowania został następnie wdrożony do praktyki klinicznej i stosowany jest z powodzeniem do dnia dzisiejszego do monitorowania terapii cytolitycznej u pacjentów po przeszczepach serca, płuc oraz serca i płuc.

Innym bardzo istotnym zagadnieniem decydującym o powodzeniu przeszczepu jest ocena stopnia immunizacji, której wyznacznikiem jest odsetek Panelu Reaktywnych Przeciwciał (PRA – Panel Reactiv Antibody). Przyjmuje się, że wzrost odsetka PRA zwiększa ryzyka ostrego odrzucenia humoralnego, zgonu u chorych po przeszczepie narządowym lub waskulopatii przeszczepionego narządu. W związku z powyższym zostałem poproszony o wdrożenie do praktyki klinicznej metody oceny odsetka PRA. W pierwszym okresie do oznaczenia procentu PRA wykorzystywałem technikę ELISA, a następnie całkowicie nową metodę cytometryczną FlowPRA, która była w tym okresie po raz pierwszy zastosowana w Zabrzeńskim Ośrodku. Oznaczanie PRA wykonywane jest przeze mnie do dnia dzisiejszego w monitorowaniu pacjentów kwalifikowanych do przeszczepu oraz po przeszczepach serca, płuc oraz serca i płuc. W tym czasie odbyłem tygodniowe szkolenie w Charite Klinikum w Berlinie, w Niemczech w zakresie badań immunologicznych ze szczególnym uwzględnieniem typowania HLA oraz oznaczania PRA (panelu reaktywnych przeciwciał).

W dalszej kolejności moje zainteresowania naukowe skoncentrowały się na zabiegach kardiochirurgicznych, których istotnym elementem jest technika krążenia pozaustrojowego. Technika ta pozwala na dużą przewidywalność w zabiegach rewaskularyzacji naczyń wieńcowych, prowadzenie zabiegów u pacjentów z niską frakcją wyrzutową lewej komory oraz duży komfort dla kardiochirurga. Z drugiej strony w trakcie stosowania metody krążenia pozaustrojowego krew ekspozowana jest na działanie wielu czynników нефизиologicznych. Może to stymulować reakcję zapalną, która w skrajnych przypadkach przybiera postać zespołu uogólnionej reakcji zapalnej tzw. SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). W jej przebiegu dochodzi do aktywacji elementów układu odpornościowego, w tym układu dopełniacza, cytokin, neutrofilów oraz zmian na poziomie receptorów limfocytów T i B. W efekcie może ona prowadzić do generowania licznych powikłań pooperacyjnych. Ograniczenie możliwości stymulowania reakcji zapalnej jest możliwe poprzez zastosowanie technik małoinwazyjnych, takich jak MIDCAB (Minimal Invasive Coronary Artery Bypass) czy OPCAB (off Pump Coronary Artery Bypass). Przesłanki te stały się ostatecznie podstawą do sformułowania następujących celów mojej pracy doktorskiej.

1. Określenie czy stopień odpowiedzi immunologicznej, ocenianej na podstawie zmian ilościowych receptorów limfocytów T i B, receptorów neutrofilów oraz receptora regulującego aktywność dopełniacza różni się u pacjentów poddanych zabiegowi kardiochirurgicznemu z użyciem krążenia pozaustrojowego oraz z zastosowaniem techniki OPCAB w przypadku leczenia choroby niedokrwiennej serca.
2. Próba zdefiniowania markera komórkowego przydatnego w ocenie biozgodności materiałów stosowanych w krążeniu pozaustrojowym i przy zastosowaniu technik małoinwazyjnych typu OPCAB.

W związku z powyższym podjąłem badania które obejmowały grupę 24 chorych, operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca w latach 2000 - 2002 w Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrze i byli to: **A** - Pacjenci, u których wykonywano zabieg w krążeniu pozaustrojowym, **B** - Pacjenci, u których wykonywano zabieg z użyciem techniki OPCAB. Analizując dane literaturowe zdecydowałem, że badane będą następujące receptory: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD45RO, CD45RA, CD11b/CD18 oraz CD35. Próbkę krwi pobierane były w określonych odstępach czasowych: a) kontrola (przed podaniem heparyny), b) po wejściu w krążenie pozaustrojowe: 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min i 240 min. Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Sposób prowadzenia zabiegu techniką OPCAB lub z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego stanowił czynnik różnicujący operowanych chorych, wpływając na ilość komórek reprezentujących subpopulacje limfocytów T i B. Różnice występowały głównie dla receptorów: CD16, który wyraża aktywność cytotoksyczną, CD19 dla limfocytów B, CD25 będącego receptorem dla IL-2 oraz CD35, który może wyrażać aktywność układu dopełniacza.
2. Dla receptorów neutrofilii (CD11b/CD18) nie obserwowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą OPCAB, a pacjentami operowanymi z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego, co może sugerować, że odpowiedź ze strony tych komórek nie jest zależna od zastosowanej techniki operacyjnej.
3. Ilość komórek z receptorem CD35 może odzwierciedlać aktywność układu dopełniacza jako jednego z czynników pośredniczących w aktywacji neutrofilii. Wykazany w pracy brak korelacji pomiędzy komórkami CD35, a komórkami z receptorem CD11b/CD18 może świadczyć o większym udziale w aktywacji neutrofilii mechanizmów niezależnych od dopełniacza.
4. Istotny wzrost ilości neutrofilii z receptorem CD11b/CD18, który obserwowano w obydwu grupach w trakcie trwania zabiegu może wskazywać, że mechanizm ich aktywacji jest w większym stopniu związany z efektem traumatycznym niż z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego, zatem ryzyko uszkodzenia narządowego przez aktywne neutrofile może być zbliżone niezależnie od zastosowanej techniki operacyjnej.
5. Wydaje się, że w ocenie materiałów stosowanych w krążeniu pozaustrojowym szczególną przydatność jako markery inwazyjności prowadzonego zabiegu wykazują receptory CD16, CD19, CD11b/CD18 oraz CD35.

Uzyskane wyniki stały się podstawą obrony dysertacji na Stopień Doktora Nauk Medycznych „Zmiany wybranych komórek immunokompetentnych u pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca w krążeniu pozaustrojowym oraz bez krążenia pozaustrojowego”, której promotorem był prof. dr hab. n. med. Zbigniew Religa oraz jako kopromotor prof. dr hab. n. med. Marian Zembala. Praca uzyskała jednocześnie Wyróżnienie Rady Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

Prace naukowe opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

1. Wilczek P., Szydłowska I., Łotysz D., Religa Z. The use of flow cytometry for the investigation of viability of heart valve-derived fibroblast. 1996. Folia Histochemica et Cytobiologica.vol.34, suppl.1: 41-42.
2. Wilczek P., Szydłowska I., Łotysz D., Religa Z. White blood cells and platelet activation during extracorporeal circulation. 1997. The Immunologist.vol. 24 suppl.1: 301.
3. Sakiel S., Falkus J., Sajdak Z., Religa Z., Wszolek J., Nożyński J., Wilczek P., Pawlus-Łachecka L. 1998. Ocena alloprzeszczepów skóry ludzkiej konserwowanych w glicerolu, zamrażanych w niskich temperaturach i wyjaławianych radiacyjnie. Roczniki Oparzeń. vol. 9: 29-34.
4. Sakiel S., Falkus J., Sajdak Z., Wszolek J., Nożyński J., Wilczek P., Pawlus-Łachecka L.

1998. Zastosowanie zawiesiny keratynocytów w podłożu fibrynowo- kolagenowym pokrytym alloprzeszczepem skóry konserwowanej w głębokich mrożeniach. *Roczniki Oparzeń*. vol. 10: 19-22.
5. Nożyński J., Wilczek P., Zambala-Nożyńska E., Wszolek J., 2000. Fast method for the estimation of heart valve viability. *Medical Science Monitor*. vol.7(3): 461-463.
 6. Wilczek P., Nożyński J., Rozentryt P., Zembala M., 2002. Pooperacyjna plazmafereza u pacjentów immunizowanych po OHT. *Kardiologia Polska*. Tom 57, Suplement II: 200
 7. Wilczek P., Szydłowska I., Łotysz D., Religia Z. Analysis of cell viability after cryopreservation proces using flow cytometry. 3rd European Conference on Engenering and Medicine. 30.04-03.05, 1995 Florencja. *Proceedings*, p. 366
 8. Wilczek P., Szydłowska I., Łotysz D., Religa Z. Nowe zastosowania techniki cytofotometrii przepływowej i hodowli tkankowych. XXX Konferencja Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików. 7-9 września 1995 Wrocław. *Streszczenia*, str. 118
 9. Wilczek P., Szydłowska I., Łotysz D., Religa Z. White blood cells and platelet activation during extracorporeal circulation. Fourth International Symposium on Clinical Immunology. 22-25. 06 1997 Amsterdam, *Proceedings*, p. 301
 10. Religa Z., Wszolek J., Wilczek P., Nożyński J., Pawlus-Łachecka L., Sakiel S., Falkus J., Sajdak Z., Ocena alloprzeszczepów skóry ludzkiej, konserwowanych w glicerolu, zamrażanych w niskich temperaturach i wyjąławianych radiacujnie. *Kongres Oparzenia*. 4-6. 06 1998, Poznań.
 11. Kania A., Wilczek P., Moskal K., Beck E., Termiczna Analiza Różnicowa w Badaniach Tkanek Kolagenowych. IX Konferencja – Biomateriały w Medycynie i Weterynarii. 26-27 października 1998 Zakopane. *Streszczenia*, str. 11.
 12. Wilczek P., Kania A., Moskal K., Beck E., Termiczna Analiza Różnicowa (DTA) jako metoda badania biologicznych zastawek serca. II Ogólnopolskie Sympozjum Problemy Fizyki Medycznej. 15-18 listopada 1998 Ustroń. *Streszcz.* str. 18
 13. Wilczek P., Nożyński J., Zakliczyński M., Szafron B., Religia Z., Zembala M., Przydatność metody LGA w monitorowaniu procesu odrzucania u pacjentów po OHT. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego. 20-22 maj 1999, Poznań. *Streszczenia*, str. 176
 14. Wilczek P., Nożyński J., Zakliczyński M., Szafron B., Religia Z., Zembala M., Cytometria Przepływowa jako Technika Wspomagająca Leczenie Cytolityczne Pacjentów po Przeszczepie Serca. IV Kongres Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego. 20-22 maj 1999 Poznań. *Streszczenia*, str. 175
 15. Zakliczyński M., Nożyński J., Przybylski R., Miecznikowska K., Foremny J., Wilczek P., Zembala M.: Częstość odrzucania komórkowego w okresie wczesnym i odległym po przeszczepie serca (OHT). IV Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, 28-30.09.2000r., Wrocław, *Kardiol Pol*, 2000, 53, suplement II, P191(KBN - 4 pkt) Copernicus – 5,27 pkt
 16. Wilczek P., Nożyński J., Rozentryt P., Zembala M., Pooperacyjna plazmafereza u pacjentów immunizowanych po OHT. VI Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego. 19-21września 2002 Poznań. *Kardiol Pol*, 2002, 57, supl. II, P690. *Streszczenia*, str. 200. (KBN - 4 pkt) Copernicus – 5,27 pkt
 17. Wilczek P., Zembala M., Religia Z. Zmiany wybranych receptorów komorek immunokompetentnych u pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca w krążeniu pozaustrojowym oraz bez krążenia pozaustrojowego. Gdańskie Spotkania Kardiochirurgiczne. 17-18 stycznia 2003.
 18. Paszenda Z., Duda B., Wilczek P., 2003. Badania hemozgodności warstw pasywno węglowych stosowanych do uszlachetniania powierzchni stentów wieńcowych. *Inżynieria Biomateriałów*. VI (26) : 3-11.
 19. Nożyński J.K., Zembala-Nożyńska E., Wilczek P., Wszolek J., 2003. Integrative measurments of calcification in stented, Antibiotic sterilized d cryopreserved sheep biological valves implanted for one year in tricuspid position. *Annals of Transplantation*. Vol.8 (3): 45-54 (KBN - 5 pkt) Copernicus - 6,49 pkt

20. Nożyński J.K., Zembala-Nożyńska E., Wilczek P., Wszolek J., 2003. Mathematical analysis of calcification in stented, antibiotic sterilized and cryopreserved sheep biological valve implanted for one year in tricuspid position. *Annals of Transplantation*. Vol.8 (3): 55-69 (KBN - 5 pkt) Copernicus - 6,49 pkt
21. Nożyński J.K., Grzybek H., Zembala-Nożyńska E., Wilczek P., Wszolek J., Haponiuk I., 2003. Cellular viability and ultrastructure of stented, antibiotic sterilized and cryopreserved sheep biological valve implanted for one year in tricuspid position. *Annals of Transplantation*. Vol.8 (3): 70-78. (KBN - 5 pkt) Copernicus - 6,49 pkt

Projekty badawcze realizowane przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

1. Biomateriały metaliczne z warstwami pasywno węglowymi dla kardiologii zabiegowej – 7T08C 057 17 finansowany przez Komitet Badań Naukowych

Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, moje zainteresowania naukowe skoncentrowały się na zagadnieniach dotyczących medycyny regeneracyjnej, inżynierii tkankowej oraz terapii komórkowych z wykorzystaniem komórek macierzystych. Ten profil zainteresowań był spójny ze strategią rozwoju Fundacji Rozwoju Kardiologii. W związku z tym zostało wyznaczone mi zadanie przez Pana profesora Zbigniewa Religę, ówczesnego prezesa Fundacji Rozwoju Kardiologii i Dyrektora Instytutu Protez Serca, utworzenia i kierowania samodzielną Pracownią Bioinżynierii, której celem byłoby opracowanie innowacyjnych bioprotez sercowych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej.

Zasadność podjęcia badań dotyczących medycyny regeneracyjnej wiązała się z tym, że jest to obszar badań stosowanych, latach rozwijający się bardzo dynamicznie pozwalający wyodrębnić nurt tzw. medycyny personalizowanej. Jednak najbardziej istotne wydawało się to, że zastawki autologiczne konstruowane są w oparciu o komórki własne pacjenta, co sprawia, że tego rodzaju bioprotezy mogą być potencjalnie rozpoznawane jako własne, tym samym dając nadzieję, że tworzone w ten sposób bioprotezy będą charakteryzować się większą trwałością od dotychczas stosowanych bioprotez biologicznych.

Zagadnienie badawcze dotyczące bioinżynierii zastawek serca wydaje się o tyle ważne, że w Polsce wykonuje się rocznie około 3000 operacji zastawek serca. Wady zastawek serca mogą mieć charakter wad nabytych lub wrodzonych, dotyczą zatem zarówno osoby dorosłe jak i dzieci. Najczęstszą przyczyną wad nabytych jest tzw. gorączka reumatyczna, albo przebyte zapalenia bakteryjne zastawek. Przyczyna wad wrodzonych najczęściej nie jest do końca poznana, jednym z czynników predestynujących mogą być czynniki genetyczne. Warto jednak powiedzieć, że wady zastawek serca są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów wśród noworodków.

Wiadomo również, że chirurgiczny zabieg wymiany chorobowo zmienionej zastawki serca stanowi powszechnie przyjętą metodę leczenia w sytuacji, w której wyczerpane zostają możliwości leczenia farmakologicznego. Wydaje się jednak, że pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w zakresie tworzenia zastawkowych protez serca, w dalszym ciągu nie udało się uzyskać idealnego pod względem funkcjonalnym oraz pod względem trwałości substytutu zastawki natywnej. Stosowane obecnie w praktyce klinicznej protezy mechaniczne lub biologiczne posiadają pewne ograniczenia. Zastawki mechaniczne wykazują wprawdzie dużą trwałość to jednak wymagają stosowania u pacjenta długoterminowej terapii przeciwzakrzepowej. Biologiczne protezy zastawek serca cechuje z kolei ograniczona trwałość. Dlatego też duże nadzieje wiąże się z rozwojem technik inżynierii tkankowej.

Zastawki tego rodzaju stanowią komponentę hybrydową, na którą składają się acellularne matryce pochodzenia zwierzęcego lub ludzkie, w których do usuwania komórek najczęściej stosowane są metody enzymatyczne lub chemiczne. Tkanka ludzka stanowi niewątpliwie bardzo dobry materiał mogący być wykorzystany w tworzeniu protez zastawek serca, należy jednak pamiętać o stale istniejącej dysproporcji pomiędzy liczbą dawców, a potencjalnych biorców. Z tego względu badania jakie są prowadzone i jakie były również realizowane przeze mnie wykorzystywały jako model badawczy tkanki odzwierzęce. Ponieważ tkanki te wykazują naturalną immunogenność związaną głównie z obecnością epitopu 1,3, α -GAL, który nie występuje na komórkach ludzkich, podlegają one

procesowi acellularyzacji. Ponieważ sam proces acellularyzacji może modyfikować właściwości morfologiczne i biomechaniczne tkanek często dodatkowo struktury kolagenowe stabilizowane są poprzez zastosowanie nietoksycznych związków sieciujących, które posiadają również właściwości antykalcyfikacyjne.

Innym obiecującym alternatywnym rozwiązaniem, które znalazło się również w spektrum moich zainteresowań badawczych, a mogącym znaleźć zastosowanie w tworzeniu rusztowań dla potrzeb konstruowania bioprotez zastawek serca, są biodegradowalne materiały syntetyczne. O ich atrakcyjności decyduje dostępność oraz możliwość wytworzenia dowolnej ilości bioprotez zastawkowych o zróżnicowanych rozmiarach dopasowanych do potrzeb indywidualnego pacjenta. Idea tworzenia tego rodzaju bioprotez polega na nasiewaniu autologicznych komórek na szkielet zbudowany z biodegradowalnych polimerów. Osadzone w syntetycznym szkielecie komórki rosną, różnicują się oraz syntetyzują macierz zewnątrzkomórkową. Równoległe z syntezą matriks zewnątrzkomórkowej następuje powolna degradacja polimeru tak, aby w efekcie finalnym mógł on być całkowicie zastąpiony przez wzrastającą tkankę.

Odrębnym zagadnieniem badawczym, które realizowałem była ocena charakterystyki wzrostu komórek na rusztowaniach biologicznych lub syntetycznych. Badania dotyczyły oceny wzrostu komórek, kinetyki adhezji do badanych rusztowań, możliwości migracji i różnicowania komórek w zależności od modyfikacji podłoża, na którym nahodowywano komórki. W obszarze zainteresowań badawczych znalazły się komórki macierzyste pochodzenia szpikowego. Są one łatwo dostępne, cechują się dużym potencjałem proliferacyjnym oraz zdolnością do różnicowania. Model badawczy uwzględniał zarówno statyczne warunki wzrostu komórek jak i modele dynamiczne wykorzystujące specjalnej konstrukcji bioreaktory zapewniające przepływ ciągły.

W celu polepszenia adhezji komórek do powierzchni sztucznych materiałów polimerowych zastosowane mogą być odpowiednie warstwy polielektrolitów. Są to związki pochodzenia naturalnego, które ułatwiają nahodowywanie i właściwy wzrost komórek na powierzchniach polimerowych. W tych przypadkach mówi się często o tworzeniu tzw. analogów tkankowych. W tym celu w pracowni w Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii skonstruowane zostało oryginalne urządzenie, które pozwoli na komputerowo kontrolowane nanoszenie polielektrolitów ułatwiających proces nasiewania komórek na protezy zastawek serca. Urządzenie to powstało w ścisłej współpracy z Instytutem Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN w Krakowie. Dr. inż. Roman Major podczas swojego pobytu w ośrodku, MINATEC w Grenoble, zainteresował się tematyką wykorzystania polielektrolitów w tworzeniu bioprotez sercowych. Wspólne dyskusje i konsultacje w tym zakresie sprawiły, że tego rodzaju urządzenie mogło powstać w Polsce.

Doświadczenia w zakresie technik hodowli komórkowych, inżynierii tkankowej zaowocowały również podjęciem badań dotyczących sercowych komórek macierzystych. Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe (Cardiac Stem Cells CSC/Cardiac Progenitor Cells CPCs) są grupą komórek multipotencjalnych, zdolnych do wielokrotnej replikacji i różnicowania się w kardiomiocyty, komórki śródbłonka oraz komórki mięśni gładkich. Komórki te charakteryzuje występowanie powierzchniowych białek c-kit (CD117), MDR-1. Posiadają również na swojej powierzchni receptory wskazujące, że komórki te mają fenotyp komórek mezenchymalnych zrębu. Jednocześnie brak na ich powierzchni markerów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych. Badanie w tym zakresie prowadzone były we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu, który był liderem prowadzonych wspólnie projektów oraz z Instytutem Onkologii w Gliwicach. Zadania jakie zostały powierzone Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii i które realizowane były w kierowanym przeze mnie Zespole dotyczyły opracowania efektywnych metod transferu komórek macierzystych do chorobowo zmienionego obszaru mięśnia sercowego. Założenia badawcze zakładały wykorzystanie do tego celu acellularnych rusztowań biologicznych lub syntetycznych. Przesłanką do tego rodzaju badań jest fakt, że komórki dla właściwej proliferacji i różnicowania wymagają oddziaływania z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Pozbawione oddziaływania z ECM indukują proces apoptozy. Ponadto zastosowanie rusztowania komórkowego pozwala na eliminację ograniczeń związanych z podażą zawiesiny komórek takich jak niska retencja podaży komórek. W przypadku podania domięśniowego (IM) retencja wynosi zaledwie 11% z kolei w przypadku podaży dowieńcowej (IC) lub dożylniej (IV) wynosi ona około 3%. Znaczna ilość komórek lokalizuje się w płucach i w przypadku podania dowieńcowego jest to aż 47%, 26% dla podania domięśniowego i około 43% przy dożylnym sposobie podaży. Warto również zwrócić uwagę, że do podawania

zawiesiny komórek często wykorzystuje się kateter, co powoduje istotne ryzyko perforacji ściany mięśnia sercowego. Może on również mieć działanie drażniące i indukować zaburzenia rytmu serca. Podanie IC oraz IV wiąże się również z ryzykiem okluzji i embolizacji. Ponadto podanie IC jest nieefektywne w przypadku stwierdzonej okluzji naczyń. Powyższe powikłania mogą być wyeliminowane poprzez zastosowanie rusztowań komórkowych. Dlatego też w obszarze moich zainteresowań naukowych znalazły się badania obejmujące opracowanie konstrukcji rusztowań, ocenę ich właściwości morfologicznych, biomechanicznych oraz badania kinetyki wzrostu komórek, adhezji, zmian morfologicznych i fenotypowych wynikających z oddziaływania sygnałów biologicznych i mikromechanicznych. Badania, które prowadziliśmy, w pierwszej kolejności miały na celu izolację komórek z fragmentów tkanek pochodzących z różnych obszarów mięśnia sercowego, charakterystykę ich fenotypu i cech morfologicznych. Przesłanką do tego rodzaju badań były dane literaturowe wskazujące na różnice morfologiczne pomiędzy kardiomiocytami izolowanymi z przedsionka oraz komory serca. Skutkiem tego była odmienna charakterystyka oddziaływania tych komórek z wybranymi rodzajami podłoża. W ramach tego zadania oceniano wpływ różnych substratów wykorzystywanych do konstrukcji rusztowań biologicznych na zdolność wzrostu komórek oraz ekspresję receptorów komórkowych. Kolejnym elementem realizacji zadania było przygotowanie rusztowań biologicznych. Tak przygotowane matryce biologiczne wykorzystywano do nahodowywania komórek. Oprócz tkanek acellularnych, jako podłoża biologiczne do nahodowywania komórek wykorzystywano również komercyjnie dostępne podłoża kolagenowe takie jak gąbki kolagenowe i żele kolagenowe. W ramach realizacji zadania wykonano również eksperyment mający na celu prowadzenie hodowli komórkowych w takich warunkach, które promowały syntezę białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Stosując tego rodzaju rozwiązanie, komórki nie są nahodowywane na podłoża biologiczne czy syntetyczne, ale same wytwarzają rusztowanie 3D, w którym są osadzone. Inną zaproponowaną i badaną metodą transferu komórek było wykorzystanie techniki enkapsulacji. Zaletą tej metody jest możliwość umieszczenia badanej grupy komórek w biokompatybilnych kapsułach, zwykle alginianowych, które stanowią barierę immunologiczną przy jednoczesnym zapewnieniu właściwej wymiany gazowej oraz czynników odżywczych. Zastosowanie enkapsulacji promuje mechanizm parakrynowy oddziaływania komórek macierzystych. Prowadzone badania miały na celu ocenę cech morfologicznych i żywotność komórek poddanych enkapsulacji. Koncentrowały się również na badaniu kinetyki sekrecji cytokin izolowanych z mięśnia sercowego komórek mezenchymalnych zrębu.

Odrębnym zagadnieniem badawczym jakie było przedmiotem mojego zainteresowania były badania trombogenności i aktywacji płytek krwi w kontakcie z materiałami polimerowymi lub metalicznymi zawierających nanostrukturalne powłoki dedykowane do długoterminowego kontaktu z krwią. W standardowych warunkach, w wyniku kontaktu krwi z powierzchnią materiałów polimerowych lub ceramicznych następuje aktywacja układu krzepnięcia, dopełniacza oraz adhezja i aktywacja płytek krwi. Aktywacja płytek krwi może z kolei prowadzić do zmian zakrzepowych i stymulowania reakcji zapalnej poprzez wspomaganie adhezji leukocytów i rekrutację monocytów. Dlatego też często stosowane metody poprawy hemokompatybilności obejmują wytwarzanie na powierzchni materiałów bioaktywnych nanowarstw lub modyfikację powierzchniową, których celem jest hamowanie aktywacji płytek krwi oraz adhezji aktywnych płytek, leukocytów czy też agregatów leukocytarno-płytkowych. Badania w tym zakresie wykonywane były w układzie *in vitro*, z zastosowaniem modelu dynamicznego, który pozwala na symulowanie przepływów i naprężeń ścinających w sposób zbliżony do tych, jakie występują w naczyniach krwionośnych o średniej średnicy. Warunki doświadczenia były zatem zbliżone do warunków fizjologicznych, co jest niezwykle istotne dla oceny materiałów kontaktujących się z krwią. Dzięki temu rezultaty badań mają nie tylko charakter poznawczy, ale są również użyteczne ze względu na ich potencjalne wykorzystanie w warunkach *in vivo* w aplikacjach związanych z tworzeniem rusztowań komórkowych czy analogów tkankowych. Powyższe zainteresowania naukowe były realizowane w ramach uzyskanych projektów badawczych, w których pełniłem rolę kierownika lub koordynatora projektów.

Projekty realizowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

1. Nowe metody przygotowania i konserwacji zastawek biologicznych nr – R13 016 03 – kierownik projektu. Projekt był realizowany przy współudziale: Katedry i Kliniki Kardiochirurgii i Transplantologii - Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu w zespole kierowanym przez Pana prof. M. Zembalę, Katedrę Chemii Organicznej i Bioorganicznej Politechniki Śląskiej w zespole Pana Prof. dr hab. inż. W. Szeji oraz Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu w zespole kierowanym przez Prof. dr hab. inż. Marka Kowalczuka. Celem projektu było stworzenie prototypu bioprotezy zastawkowej serca w oparciu o techniki inżynierii tkankowej, w której na acellularne rusztowania zastawek nahodowywane będą komórki własne pacjenta. Jednocześnie mając świadomość ograniczeń związanych z dostępnością materiału ludzkiego jednym z wyników było również opracowanie prototypu zastawki odzwierzęcej konserwowanej chemicznie, która mogłaby być jednocześnie zasiedlana komórkami w układzie „*in vitro*” lub „*in vivo*”.

W ramach prowadzonych badań zająłem się opracowywaniem optymalnych metod acellularyzacji tkanek, porównując metody enzymatyczne oraz chemiczne. Jednocześnie oceniałem jak tego rodzaju sposób modyfikacji tkanek wpływa na zmianę właściwości biomechanicznych oraz na ich morfologię. Dodatkowymi czynnikami modulującymi była temperatura. Tkanki poddane acellularyzacji były ekspozowane na głębokie mrożenie i przechowywanie w temperaturze $-146\text{ }^{\circ}\text{C}$, i porównywane z tkankami przechowywanymi w temperaturze $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ze względu na różnice morfologiczne i histologiczne porównywałem również dwie grupy tkanek: pochodzące z zastawki aortalnej oraz z zastawki płucnej. Badałem krytyczne parametry determinujące mechanikę tkanek takie jak moduł elastyczności, odkształcenie oraz energię zrywania. Zaobserwowałem, że w przypadku tkanki płucnej proces acellularyzacji powodował istotne obniżenie wartości badanych parametrów. Spadek wartości modułu elastyczności świadczył o usztywnieniu tkanki płucnej pod wpływem działania enzymów. Z kolei proces głębokiego mrożenia powodował istotny wzrost modułu elastyczności przy jednoczesnym spadku wartości energii zrywania oraz odkształcenia. Odmienną tendencję obserwowałem dla tkanki aortalnej, dla której modyfikacja poprzez enzymatyczną acellularyzację powodowała jedynie istotne obniżenie wartości energii zrywania przy braku istotnych zmian modułu elastyczności i odkształcenia. Również ekspozycja na głębokie mrożenie nie zmieniała istotnie parametrów biomechanicznych tkanek aortalnych. Różnice jakie wystąpiły pomiędzy tkankami płucnymi i aortalnymi były wynikiem odmiennej morfologii i histologii tkanek, natomiast nie wynikały z odmiennej efektywności samego procesu acellularyzacji. Badania biomechaniczne uzupełnione były o ocenę podatności tkanek na działanie kolagenazy oraz badanie temperatury kurczenia. Dodatkowo przy współpracy z Pracownią Biocybernetyki wykonywałem ocenę parametrów hemodynamicznych modyfikowanych tkanek. Ocena ta była wykonywana na modelach fizycznych, a zebrane dane posłużyły do modelowania komputerowego przepływów. W ramach symulacji komputerowej porównano zakres deformacji oraz rozkład naprężeń w modelu zastawki (natywnej) o prawidłowych właściwościach mechanicznych z zastawkami o zmienionych właściwościach wskutek acellularyzacji, przechowywania w temp. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz głębokiego mrożenia. Wartości modułów elastyczności uzyskano na podstawie badań na maszynie wytrzymałościowej TYTRON 250 firmy MTS. Badania biomechaniczne korelowane były z oceną morfologii tkanek natiwnych i po acellularyzacji. Badane tkanki natywne wykazywały prawidłową komórkowość oraz zwartą, o prawidłowej barwliwości, strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej. Tkanki acellularne były prawie całkowicie pozbawione elementów komórkowych, z rzadkimi jedynie cieniami jąder. W miejscach usunięcia komórek obserwowano wolne przestrzenie i szczeliny. Zarówno w tkankach zastawek płucnych jak i aortalnych struktura macierzy zewnątrzkomórkowej była rozluźniona. W przypadku niektórych tkanek w obrazie histologicznym odnotowano obecność wakuoli oraz obrzęk istotny międzykomórkowej. Ciekawych obserwacji dostarczyły natomiast obrazy histologiczne tkanek poddanych procesowi acellularyzacji z użyciem detergentów. Efektywność procesu usuwania komórek była istotnie słabsza, w porównaniu z acellularyzacją enzymatyczną, a dodatkowo, wykazano wyraźne cechy delaminacji.

W ramach projektu prowadziłem również badania *in vitro* biogodności oraz trombogenności. W trakcie procesu acellularyzacji rusztowanie macierzy zewnątrzkomórkowej poddawane jest działaniu czynników chemicznych i enzymatycznych wykazujących potencjalne cytotoksyczne działanie, co mogłoby wpływać na efektywność nahodowywania komórek, ich adhezję oraz migrację.

Ocena cytotoksyczności wykonywana była wykorzystując metody badania modyfikowanych tkanek w kontakcie bezpośrednim oraz z zastosowaniem suplementacji odpowiednimi stężeniami czynników acellularyzujących. Wykorzystując techniki mikroskopii fluorescencyjnej oraz cytometrii przepływowej oceniałem możliwość indukowania śmierci komórkowej w mechanizmie nekrozy lub apoptozy. W przypadku czynników enzymatycznych, krótka ekspozycja powodowała wzrost ilości komórek nekrotycznych i jedynie niewielki odsetek komórek apoptotycznych. Dłuższe eksponowanie na działanie enzymów nie powodowało wzrostu ilości komórek nekrotycznych co można było wytłumaczyć inaktywacją enzymów. Z kolei działania detergentów indukowało nekrozę, prawie całkowitą lizę komórek nawet przy niskich stężeniach detergentu. W badaniu cytotoksyczności metodą bezpośrednią oceniano nie tylko żywotność komórek, ale również ich morfologię oraz badano zmiany w obrębie cytoszkieletu. Wykonywano między innymi barwienia przy użyciu falloidyny oraz vimentyny, co pozwoliło na ocenę cytoszkieletu komórkowego oraz jądrowego. Wykonywałem również barwienia jąder komórkowych z zastosowaniem barwnika DAPI. Zarówno w tkankach natywnych jak i acellularnych komórki obserwowane z użyciem techniki kontrastowania fazowego Plas DIC wykazywały prawidłową morfologię.

Kolejnym badaniem jakie było wykonywane w ramach tego projektu była ocena aktywacji układu płytkowego. W przypadku długoterminowego stosowania bioprotez sercowych krew ekspozowana jest na działanie czynników нефизjologicznych. Może to powodować aktywację płytek krwi lub ich adhezję do zmodyfikowanej powierzchni. Badanie obejmowało ocenę odsetka komórek pozytywnych względem receptora CD62P dla P selektywny, CD45 oraz ocenę ilościową agregatów leukocyarno-płytkowych (CD62P/CD45 pozytywnych). Zaobserwowałem, że badane tkanki nie zwiększały istotnie ilości aktywnych płytek krwi CD62P pozytywnych lub ilości agregatów leukocyarno-płytkowych. Natomiast wykonywane równoległe badanie adhezji płytek wskazywało na istotnie większą liczbę zadherowanych płytek krwi w przypadku tkanek acellularnych, w porównaniu do tkanek natywnych. Dalszy etap badań obejmował izolację komórek mezenchymalnych ze szpiku, a następnie ich ocenę fenotypową. Badania te miały na celu oszacowanie przydatności komórek mezenchymalnych do nahodowywania na acellularne rusztowania. Komórki hodowane były w standardowych mediach suplementowanych czynnikami wzrostu. Dla sprawdzenia potencjału do różnicowania oceniano następnie ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych takich jak: CD 31, CD 34, CD 117, CD 45, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, CD 106. Do oznaczeń wykorzystana będzie technika cytometrii przepływowej. Dodatkowo, w celu zoptymalizowania warunków hodowli, izolowane komórki hodowano w zmiennych warunkach. Czynnikiem różnicującym był rodzaj podłoża, na którym hodowano komórki, rodzaj zastosowanego medium oraz czynniki wzrostu, którym suplementowano hodowlę. W prowadzonych hodowlach oceniano zmiany w obrębie morfologii hodowanych komórek oraz tempo proliferacji. Ocenie podlegały między innymi takie parametry jak potencjał mitochondrialny hodowanych komórek, stymulacja procesów apoptozy, zmiany w obrębie cytoszkieletu, filamentów pośrednich. Zaproponowałem również nowatorskie podejście do oceny zmian w obrębie hodowli komórkowych wykorzystujące analizę fraktalną, badania profili liniowych i powierzchniowych oraz zmienności indeksu kształtu komórkowego jako wyraz ich funkcji. Dalszy etap prowadzonych przeze mnie badań dotyczył oceny charakterystyki wzrostu komórek na acellularnych rusztowaniach zastawek serca, hodowanych w bioreaktorach z przepływem ciągłym. W tym celu nawiązałem współpracę z prof. Augustinem Baderem z Uniwersytetu Lipskiego. Badaniu podlegała kinetyka wzrostu komórek, żywotność i ich fenotyp ze szczególną oceną ekspresji receptorów śródbłonna. W ramach projektu uczestniczyłem również w badaniach nad możliwością zastosowania nietoksycznych związków sieciujących takich jak: 7-(karboksymetoksy)-genisteina, soli pirydynowej 7-siarczanogenisteiny, soli potasowej 7-siarczanogenisteiny, 3'-sulfogenisteiny α -G-rutyny, soli sodowej kwasu moryno-5'-sulfonowego, genipiny. Wykonane zostały również prototypowe badania *in vitro* protezy zastawki aortalnej typu HAB (skrót od ang. nazwy Human Aortic Bioprosthesis), a także stanowiska badawczego umożliwiającego obserwację protezy zastawki podczas pracy oraz rejestrację wybranych wielkości fizycznych charakteryzujących przepływ. Proteza zastawki aortalnej typu HAB została opracowana w roku 2007 przez dr. P. Siondalskiego z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i przedstawiona podczas Gdańskich Spotkań Kardiochirurgicznych w roku 2008 Proteza zastawki aortalnej typu HAB. wykonana jest z pojedynczego fragmentu wyciętego z worka osierdziowego. Zastawkę formuje się z fragmentu worka osierdziowego stanowiącego płaski wykrój o charakterze figury jednopójnej. Kształt i wymiary tejsze

figury są związane w sposób jednoznaczny z wymiarami opisującymi geometrię aorty w rejonie wszczepienia.

Kolejne prowadzone przeze mnie badania realizowane były w ramach projektu „**Transgeniczne bioprotezy zastawek serca tworzone w oparciu o techniki inżynierii tkankowej**”. **Nr R13 0075 06** w którym pełniłem funkcję kierownika wykonawczego ze strony FRK. W przypadku zastawek odzwierzęcych acellularyzacja tkanki powoduje usunięcie większości komórek wraz z antygenami obecnymi na ich powierzchni. Jednak metody te nie gwarantują całkowitego usunięcia komponenty komórkowej z tkanek. Pozostałe po procesie acellularyzacji reszty komórkowe mogą stanowić źródło antygenów, w tym antygeny 1,3 a-GAL, które mogą być odpowiedzialne za generowanie odpowiedzi zapalnej. Metody konserwacji tkanek przy zastosowaniu toksycznych środków sieciujących mogą maskować antygeny, jednak ograniczają one możliwość zasiedlenia tkanek komórkami. Z kolei zastosowanie do konserwacji tkanek nietoksycznych środków sieciujących zwiększa ryzyko ekspozycji organizmu biorcy na obcy epitop i stymulowania reakcji immunologicznej.

Dlatego wydaje się, że wykorzystanie zwierząt transgenicznych na potrzeby inżynierii tkankowej ma swoje istotne uzasadnienie. Projekt zakłada, że w konstrukcji zastawkowych protez serca wykorzystane zostaną tkanki zwierząt, u których obniżona została ekspresja reaktywnych antygenów, a zwłaszcza epitopu 1,3 α -GAL. Tkanka taka w mniejszym stopniu stymulowałaby reakcję immunologiczną organizmu, co przekładałoby się na zwiększenie trwałości takiej bioprotezy. Tak zmodyfikowane rusztowanie tkankowe pokrywane byłoby komórkami autologicznymi, dzięki czemu zastawka posiadałaby właściwości zbliżone do tkanki natywnej. Wszystkie te cechy są niezwykle istotne nie tylko ze względów badawczych, ale przede wszystkim ze względów klinicznych. Ponieważ problem degradacji i utraty funkcji bioprotez zastawkowych jest szczególnie nasilony u dzieci i młodych pacjentów wydaje się, że ta grupa chorych mogłaby odnieść największe korzyści z proponowanych rozwiązań. Projekt był realizowany we współpracy z Instytutem Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach k/ Krakowa oraz Instytutem Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Zatem głównym założeniem projektu była ocena przydatności zwierząt modyfikowanych genetycznie pozbawianych epitopu 1,3 a-GAL, w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową, jako rusztowanie dla tworzenia bioprotez zastawek serca. Badania obejmowały szereg czynności związanych z oceną właściwości morfologicznych tkanek pochodzących od modyfikowanych świń, analiz cech biomechanicznych. Oceniano również oddziaływanie komórek krwi z tkankami, w tym głównie aktywację układu płytkowego i płytkowo-leukocytarnego oraz adhezję aktywnych płytek krwi, ponieważ jest to element krytyczny dla materiałów poddawanych długoterminowemu oddziaływaniu z krwią, a przez to dla właściwego funkcjonowania bioprotez. Istotnym elementem była również analiza potencjału zasiedlenia komórkami autologicznymi, tkanek pochodzących od genetycznie modyfikowanych świń. Głównie wnioski jakie wynikały z przeprowadzonych badań wskazują, że tkanki zwierząt transgenicznych cechuje większa stabilność biomechaniczna, w porównaniu do tkanek zwierząt nietransgenicznych o czym świadczą uzyskane wartości modułów elastyczności, energii zrywania czy odkształcenia względnego. Konsekwencją tego jest również większa stabilność biomechaniczna tych tkanek po poddaniu ich porcedurze acellularyzacji. Powodem tego może być między innymi większa homogenność świń transgenicznych. Jak potwierdzają badania, zwierzęta z obniżoną ekspresją antygeny 1,3 α -GAL nie wykazują obecności endogennych wirusów PERV, co dodatkowo zwiększa bezpieczeństwo stosowania tych tkanek w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową.

Istotnym elementem prowadzonych badań była również ocena możliwości doboru tkanek w sposób zależny od wieku i wagi potencjalnego biorcy. W tym celu przeanalizowano tkanki pod względem biomechanicznym i morfologicznym, pochodzące od zwierząt zróżnicowanych wagowo, a przez to wiekowo. Badania wykazały, że tkanki tych zwierząt różnią się pod względem właściwości biomechanicznych. Wydaje się, że czynnik ten powinien być elementem właściwego doboru bioprotez zastawkowych. Jest to szczególnie istotne wobec faktu wciąż istniejącego problemu niedopasowania bioproteza – pacjent (prosthesis-patients mismatch). Tego rodzaju podejście jest innowacyjne i jak na razie dane dotyczące doboru zastawek z uwzględnieniem zależności wiekowych i wagowych są ograniczone. W ramach prowadzonego projektu wykonywano również badania oceny efektywności hodowli MSC przy zastosowaniu białek pochodzenia roślinnego jako czynnika

stymulującego. Celem podjętych prac było wykazanie wpływu stężenia białka roślinnego (PP) w medium na hodowane *in vitro* mesenchymalne komórki macierzyste szpiku, w porównaniu do hodowli standardowej z użyciem FCS. W przypadku wykazania pozytywnego wpływu białka roślinnego na hodowane *in vitro* komórki macierzyste możliwe będzie zastąpienie surowicy pochodzenia zwierzęcego bezpieczniejszym pod względem sanitarnym białkiem roślinnym, a ponadto w praktyce mogłoby się przyczynić do wydłużenia czasu pluripotencji MSC oraz ewentualnego zwiększenia liczby namnażanych komórek. Oceniano między innymi ekspresję białka bax, caspazy-3 czy PKB. Oceniano również integralność błony komórkowej stosując barwniki Sybr 14 i jodek propidyny (PI) oraz fragmentację DNA metodą TUNEL. Brak istotnych różnic pomiędzy komórkami MSC hodowanymi w warunkach standardowych z wykorzystaniem surowic zwierzęcych oraz z wykorzystaniem białek pochodzenia roślinnego wskazał, że białka te mogą znaleźć zastosowanie w bioinżynierii zastawek serca.

Bardzo ważnym elementem projektu był eksperyment *in vivo* na modelu zwierzęcym. Zgodnie z przyjętym założeniem, wykonano zabieg wszczepienia zastawki płucnej pozyskanej od świń transgenicznych do aorty zstępującej owcy.

Zabiegi wykonane w obrębie następujących grup:

1. Grupa kontrolna – wszczepienie komercyjnie dostępnej zastawki serca (np. konserwowanej aldehydem glutarowym)
2. Grupa, której wszczepiona została zastawka serca acellularna niesieciowana pozbawiona obecności epitopu 1,3 α -GAL
3. Grupa, której wszczepiono zastawkę serca acellularną sieciowaną pozbawioną obecności epitopu 1,3 α -GAL
4. Grupa, której wszczepiono zastawkę serca acellularną sieciowaną pozbawioną obecności epitopu 1,3 α -GAL pokrytą komórkami własnym biorcy
5. Zabieg placebo – przecięcie i zaszywanie aorty bez wszczepiania zastawki

Analiza tkanek po eksplantacji wykazała, że najkorzystniejsze cechy obserwowane były w obrębie tkanek acellularnych z nahodowanymi komórkami autologicznymi. Po eksplantacji nie wykazano istotnych zmian makroskopowych. Tkanka nie wykazywała cech degradacji. Nie obserwowano ognisk wapnienia, macierz zewnątrzkomórkowa miała prawidłową strukturę. Ponadto badania immunohistochemiczne włókien elastynowych, fibronektyny, kolagenu IV wskazują, że w obrębie tych tkanek odnotowano intensywną reakcję dodatnią, co może wskazywać na uruchomienie procesów syntezy białek macierzy, co z kolei może być istotne ze względu na możliwość stymulowania procesów naprawczych i remodelowania.

Jednym z nadrzędnych celów projektu była również ocena bezpieczeństwa zastosowania bioprotez zastawek serca wytwarzanych z zastosowaniem technik inżynierii tkankowej i metod molekularnych. Uzyskane pozytywne wyniki badań pozwoliły na sformułowanie kolejnego wniosku badawczo rozwojowego w ramach ogłoszonych przez NCBiR projektów badań stosowanych (PBS) „Opracowanie innowacyjnej bioaktywnej protezy zastawki serca” projekt ten uzyskał dofinansowanie i jego realizacja rozpocznie się w marcu 2015 roku. Projekt ten będzie kontynuacją prowadzonych wcześniej badań nad uzyskaniem protezy zastawki serca z użyciem technik inżynierii tkankowej. Zakłada również przeprowadzenie eksperymentu na modelu zwierzęcym, jednak będzie to eksperyment funkcjonalny i jeżeli osiągnięte zostaną zakładane cele pozwoli to na przygotowanie wniosku o rozpoczęcie eksperymentów klinicznych.

Kolejne prowadzone przeze mnie badania realizowane były w ramach projektu „**Uzyskanie transgenicznych świń jako dawców tkanek i narządów do transplantacji u ludzi oraz ich biotechnologiczna, fizjologiczna i medyczna charakterystyka**”.

Założeniem tego projektu było uzyskanie transgenicznych świń, cechujących się wielopoziomą transgenezą, w celu istotnego obniżenia immunogenności odzwierzęcych tkanek, poprawy biokompatybilności, a przez to zwiększenia przydatności klinicznej odzwierzęcych tkanek. W projekcie tym pełniłem rolę koordynatora ze strony FRK, a realizowane w ramach projektu zadania obejmowały ocenę biomechaniczną i hemodynamiczną rusztowań zastawek serca. W przypadku badań hemodynamicznych pomiary fizyczne zostały wykonane na uproszczonym układzie hydraulicznym, opartym na modelu Windkesela, symulującym naturalny układ krążenia krwi, w którym rolę układu tętniczego spełnia wysokociśnieniowy i nisko-pojemnościowy zbiornik energii potencjalnej natomiast

rolę układu płucnego spełnia niskociśnieniowy i wysoko pojemnościowy zbiornik objętościowy. W ramach realizacji projektu wykonywano również ocenę morfologii tkanek i cech histologicznych, badania stabilności termicznej, odporności na biodegradację w oddziaływaniu z kolagenazą.

Istotnym elementem były również prowadzone badania *in vitro* dotyczące podatności tkanek na kalcyfikację. Stosowanie bioprotez pochodzenia zwierzęcego wiąże się z ryzykiem wystąpienia zmian degeneracyjnych tkanki, co z kolei zwiększa możliwość wapnienia bioprotez w okresie odległym od wszczepienia. Zmniejszenie immunogenności tkanek poprzez zastosowanie wielopoziomowej transgenezy oraz dodatkowo ich acellularyzacja są procesami, które mogą ograniczać to zjawisko, ale nie eliminują go całkowicie. Dlatego też badanie kalcyfikacji tkanek są tak istotne zarówno z punktu widzenia badawczego, dla określenia mechanizmów tego zjawiska, jak i ze względu na potencjalną aplikację kliniczną. Elementem prowadzonych badań była również ocena ekspresji receptora CD40, jako kostymulatora aktywacji limfocytów T i B w odpowiedzi na kontakt z powierzchnią materiałów biologicznych z tkanek ksenogennych. Receptor CD40 pośredniczy w reakcjach immunologicznych i zapalnych, jego aktywacja może prowadzić m.in. do zwiększonej aktywacji makrofagów i limfocytów B. W ramach projektu badano również mechanizmy aktywacji układu płytkowo-leukocytarnego czy płytkowo-monocytarnego w odpowiedzi na kontakt z powierzchnią materiałów biologicznych z ksenogennych tkanek. Podstawą do podjęcia tych badań był fakt, że formowanie agregatów płytkowo-leukocytarnych czy płytkowo-monocytarnych prowadzi do aktywacji płytek, co z kolei skutkuje uwolnieniem szeregu substancji czynnych z ziarnistości α i β , które z kolei mogą doprowadzić do powstania zmian zakrzepowych. Ponadto w ramach realizacji projektu wykonywano badania dotyczące izolacji macierzystych komórek mezenchymalnych i ich różnicowania w hodowli w komórki endotelialne i mioblasty. Efektywność różnicowania oceniano na podstawie ekspresji receptorów: CD31, CD105, CD144, KDR, FLT-1, AWF, CD90, CD73, CD44, CD105. Przeprowadzone analizy wykazały wysoką ekspresję receptorów CD93, CD73 oraz CD44 co świadczy o obecności populacji komórek o fenotypie MSC. Odnotowano także znaczący odsetek markerów charakterystycznych dla komórek endotelialnych w tym: CD144, FLT-1, KDR oraz vWF. W ramach projektu oceniano również efektywność nahodowywania komórek MSC na bezkomórkowe matryce.

Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się nie tylko na badaniach rusztowań biologicznych, ale związane były również z materiałami nanostrukturalnymi, możliwościami ich powierzchniowej modyfikacji i ich wielkoskalową analizą. W obszarze moich zainteresowań znalazły się głównie zagadnienia dotyczące oddziaływań tych materiałów z elementami komórkowymi. Wydaje się, że zachodzące interakcje mogą mieć charakter uniwersalny i mogą mieć zastosowanie zarówno dla materiałów syntetycznych jak i biologicznych. Mogą dawać również podstawę do tworzenia materiałów kompozytowych. Zainteresowania te realizowałem między innymi w ramach projektu "Nanostrukturalne materiały dla biomedycznych systemów układu krążenia (CardioBioMat)" prowadzonego w ramach konkursu MNT-ERA-NET. W projekcie tym pełniłem rolę kierownika zadań ze strony FRK. Zadanie jakie były wykonywane w obrębie tego projektu to między innymi „Sterylizacja powierzchniowa elementów układu wspomaganie krążenia”. Ocena wpływu sterylizacji z użyciem tlenu etylenu, jako powszechnie przyjętej i dostępnej metody sterylizacji materiałów poliuretanowych na generowaniu defektów w obrębie nanowarstw”. Powszechnie stosowaną metodą sterylizacji elementów systemu wspomaganie krążenia jest sterylizacja przy użyciu tlenu etylenu. Taką metodą zastosowano również do sterylizacji materiałów poliuretanowych z powierzchnią modyfikowaną nanowarstwami związków węglowych i krzemowych różniącymi się parametrami nakładania. Były to powierzchnie krzemowe, dotowane krzemem powłoki polimer/DLC (Diamond Like Carbon) i powierzchnie dotowane azotkiem krzemu. Materiał był poddany ocenie bezpośrednio po procesie sterylizacji, jak również po wykonanych testach zmęczeniowych, w których próbki poddawano obciążeniom cyklicznym w kierunku osiowym. Następnie wykonywano analizę spękań z zastosowaniem techniki kontrastu fazowego. W ramach realizowanych zadań badano również kinetykę adhezji komórek wzorcowych w kontakcie z modyfikowaną powierzchnią polimerów. Ponadto w badaniu oceniano adherentność komórek układu płytkowego oraz leukocytarnego w stosunku do modyfikowanych powierzchni materiałów polimerowych. Badania były wykonywane na krążkach poliuretanowych modyfikowanych przy użyciu DLC (Diamond Like Carbon), azotku tytanu (TiN) oraz tlenu tytanu (TiO). Na powierzchni modyfikowanej przy użyciu DLC komórki po około 60 min były właściwie zadherowane, wykazywały prawidłową morfologię i tworzyły jednorodną

monowarstwę. Na pozostałych powierzchniach czas potrzebny do prawidłowej adhezji był istotnie dłuższy, również gęstość komórkowa znacznie różniła się od tej uzyskanej na powierzchni DLC. Dodatkowo oceniano aktywację układu płytkowo-leukocytarnego w odpowiedzi na modyfikowane powierzchnie w układzie dynamicznym z zadaniem przepływem ciągłym oraz pulsacyjnym w odpowiednich odstępach czasowych. Badano agregację płytek krwi oraz leukocytów na modyfikowanej powierzchni, wykorzystując w tym celu technikę mikroskopii fluorescencyjnej. Badano również aktywację układu płytkowo-leukocytarnego poprzez ocenę ekspresji receptorów CD62P oraz CD45/CD62P dla agregatów leukocytarno-płytkowych. Badania obejmowały również ocenę reakcji limfocytów T i B na zmodyfikowane powierzchnie biomateriałów. Szczególnie w przypadku długoterminowego stosowania bioprotez sercowych np. łat biologicznych lub syntetycznych stosowanych w chirurgicznej rekonstrukcji lewej komory serca czy komórki wspomaganie serca, krew ekspozowana jest na działanie wielu czynników нефизjologicznych. Prowadzić to może do stymulacji reakcji zapalnej, która może mieć charakter uogólnionej reakcji zapalnej SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). Zachodząca w wyniku tych procesów kaskada reakcji immunologicznych i enzymatycznych może przyczyniać się w rezultacie do generowania licznych powikłań takich jak: zmiany zatorowe, niewydolność wielonarządowa czy zaburzenia neuropsychologiczne. Oceniano zmiany ekspresji receptorów limfocytarnych: CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD86, CD19, CD40. Ponieważ głównym celem modyfikacji powierzchniowej biomateriałów jest zwiększenie ich biouzgodności, niezbędna jest ocena wpływu modyfikacji powierzchniowej na wzrost komórek śródbłonna. Warstwa komórek śródbłonna stanowi naturalną warstwę wyściełającą powierzchnie naczyń krwionośnych, powierzchnię płatków zastawek serca, pnia płucnego czy aortalnego i decyduje o prawidłowej funkcji narządu. Zapewnia jego funkcjonalność, stanowi naturalną warstwę zabezpieczającą przed agregacją czy aktywacją układu płytkowego. Dlatego też dąży się do tego, aby zewnętrzne powierzchnie syntetycznych materiałów dla utrzymania biouzgodności mogły być pokrywane funkcjonalną i integralną warstwą komórek śródbłonna. Dlatego też każda modyfikacja powierzchniowa biomateriałów powinna umożliwiać prawidłową adhezję tych komórek z zachowaniem ich niezmięnionej morfologii i funkcjonalności. Podobnie jak w poprzednich badaniach, optymalną kinetykę adhezji, wzrost komórek zapewniały warstwy modyfikowane przy użyciu DLC.

Badania w obszarze medycyny regeneracyjnej koncentrują się na zagadnieniach biomateriałowych dotyczących konstrukcji rusztowań biologicznych i syntetycznych obejmujących ocenę właściwości biomechanicznych, morfologicznych, nanostrukturalnych modyfikacji powierzchniowych, dla których celem nadrzędnym jest stworzenie środowiska do prawidłowego rozwoju i organizacji architektury tkanki. Drugim kluczowym elementem badań w obszarze medycyny regeneracyjnej są komórki macierzyste. Nie sposób tych dwóch zagadnień rozpatrywać oddzielnie. Wprawdzie możliwe jest podanie pacjentowi komórek w postaci wstrzyknięcia lub infuzji, ale tylko część z wprowadzonych w ten sposób komórek przeżywa i pozostaje w docelowym miejscu. Efektywność terapii komórkowych można zwiększyć tworząc komórkom odpowiednie do ich przetrwania i funkcjonowania środowisko. W tym celu tworzone są odpowiednie rusztowania biologiczne czy syntetyczne, które stanowią nie tylko mechaniczną strukturę podporową, ale w sposób aktywny stymulują komórki do wzrostu, różnicowania i migracji. Biorąc to pod uwagę, w sposób naturalny w obszarze moich zainteresowań badawczych znalazły się komórki progenitorowe i macierzyste serca.

Obecne w mięśniu sercowym komórki macierzyste i progenitorowe są grupą komórek multipotencjalnych zdolnych do wielokrotnej replikacji i różnicowania się w kardiomiocyty, komórki endothelium oraz komórki mięśni gładkich. Komórki te charakteryzuje występowanie powierzchniowych białek charakterystycznych dla fenotypu komórek mezenchymalnych zrębu. Jednocześnie brak na ich powierzchni markerów komórek hematopoetycznych. Obecnie uważa się, iż starzejące się komórki mięśnia sercowego, zarówno kardiomiocyty jak i komórki tworzące naczynia wieńcowe, a także komórki zrębowe, są nieustannie zastępowane przez odpowiadające im, w pełni funkcjonalne nowe generacje komórek. Badania z tego zakresu prowadzone były w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków NCN. Uczestnikami tych badań byli: Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu jako lider projektu oraz Instytut Onkologii w Gliwicach. Początkowy etap

badan obejmował izolację i hodowlę ludzkich sercowych komórek macierzystych serca, - optymalizację metod izolacji sercowych komórek macierzystych oraz ocenę fenotypową izolowanych komórek. W tym celu badałem ekspresję receptorów zewnątrz i wewnątrzkomórkowych c-kit, , CD90, CD45, CD31, CD73, CD105, CD144, Lin-1, Lin-2 i Lin-3. oraz czynników transkrypcyjnych: Nkx 2.5, MDR-1, GATA-4. Próbowałem jednocześnie oszacować ewentualne różnice w ilości komórek macierzystych i progenitorowych w poszczególnych obszarach mięśnia sercowego. Prowadziłem również badania odpowiedzi stresowej izolowanych komórek poprzez analizę ekspresji receptorów dla białek HSP i metaloproteinaz oraz ocenę potencjału mitochondrialnego - wydaje się bowiem, że odpowiedź stresowa może odgrywać istotną rolę w potencjalnie regeneracyjnym tych komórek. Oprócz badań fenotypowych skoncentrowałem się również na badaniu morfologii hCSC/CPC we fragmentach izolowanych i hodowanych komórek sercowych. Badanie morfologii komórek obejmowało ocenę kinetyki wzrostu hodowli. Badano również zmianę parametrów komórkowych w zależności od czasu hodowli, miejsca pobrania i wieku dawcy. Oceniano między innymi zmianę powierzchni komórek, ferret wertykalny i horyzontalny, zmianę indeksu kształtu komórkowego. W ramach realizacji projektu analizowałem również ekspresję białek rodziny Rho w hodowlach sercowych komórek macierzystych i możliwości stymulowania procesów różnicowania. Białka rodziny Rho działając na zasadzie molekularnych przełączników regulują wiele procesów komórkowych. Oddziałują w głównej mierze na cytoskielet biorąc udział w reorganizacji mikrofilamentów aktynowych oraz mikrotubul. Białka te kontrolują wiele procesów komórkowych, w tym różnicowania komórkowego. W prowadzonych badaniach komórki hodowałem na zróżnicowanych podłożach, próbując oszacować, jak oddziaływania z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej mogą modulować fenotyp i morfologię komórek. Zagadnienie to wydaje się istotne z punktu widzenia poznawczego, ale ma również znaczenie praktyczne w konstrukcji rusztowań komórkowych. Oceniano w związku z tym receptory białek Rho w powiązaniu z ekspresją receptorów charakteryzujących fenotyp sercowych komórek macierzystych.

Badanie nad komórkami macierzystymi/progenitorowymi serca realizowane w ramach projektu badawczego zostały w dalszej kolejności rozwinięte w projekcie „Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe - nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca” POIG 1.3.1. Projekt ten realizowany był podobnie jak w przypadku projektu badawczego we współpracy ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu oraz Instytutem Onkologii w Gliwicach. Biorąc pod uwagę doświadczenia w zakresie badań nad tworzeniem rusztowań komórkowych biologicznych i syntetycznych jakie posiada Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrzu, zostało nam powierzona zadanie opracowania sposobu transferu komórek macierzystych do chorobowo zmienionego mięśnia sercowego. W projekcie tym pełniłem rolę kierownika zadań ze strony FRK. Badania obejmowały w pierwszym etapie charakterystykę komórek bez nośnika. Komórki były izolowane z fragmentów tkanki pochodzących z różnych obszarów mięśnia sercowego, w celu identyfikacji ich cech fenotypowych i morfologicznych. Przesłanką do tego rodzaju badań były dane literaturowe wskazujące na różnice morfologiczne pomiędzy kardiomiocytami izolowanymi z przedsionka oraz komory serca i wynikającą z tych różnic odmiennym sposobem oddziaływania z wybranymi rodzajami podłoża. mieć może to z kolei mieć istotne znaczenie dla prawidłowej konstrukcji rusztowania tkankowego. Przed przystąpieniem do analizy właściwości morfologicznych wykonywana była ocena fenotypowa oraz morfologiczna hodowanych komórek. Oceniałem również tempo migracji komórek z fragmentów tkanek, kinetykę wzrostu hodowli czy też zmiany indeksu kształtu komórkowego. W dalszej kolejności badania obejmowały przygotowanie opłaszczonych komórkami mezenchymalnymi zrębu acellularnych rusztowań biologicznych. W ramach tego zadania oceniałem wpływ różnych substratów wykorzystywanych do konstrukcji rusztowań biologicznych na zdolność wzrostu komórek oraz ekspresję receptorów komórkowych. Komórki hodowane były w naczyniach hodowlanych opłaszczonych: fibronektyną, kolagenem IV, żelatyną oraz lamininą. Dodatkowym czynnikiem różnicującym był rodzaj zastosowanego medium, komórki hodowano w: a) 1% r-r L-glutaminy, b) medium IMDM (35%) oraz DMEM/Ham's F12 medium (65%) suplementowanym 1% roztworem L-glutaminy, 20 ng/ml bFGF, 2% B27, 4 ng/ml cardiotrophiny, 10 ng/ml EGF, 40 nM/l trombiny oraz 0.2% mercaptoetanolu. Komórki poddawano następnie ocenie fenotypowej. Do oceny morfologii komórek wykorzystałem elementy analizy fraktalnej. Kolejnym elementem realizacji zadania było przygotowanie rusztowań biologicznych w oparciu o tkanki acellulane oraz komercyjnie dostępne podłoża: gąbki i żele kolagenowe. Zaletą tego rodzaju rozwiązań była możliwość oceny wzrostu

komórek na biomimetycznych rusztowaniach 3D. W ramach realizacji zadania wykonywałem również eksperymenty mające na celu indukcję syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Pozwala to na wytworzenie w pełni autologicznego rusztowania biologicznego. Po około 4 tygodniach hodowli zaobserwowano wytworzenie delikatnej błony białkowej zawierającej materiał komórkowy. Wytworzone w ten sposób rusztowania wykorzystano następnie w eksperymencie *in vivo* na modelu mysim. W tym celu rusztowania były wszczepiane myszom na okres 40 dni, po tym czasie serca wraz z łąką komórkową eksplantowano i poddawano ocenie histologicznej. Ponieważ do eksperymentu wykorzystywano myszy zawałowe w celu oceny poprawy kurczliwości każdorazowo wykonywano badanie echokardiograficzne na początku eksperymentu, po wygenerowaniu zawału oraz na końcu eksperymentu przed eksplantacją serca. Dodatkowo w ramach badania wykonałem eksperyment *in vitro* mający na celu ocenę zdolności migracyjnej komórek w obrębie rusztowania 3D. Badania rusztowań biologicznych obejmowały również wstępną ocenę możliwości modyfikacji powierzchniowej tkanek przy użyciu zredukowanego tlenku grafenu (rGO). W tym celu wykorzystano tkankę acellularną pokrywaną rGO. Jako grupy odnośnikowe stosowano tkanki modyfikowane powierzchniowo za pomocą: Poli-L lizyny, fibronektyny oraz tkankę niemodyfikowaną. Ponieważ jednym z krytycznych elementów determinujących właściwości tkanek kontaktujących się z krwią jest ich atrombogenność, oceniano stopień adhezji płytek oraz aktywacji układu płytkowego. Ocenie podlegały następujące receptory: CD42a, CD42b, CD41a, CD40, CD65P i PAC-1. Badania wykonywane były z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody Impact-R, która pozwala na symulację przepływów oraz naprężeń zbliżonych do układu *in vivo*. Dodatkowo badano cytotoksyczność tkanek modyfikowanych za pomocą rGO w kontakcie bezpośrednim, w insertach w kontakcie pośrednim, wykonywano również badania TUNEL dla oceny ewentualnej fragmentacji DNA oraz ocenę cykli komórkowych. Zadania realizowane w ramach projektu obejmowały również ocenę wzrostu komórek mezenchymalnych zrębu na rusztowaniach syntetycznych. Badano między innymi oddziaływanie z biozgodnym materiałem jakim jest bionanoceluloza. Ze względu na dużą biozgodność bionanoceluloza może mieć szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. Wykorzystano również komercyjnie dostępny materiał, CoreMatrix. bezkomórkowa jest to bezkomórkowa macierz zewnątrzkomórkowa, która po wszczepieniu nie powinna podlegać enkapsulacji, która indukuje przebudowę i reorganizację tkanki. Po wszczepieniu, CoreMatrix promuje migrację komórek do wnętrza rusztowania stymulując tym samym naturalne procesy naprawcze. Napływające komórki proliferują oraz wytwarzają własny kolagen, co sprzyja regeneracji i odbudowie tkanki. Dodatkowo materiał BNC został wykorzystany w eksperymencie *in vivo* na modelu mysim. Eksperyment wykonywany był na myszach, u których wyidukowano zawał mięśnia sercowego, grupę kontrolną stanowiły myszy bezzawałowe.

Inną metodą, badaną w ramach projektu, transferu komórek macierzystych była enkapsulacja w biodegradowalnych mikrożelach. W ramach realizowanego projektu prowadzono prace nad uzyskaniem nośników do efektywnego transferu komórek macierzystych/progenitorowych izolowanych z mięśnia sercowego. Uczestniczyłem w opracowaniu technologii enkapsulacji polegającej na zamykaniu komórek w obrębie 3D sferycznych rusztowań hydrożelowych na bazie alginianu sodu z dodatkiem poli-L-lizyny lub fibronektyny. Technika enkapsulacji komórek umożliwia kontrolę procesu chemo-mechano-transdukcji komórkowej i tym samym warunkuje różnicowanie, sekrecję cytokin, czynników wzrostu oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Kapsuły stanowią barierę ochronną komórek przed odpowiedzią immunologiczną organizmu pacjenta, jednocześnie nie ograniczając wymiany gazowej, dostępu do substancji odżywczych i umożliwiając usuwanie metabolitów. Enkapsulacja jest obiecującą formą dostarczania komórek do mięśnia sercowego w celu jego regeneracji bazującej na efekcie parakrynnym. W prowadzonych badaniach analizowano biozgodność kapsuł alginianowych w kontakcie z komórkami izolowanymi od pacjentów z kardiomiopatią, przy czym z literatury wynika, iż funkcjonalność sercowych komórek macierzystych/progenitorowych może zależeć od stanu fizjologicznego mięśnia sercowego. Uczestniczyłem w badaniach cytotoksyczności, ocenie ekspresji receptora CD95 i kaspazy-9 charakteryzujących proces apoptozy. Prowadziłem również badania zmian kinetyki uwalniania cytokin przez mezenchymalne komórki zrębu po procesie enkapsulacji oceniano sekrecję: VEGF, bFGF, IGF-1 oraz angiopoetyny-2.

Pozostałe badania

1. Znaczenie metaloproteinaz przestrzeni pozakomórkowej (MMP) w powstawaniu agregatów płytkowo-leukocytarnych, farmakologia MMP i rola agregatów w patofizjologii choroby wieńcowej –
2. Biomateriały metaliczne z warstwami pasywnowęglowymi dla kardiologii zabiegowej. KBN 7 T08C 057 17.
3. “Wyposażenie Laboratorium *Zdrowie* w ramach Centrum Zaawansowanych Technologii” .WKP 1/1.4.3/1/2004/31/31/94.
4. Twinning project PL01/IB/EC-06a „ Clinical trials and pharmacovigilance impact of EU legislation” maj-czerwiec 2004
5. Zmiany wybranych komórek immunokompetentnych u pacjentów operowanych z powodu choroby niedokrwiennej serca w krążeniu pozaustrojowym oraz bez krążenia pozaustrojowego. NN-1 313/03.
6. Badania własne :Nr umowy – „Izolacja komórek CD34+ z krwi obwodowej oraz próba różnicowania ich w hodowli w komórki endotelialne, jako metoda zapobiegania restenozom NN – 2 – 466/01”
7. Rozbudowa Wyposażenia Naukowo Badawczego dla potrzeb laboratorium Biotechnologii CD. WKP_1. /1.4.3/ 2/2005/67/186/373
8. Materiały polimerowe do zastosowań kardiochirurgicznych – synteza i właściwości fizykochemiczne 1510/H03/2007/32
9. Rola metaloproteinaz w patogenezie zjawiska oporności na aspirynę u pacjentów z cukrzycą Typu II i chorobą niedokrwienną serca. KBN 2P05B14330
10. Priorytetowe Technologie dla zrównoważonego rozwoju Województwa Śląskiego. WKP_1/1.4.5/2/2006/10/13/591/2006

Badania ekotoksykologiczne

Równoległe do ww wiodącego profilu badań, od 2008 roku uczestniczyłem w badaniach biomonitoringowych dotyczących możliwości adaptacyjnych zwierząt, głównie drapieżnych bezkręgowców, do warunków zanieczyszczonego środowiska. Badania prowadzone były w ramach współpracy z Katedrą Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii (macierzystą Katedrą, w której wykonywałem pracę magisterską), Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Badania miały na celu określenie powiązań pomiędzy stopniem zanieczyszczenia środowisk zamieszkiwanych przez badane gatunki zwierząt, a poziomem wskaźników komórkowych, takich jak enzymy detoksykacyjne, enzymy antyoksydacyjne, enzymy przemian beztlenowych, białka stresu czy zmiany apoptotyczne i nekrotyczne. W badaniach tych uczestniczyłem wykonując analizy cytometryczne wybranych parametrów komórkowych, optymalizując je stosownie do właściwości materiału pobieranego z organizmów bezkręgowych. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji ww projektu badawczego zamieszczone zostały w 5 publikacjach naukowych (Wilczek et al., 2008 *Ecotoxicology and Environmental Safety*; Babczynska et al., 2011 *Comparative Biochemistry and Physiology*; Wilczek et al., 2013 *Comparative Biochemistry and Physiology*; Wilczek et al., 2014 *Ecotoxicology and Environmental Safety*; Stalmach et al., 2015 *Ecotoxicology and Environmental Safety*).

1. Prace naukowe włączone do cyklu:

Inżynieria tkankowa jest dziedziną, która w ostatnich latach rozwija się w sposób bardzo dynamiczny. Daje nadzieję na zrewolucjonizowanie terapii w przypadkach nieodwracalnego uszkodzenia narządów. Pozwala na tworzenie, naprawę, regenerację lub zastąpienie chorobowo zmienionych tkanek i narządów bioaktywnymi protezami. Konieczne jest w tym celu właściwe dobranie rodzaju komórek, czynników biologicznie aktywnych oraz rusztowań biologicznych lub syntetycznych, na których mogą być nahodowywane komórki. Optymalnie dobrane komórki powinny spełniać takie wymagania jak: łatwość ich pozyskania, duży potencjał proliferacyjny, zdolność do różnicowania w komórki dorosłe właściwe dla danej bioprotezy oraz brak immunogenności. Komórki allogenne pochodzące od dawcy są łatwo dostępne jednak ograniczeniem jest ich immunogenność. W przeciwieństwie do nich komórki autologiczne są immunologicznie obojętne, jednak mają znacznie bardziej ograniczoną dostępność i często wykazują obniżony potencjał wzrostowy. Wykorzystanie w technikach inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej potencjału komórek macierzystych wymaga w pierwszej kolejności optymalizacji warunków izolacji, a następnie hodowli komórek *in vitro*, która symulowałaby warunki mikrośrodowiska zapewniającego prawidłową proliferację, adhezję, migrację oraz różnicowanie komórek. Drugim bardzo istotnym elementem determinującym powodzenie zastosowań związanych z inżynierią tkankową jest dobór rusztowania, które tworzyłoby odpowiednie warunki do wzrostu komórek oraz utrzymania ich cech funkcjonalnych. Prowadzone w ostatnich latach badania zwracają uwagę na istotną rolę jaką pełni środowisko mikromechaniczne. Podkreśla się, że komórki dla zachowania właściwej aktywności proliferacyjnej i różnicowania wymagają stymulacji w postaci kontaktu z powierzchnią macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki o fenotypie komórek adhezyjnych pozbawione tego rodzaju stymulacji uruchamiają program apoptozy. Dlatego biomateriały w swojej istocie odgrywają nadrzędną rolę w oddziaływaniu z komórkami na poziomie molekularnym, w mechanizmie zbliżonym do oddziaływań z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Z tego względu tak istotną rolę przypisuje się poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za interakcję pomiędzy komórkami, a tworzącymi rusztowanie tkankowe białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Biorąc pod uwagę powyższe w moich badaniach skoncentrowałem się na ocenie właściwości biomechanicznych tkanek kolagenowych modyfikowanych przy użyciu stosowanych w procesie acellularyzacji czynników chemicznych oraz enzymatycznych. Podstawowa teza, jaka została przyjęta w prowadzonych przeze mnie badaniach zakłada, że w trakcie procesu acellularyzacji generowane mogą być niespecyficzne zmiany w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Ich efektem jest zaburzenie biomechaniki tkanek, co skutkuje z jednej strony obniżoną wytrzymałością biomateriału, a z drugiej strony utratą funkcji biologicznych tworzących go włókien kolagenowych, fibronektynowych czy elastynowych. Badania, które prowadziłem wskazują, że zakres tych zmian zależny jest od rodzaju tkanki, jej pochodzenia od zastosowanych czynników acellularyzujących. Elementem moich badań było również poznanie w jaki sposób podłoże i oddziaływania mikromechaniczne mogą modulować wzrost i morfologię komórek. Wydaje się bowiem, że poznanie tych mechanizmów może w istotny sposób przyczynić się do zdefiniowania krytycznych parametrów pozwalających na optymalizację konstrukcji bioprotez sercowych. Wśród materiałów biologicznych, które badałem znalazły się również tkanki pochodzące od zwierząt modyfikowanych genetycznie. Były to świnie pozbawione epitopu 1,3 α -GAL. Tego rodzaju modyfikacje genetyczne tworzone są w celu obniżenia immunogenności obcogatunkowych tkanek. Podobnie jak w przypadku tkanek zwierząt nietrasgenicznych oceniałem właściwości biomechaniczne oraz morfologiczne tego rodzaju tkanek oraz ich potencjał do zasiedlania komórkami mezenchymalnymi. Oceniałem również w jaki sposób czynnik wieku zwierząt i związanej z nim masy ciała może modulować wybrane właściwości tkanek. Tworzeniu bioprotez hybrydowych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej oraz modyfikacje genetyczne zwierząt jest podejściem nowatorskim i pozwala na istotne obniżenie immunogenności, zwiększenie trwałości bioprotez poprzez indukowanie procesów naprawczych oraz remodelowania tkanek. Wykorzystanie możliwości jakie związane są z transgenezą w połączeniu z technikami inżynierii tkankowej, pozwalającym na Ze względu na dostępność materiałów biodegradowalnych które służyć mogą do tworzenia rusztowań badania prowadzone w obszarze medycyny regeneracyjnej, koncentrują się

również na ich ocenie wielkoskalowej. Również w obrębie moich zainteresowań badawczych znalazły się aspekty związane z tą grupą innowacyjnych materiałów. Badałem między innymi potencjał bioresorbowalnych włókien otrzymanywanych techniką elektrospiningu, do uwalniania bioaktywnych cząstek. Inny aspekt moich badań dotyczył modyfikacji powierzchniowej rusztowań, która wspomagałaby z jednej strony wzrost komórek, a z drugiej strony wpływałaby na hamowanie procesów adhezji i aktywacji płytek krwi. Zagadnienia dotyczące rusztowań biologicznych oraz materiałów biodegradowalnych w prowadzonych przeze mnie badaniach zostały ujęte w sposób komplementarny. Wydaje się bowiem, że wprowadzie materiał natywny w postaci tkanek biologicznych jest optymalny ze względu na swoje cechy morfologiczne, histologiczne i fizyczne dla tworzenia bioprotez to jednak materiały syntetyczne biodegradowalne oraz techniki modyfikacji powierzchniowej stanowią istotne uzupełnienie i rozwinięcie technik materiałowych nakierowanych na uzyskanie analogów tkankowych.

Szczegółowy opis badań został zebrany i wyodrębniony w kolejnych publikacjach.

I.Gualandì C, **Wilczek P**, Focarete ML, Pasquinelli G, Kawalec M, Mariastella Scandola. Bioresorbable electrospun nanofibrous scaffolds loaded with bioactive molecules. E-Polymers. 2009; Vol.9 Iss.1 p.737-752 **IF - 0.644 MNISW - 20**

Celem pracy była ocena *in vitro* degradacji bioresorbowalnego kopolimeru, oraz ocena możliwości funkcjonalizacji rusztowania poprzez inkorporację czynników wzrostu oraz oszacowanie czy wprowadzone czynniki biologicznie aktywne mogą modulować wzrost i morfologię mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC). W założeniu tak funkcjonalizowane rusztowanie mogłoby być wykorzystane w tworzeniu bioaktywnych protez sercowo-maczymiowych lub jako specyficzny nośnik dla kontrolowanego uwalniania czynników wzrostu. Inżynieria tkankowa jest multidyscyplinarną dziedziną wiedzy która zaczęła rozwijać się w latach 90-tych i ma na celu wspomaganie procesu regeneracji uszkodzonych tkanek. W swoim głównym założeniu przewiduje możliwość wykorzystania biologicznych lub syntetycznych bioresorbowalnych rusztowań, które mogły by być zasiedlone komórkami *in vitro* lub *in vivo* i zregenerować lub zastąpić chorobowo zmienioną tkankę. Pomimo dużego postępu jaki do konał się w tym zakresie w dalszym ciągu poszukuje się optymalnej konstrukcji rusztowania 3-D specyficznego dla określonej tkanki. Istotnym pozostaje również problem wyboru właściwego materiału. Spośród wielu metod jakie są rozwijane bardzo obiecującą jest technika elektrosprzędzenia (electrospinning-ES), pozwala ona bowiem na wytworzenie porowatych rusztowań, z połączonymi porami składającymi się z mikro- lub nanowłókien odtwarzających topologię białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). W prezentowanej pracy jako materiał do tworzenia nanowłókien zastosowany został kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (PLGA - poly(lactide-co-glycolide) copolymer). Badana była jego kinetyka degradacji hydrolitycznej *in vitro* ponieważ jest to cecha która determinuje konstrukcję rusztowania i jego cechy pożądane dla aplikacji *in vivo* w medycynie regeneracyjnej. Wiadomy jest również że rusztowania polimerowe mogą być funkcjonalizowane za pomocą odpowiednich biomolekuł w celu aktywacji procesów komórkowych. Biomolekuły mogą być inkorporowane do wnętrza rusztowania i uwalniane w sposób kontrolowany do środowiska zewnętrznego, ewentualnie możliwa jest funkcjonalizacja powierzchni rusztowania poprzez immobilizację specyficznych cząstek biologicznie aktywnych. W prezentowanej pracy rusztowania ES były funkcjonalizowane za pomocą ECGS (Endothelial Cell Growth Factor Suplment), w tym celu włókna ES zostały wytworzone poprzez zastosowania mieszaniny kopolimeru oraz ECGS. Było to podejście bardzo innowacyjne ponieważ ilość publikacji dotyczących możliwości inkorporacji czynników wzrostu do rusztowań ES była ograniczona. Zastosowano różne stężenia ECGS a następnie prowadzono hodowlę komórek MSC w obecności modyfikowanych rusztowań ES. Ze względu na dużą plastyczność komórek MSC i możliwość ich odróżnicowania w trakcie długoterminowej hodowli badania prowadzono przez okres 7 dni. Dla oceny efektywności uwalniania czynników wzrostu w postaci ECGS badano żywotność komórkową, odsetek komórek nekrotycznych oraz apoptotycznych. Ponadto badano odsetek komórek pozytywnych wobec receptora Ki67 który jest wyznacznikiem funkcji proliferacyjnej komórek.

Badania obejmowały również ocenę morfologiczną hodowanych komórek. W tym celu wykorzystano technikę kontrastu fazowego. Oceniano cechy morfologiczne dniu 0 hodowli oraz w siódmym dniu hodowli. Szacowano liczbę komórek w poszczególnych hodowlach oraz ich procentowy przyrost po siedmiu dniach. Ponadto oceniając zmiany morfologiczne w poszczególnych grupach badanych oceniano zmiany indeksu kształtu komórkowego oraz zmiany wielkości powierzchni komórek. Praca ta wykazuje, że czynniki wzrostu mogą być skutecznie inkorporowane do rusztowań ES bez utraty ich aktywności biologicznej. Poprzez ocenę żywotności komórkowej, ekspresję wewnątrzkomórkowego receptora Ki-67 oraz poprzez korespondujące z nimi zmiany cech morfologicznych komórek MSC stwierdzono że uwalniany z rusztowań czynnik wzrostu wspomaga żywotność, proliferację i wzrost komórek MSC. Ponadto zaobserwowano że zmiany indeksu kształtu komórkowego mogą być pośrednim wyznacznikiem różnicowania komórek MSC. Wyniki te mogą mieć istotny wpływ na strategię postępowania w aplikacjach medycznych wykorzystujących techniki inżynierii tkankowej i komórek macierzystych.

2. Wilczek P, Barańska A, Kubin B, Zembala M. Bezkomórkowe rusztowania biologiczne wykorzystywane w tworzeniu bioprotez zastawek serca – efektywność wybranych metod acellularyzacji tkanek. Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska. 2009; 6 (2): 384-390. IF - 0.172, MNISW - 6

Celem pracy było porównanie efektywności różnych metod acellularyzacji zastawek serca oraz ocena zakresu zmian morfologicznych tkanek dla określenia ich przydatności w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową zastawek serca. Przesłanką do tego rodzaju badań jest fakt że w leczeniu zarówno wrodzonych, jak i nabytych wad zastawek serca, powszechnie stosowaną metodą leczenia jest wymiana chorobowo zmienionej zastawki serca. Pomimo że zabiegi te cechuje duża skuteczność kliniczna posiada ona jednak ograniczenia związane z brakiem optymalnego analogu biologicznego lub mechanicznego zastawek serca. Protezy mechaniczne wykazują dużą trwałość, wymagają jednak stosowania terapii przeciwzakrzepowej, bioprotezy posiadają z kolei znacznie ograniczoną trwałość. Stąd obserwowane w ostatnich latach duże zainteresowanie technikami inżynierii tkankowej. Istotnym zagadnieniem związanym z tworzeniem zastawkowych protez serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej jest pozyskanie i właściwe przygotowanie rusztowania, na którym nahodowywane będą komórki autologiczne. Kluczowym dla tego procesu jest dobór odpowiedniej metody acellularyzacji tkanek, która pozwalałaby na efektywne usunięcie komórek przy zachowaniu właściwych cech morfologicznych i biomechanicznych macierzy zewnątrzkomórkowej. Do badań wykorzystano świńskie zastawki serca, w których po ich wypreparowaniu dokonywano wstępnej oceny, obecność złogów tłuszczowych, fenestracji, obrzęków tkanki oraz innych zmian patologicznych. Następnie poddawano je procedurze acellularyzacji z zastosowaniem następujących metod: 1) cyklicznego zamrażania i rozmrażania tkanek; 2) 12-godzinnej inkubacji w NaCl w połączeniu z 30-minutową inkubacją w 0,5% SDS (sodium dodecyl sulphate); 3) 48-godzinnej inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA; 4) 15-minutowej inkubacji w SDS w połączeniu z 48h inkubacją w roztworze Trypsin/EDTA. Efektywność procesu acellularyzacji i morfologię tkanek oceniano na podstawie badań histologicznych, wykorzystano również do tego celu Transmisyjną mikroskopię elektronową dzięki której możliwa była ocena zmian dystrybucji glikozaminoglikanów. Badano również właściwości biomechaniczne poprzez zastosowanie jednoosiowych testów naprężeń. Badano również efektywność zasiedlania komórkowego acellularnych rusztowań *in vitro*, oraz możliwości resyntezy glikozaminoglikanów przez nahodowywane komórki. Analizując wyniki zaobserwowano że zastosowanie procedury cyklicznego zamrażania i rozmrażania i inkubacji w roztworze NaCl w połączeniu z inkubacją w SDS skutkowało istotnymi zmianami macierzy zewnątrzkomórkowej, z licznymi obrzękami tkanki i kolagenu oraz małą efektywnością acellularyzacji. Z kolei 48 godzinna inkubacja w roztworze Trypsyna/EDTA pozwalała na zachowanie integralności ECM, jednak obserwowano e obrębie tkanki nieusunięte komórki i fragmenty komórkowe. Największą efektywność odnotowano dla metody łącznej inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA wraz z 15-minutową inkubacją 0,5% roztworze SDS. Tkanki te skutecznie były zasiedlane monowarstwą żywych komórek, obserwowano również cechy resyntezy GAG. Metody acellularyzacji wykazują zróżnicowaną efektywność usuwania komórek oraz w różnym stopniu

oddziaływają na zmiany morfologiczne i mechaniczne w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej. Dlatego też proces ten wydaje się kluczowym dla uzyskania rusztowania biologicznego, mogącego być skutecznie wykorzystanym w procesie tworzenia bioprotez zastawek serca z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej. Optymalizacja metody acellularyzacji pozwala na zminimalizowanie uszkodzeń w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej, co przyczynia się do utrzymania prawidłowych cech biomechanicznych tkanki oraz zapewnia właściwą komunikację mikromechaniczną pomiędzy komórkami a elementami białek macierzy zewnątrzkomórkowej, zapewniając w ten sposób prawidłowe zasiedlanie komórek, wzrost i proliferację.

3. Wilczek P, Małota M, Nożyński J, Przybylski R, Zembala M. Acellularne łąty biologiczne pokrywane mezenchymalnymi komórkami macierzystymi i ich potencjalne wykorzystanie w zabiegach rekonstrukcji lewej komory serca. Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska. 2010; 7 (1): 66–80. IF - 0.076, MNISW - 9

Celem pracy była ocena możliwości hodowli i różnicowania w warunkach *in vitro* komórek szpiku i ich wykorzystania w tworzeniu łąt biologicznych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Celem było również porównanie właściwości biomechanicznych łąt syntetycznych i biologicznych i analiza z użyciem metod modelowania komputerowego wpływu tych właściwości na kurczliwość lewej komory serca. Ostre zespoły wieńcowe stanowią w chwili obecnej istotny problem kliniczny. W ich przebiegu dochodzi do upośledzenia kurczliwości lewej komory serca. Jednocześnie dochodzi do remodelowania serca, co we wczesnym etapie ma charakter adaptacyjny. Z kolei późna faza remodelowania prowadzi często do trwałego upośledzenia kurczliwości lewej komory serca. W tych sytuacjach jako metoda leczenia zastosowanie może mieć chirurgiczna rekonstrukcja lewej komory serca. Istotą zabiegu jest wycięcie miejsca akinezy lub dyskinezy mięśnia sercowego, a następnie próba odtworzenia właściwego, eliptycznego kształtu koniuszka serca. Jest to możliwe m.in. dzięki wszyciu syntetycznej łąty, która pozwala na mechaniczne utrzymanie danego kształtu. Wydaje się, że zastosowanie łąty biologicznej pokrywanej komórkami autologicznymi mogłoby spowodować że utrzymana zostanie zarówno funkcja mechaniczna, jak również możliwe byłoby stymulowanie procesów regeneracji i remodelowania chorobowo zmienionej tkanki mięśnia sercowego, co pozwoliłoby na przywrócenie prawidłowej kurczliwości lewej komory serca. Prowadzone badania obejmowały przygotowanie bezkomórkowych matryc przy zastosowaniu metody enzymatycznej z zastosowaniem inkubacji w roztworze Trypsyna/EDTA w połączeniu z krótkoterminową inkubacją w roztworze SDS. Matrycy te służyły następnie do oceny zdolności zasiedlania komórkowego oraz do wykonania testów biomechanicznych. Badania obejmowały również izolację mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego ich hodowlę i fenotypizację. Ponadto komórki MSC posłużyły do wykonania eksperymentu w którym elementem różnicującym był rodzaj podłoża lub zastosowany czynnik wzrostu lub ich łączne zastosowanie. Badano morfologię i fenotyp hodowanych komórek oceniając ekspresję receptorów: CD 105, CD 117, CD 144, CD 166, CD 31, CD 34, Ki 67. Zarówno dla tkanek natywnych i acellularnych, jak i dla materiałów syntetycznych wykonanych z dakronu przeprowadzono jednoosiowe statyczne testy rozciągania oraz testy zmęczeniowe, w których materiał badany poddawano cyklicznym obciążeniom. W celu określenia wpływu mechanicznych właściwości łąty na wydajność pracy serca (objętość wyrzutową) oraz naprężenia myocardium wykorzystano symulację komputerową (Ansys 11) opartą na metodzie elementów skończonych (FEM) wraz z zaawansowaną metodą FSI (ang. fluid structure interactions). W uzyskanych wynikach zaobserwowano że zastosowanie metody enzymatycznej acellularyzacji w połączeniu z inkubacją w roztworze SDS skutkowało prawie całkowitym usunięciem komórek a struktura macierzy zewnątrzkomórkowej była właściwie zachowana bez cech obrzęku tkanki i kolagenu. Wynik ten był istotny ze względu na prowadzone w dalszej kolejności badania biomechaniczne o hemodynamiczne oraz dla oceny efektywności zasiedlania komórkowego. W ocenie cytometrycznej ilości komórek pozytywnych względem badanych receptorów w hodowlach różnicowanych ze względu na zastosowany czynnik wzrostu oraz rodzaj podłoża zaobserwowano istotne różnice, w szczególności w odniesieniu do receptorów CD 105 oraz CD 166. W obu przypadkach wartości notowane dla grupy

ECGS FN były istotnie wyższe od wartości w pozostałych grupach. Może to świadczyć o tym że różnicowanie komórek MSC w hodowlach *in vitro* zależne jest zarówno od oddziaływania czynników chemicznych jak i od oddziaływań mirmekomechanicznych. Nie obserwowano natomiast istotnych różnic w gęstości hodowli i tempie wzrostu komórek. Badania morfologiczne wykazały natomiast istotne różnice indeksu kształtu komórkowego w poszczególnych grupach badanych. Badania biomechaniczne wykazały istotnie wyższe wartości modułu elastyczności dla rusztowań syntetycznych wykonanych z Dakronu w porównaniu do tkanek biologicznych, jednocześnie rusztowania syntetyczne wykazywały mniejsze odkształcenie względne w stosunku do biologicznych acellularnych. W wyniku wykonanych testów zmęczeniowych zaobserwowano wzrost modułu elastyczności i zmniejszenie odkształcenia dla rusztowań syntetycznych, podczas gdy dla tkanek acellularnych odnotowano spadek modułu elastyczności. Badania modelowania komputerowego wykazało że rusztowanie syntetyczne ze względu na dużą sztywność zaburza zmniejsza wydajność pracy serca (EF) oraz zwiększa naprężenia ścienne lewej komory serca. Modelowanie komputerowe wykazało że duża sztywność rusztowania stosowanego do remodelowania lewej komory może powodować deformację pierścienia zastawki i zwiększenie odległości pomiędzy mięśniami brodawkowatymi co może przyczynić się w sposób pośredni do niedomykalności zastawki mitralnej. Przeprowadzone badania wykazały że izolowane ze szpiku kostnego komórki mononuklearne mogą być z powodzeniem hodowane i różnicowane w warunkach *in vitro*. Różnicowanie komórek zależne jest zarówno od czynników chemicznych, jak i od stymulacji mirmekomechanicznej. Hodowane i różnicowane komórki mogą w sposób efektywny zasiedlać acellularne matryce, tworząc łąty biologiczne w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Cechy biomechaniczne rusztowań biologicznych mogą przyczynić się do poprawy kurczliwości lewej komory serca, redukując ograniczenia związane ze stosowaniem rusztowań syntetycznych. Dodatkowo możliwość zasiedlania acellularnych rusztowań komórkami MSC może przyczynić się do indukcji procesów naprawczych i remodelowania.

4. Wilczek P. Heart Valve Bioprosthesis; effect of different acellularizations method on the biomechanical and morphological properties of porcine aortic and pulmonary valve. *Biuletyn of the Polish Academy of Sciences –Technical Sciences*. 2010; 58(2): 337-342. **IF - 0.945, MNISW - 9**

Celem pracy była ocena efektywności wybranych metod acellularyzacji i ich wpływu na właściwości morfologiczne i biomechaniczne ECM. Ponadto analizowano jak rodzaj tkanki wpływa na zmiany w obrębie badanych parametrów. Właściwości bioprotez zastawek serca otrzymywanych z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej w tym jej trwałość zależne są między innymi od właściwego doboru metody acellularyzacji. Efektywność procesu acellularyzacji może wpływać zarówno na właściwości biomechaniczne tkanek jak i na cechy strukturalne. Dlatego proponowanych jest szereg metod acellularyzacji. Najprostszą z nich jest metoda cyklicznego zamrażania i rozmrażania, jej zastosowanie powoduje jednak szereg zmian degeneracyjnych w obrębie ECM, cechuje się niską efektywnością usuwania komórek. Ponadto tego rodzaju tkanki nie podlegają reendotelializacji. Często stosowane są również metody enzymatyczne w tym inkubacja w roztworze Trypsyna/EDTA. Jednak pomimo relatywnie dużej efektywności możliwe jest niepełne usunięcie komórek czy reszt komórkowych co może przyczynić się do zmian degeneracyjnych w obrębie tkanki. Z kolei przedłużenie czasu inkubacji może wprawdzie zwiększać efektywność usuwania komórek to jednak zwiększa ryzyko zmian strukturalnych ECM. Z tego względu intensywnie rozwijane są metody chemicznej acellularyzacji z zastosowaniem detergentów jonowych i niejonowych.

Do badań wykorzystano fragmenty pierścienia zastawki płucnej i aortalnej. Tkanki poddano procedurze acellularyzacji z wykorzystaniem dwóch metod: 48h inkubacja w roztworze Trypsyna/EDTA w połączeniu z krótkoterminową inkubacją w roztworze SDS b) 48 h inkubacja w roztworze Deoxyholanu w połączeniu z Tritonem X-100. Oceniano następnie zmiany morfologiczne z zastosowaniem metod mikroskopii świetlnej. Właściwości biomechaniczne oceniano poprzez zastosowanie jednoosiowego testu naprężeń, i porównywano wartości modułu elastyczności, odkształcenia rzeczywistego oraz energii zrywania. Badano również zdolność do zasiedlania

komórkowego tkanek poddanych procesowi acellularyzacji. Zaobserwowano że zastosowanie metody enzymatycznej powoduje prawie całkowite usunięcie komórek, z zachowaniem prawidłowej struktury ECM. Z kolei użycie metody detergentowej wykazało małą efektywność usuwania komórek, znaczna część fibroblastów i komórek interstycjalnych pozostała w obrębie ECM. Dodatkowo w tej grupie badanej zaobserwowano delaminację tkanek. Badania biomechaniczne wykazały istotne różnice w badanych parametrach pomiędzy tkanką zastawki płucnej i aortalnej, dotyczyło to zarówno tkanek natywnych jak i acellularnych. Zaobserwowano również że tkanki zastawek płucnych wykazywały większą wrażliwość na zmiany wywołane procesem acellularyzacji. Badanie zasiedlania komórkowego wykazało że w przypadku zastosowanie metody enzymatycznej komórki tworzyły na powierzchni tkanki jednolitą monowarstwę żywych komórek, z kolei w przypadku metody detergentowej nie obserwowano zasiedlania komórkowego, na powierzchni tych tkanek występowały nieliczne komórki nekrotyczne.

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać że efektywność procesu acellularyzacji zależna jest zarówno od wyboru metody jak i od rodzaju tkanki. Większą efektywność usuwania komórek odnotowuje się dla metod enzymatycznych. Wprawdzie generują one ryzyko niespecyficzných zmian w obrębie ECM, to jednak zmiany te mogą podlegać procesom naprawczym i remodelowania, dzięki możliwości nahodowywania komórek autologicznych. Zastosowanie metody detergentowej nie pozwala na całkowite usunięcie komórek, ponadto ze względu na indukowanie zmian morfologicznych w postaci delaminacji tkanki, może być przyczyną tworzenia tętniaków w obrębie pierścienia zastawki. Trudność wypłukania i inaktywacji detergentów powoduje że pozostałe reszty detergent wywołują efekt cytotoksyczny, tym samym uniemożliwiają nahodowywanie komórek autologicznych i stymulowania procesów naprawczych i remodelowania w obrębie modyfikowanych tkanek.

5. Wilczek P, Zembala M Jr, Cichoń T, Smolarczyk R, Szala S, Zembala M. Scaffold construction for effective transfer of cardiac stem cells to the damaged heart. Kardiologia i Torakochirurgia Polska. 2012; 2: 231–242. IF - 0.205, MNISW - 15

Celem badań była ocena zdolności wzrostu izolowanych komórek macierzystych i progenitorowych serca na zróżnicowanych podłożach, które mogą mieć potencjalne zastosowanie do tworzenia bezkomórkowych rusztowań do nahodowywania i transferu CSC/CPCs do uszkodzonego mięśnia sercowego. Komórki macierzyste i progenitorowe izolowane z mięśnia sercowego mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu chorobowo uszkodzonego mięśnia sercowego. O efektywności leczenia decydować mogą takie czynniki, jak sposób izolacja CSC/CPCs i ich namnażanie w warunkach *in vitro*. Niemniej jednak istotne jest opracowanie optymalnej metody transferu tych komórek do uszkodzonego mięśnia sercowego. Zastosowanie rusztowań komórkowych może być jedną z metod transferu komórek do niedokrwienne zmienionego obszaru mięśnia sercowego. Należy zauważyć, że funkcje komórek macierzystych mogą być modulowane poprzez oddziaływanie z mikrośrodowiskiem ECM, poprzez bezpośrednią transdukcję sygnału przez receptory integrynowe. Do badań wykorzystywane były komórki izolowane z fragmentów tkanek pobranych z eksplanowanego mięśnia sercowego. Wykonywano hodowle pierwotne, z których po okresie około 3 tygodniu uzyskiwano hodowle wtórne na podłożach selektywnych opłaszczonych Poli-D lizyną. Komórki w hodowli wtórnej tworzyły kardiosfery, i podlegały każdorazowo ocenie fenotypowej z wykorzystaniem cystometrii przepływowej. Komórki te wykazywały ekspresję receptora c-kit, MDR-1 ale większość cechował fenotyp komórek mezenchymalnych zrębu. W dalszej kolejności komórki z hodowli wtórnej przenoszono do naczyń opłaszczonych: fibronektyną, klagenem IV, żelatyną oraz lamininą i hodowano w mediach suplementowanych czynnikami wzrostu oraz bez czynników wzrostu. Ocenę cech morfologicznych oraz charakteru wzrostu wykonywano z zastosowaniem technik kontrastu fazowego, dla sparametryzowania zmian morfologicznych w obrębie poszczególnych hodowli wykorzystano analizę wymiaru fraktalnego (FD). Wartości wymiaru fraktalnego analizowano w odniesieniu do ekspresji receptora c-kit oraz MDR-1. Zaobserwowano że w hodowlach prowadzonych na podłożach opłaszczonych fibronektyną oraz kolagenem IV

hodowanych w mediach nie suplementowanych czynnikami wzrostu następował istotny wzrost wartości FD, wzrost taki nie był obserwowany w przypadku suplementacji medium hodowlanego czynnikami wzrostu. Podobnie nie obserwowano wzrostu FD w hodowlach prowadzonych na podłożach opłaszczonych lamininą lub żelatyną. Jednocześnie zaobserwowano największą ekspresję receptora c-kit i MDR-1 w przypadku hodowli prowadzonych w kontakcie z fibronektyną. Właściwy wzrost, migracja, różnicowanie komórek macierzystych zależy od wielu czynników w tym od interakcji z elementami ECM, które pełnią rolę nie tylko podporową dla hodowanych komórek ale również w sposób aktywny uczestniczą w indukowaniu proliferacji, wzrostu, migracji, adhezji i różnicowaniu komórek. Dlatego też czynnik ten powinien być uwzględniany przy konstrukcji rusztowań służących do transferu komórek macierzystych do uszkodzonego mięśnia sercowego. Dodatkowym czynnikiem, działającym w sposób komplementarny, decydującym o różnicowaniu komórek macierzystych jest właściwy dobór czynników wzrostu. Wzajemne oddziaływanie czynników mikromechanicznych wynikających z oddziaływania z rusztowaniem biologicznym oraz czynników chemicznych może decydować o powodzeniu klinicznym terapii komórkowych.

6. R, Lackner JM, Gorka K, **Wilczek P**, Major B. Inner surface modification of the tube-like elements for medical applications. RSC Adv. 2013; 3: 11283-1129. **IF - 3.708, MNISW - 30**

Praca ta koncentruje się na modyfikacji elementów układu wspomagania krążenia mających kontakt z naturalną tkanką. Jej głównym celem pracy jest modyfikacja powierzchniowa materiałów polimerowych w taki sposób aby zwiększyć jej biokompatybilność, w trakcie długoterminowego kontaktu z krwią. Skoncentrowano się na wytworzeniu materiałów biomimetycznych tak aby odtworzyć naturalną powierzchnię uzyskując przez to analogi tkankowe. Materiały polimerowe stanowiły w tej pracy układ modelowy, ale zaproponowane mechanizmy mogą znaleźć zastosowanie w modyfikacji naturalnych rusztowań tkankowych. W ramach pracy wykonana została wielkoskalowa diagnostyka powierzchni obejmująca badania materiałowe oraz ocenę hemokompatybilności i biokompatybilności. W przypadku ostrych incydentów niewydolności krążenia zastosowanie znajdują krótkoterminowe układy wspomagania krążenia. Z kolei w przypadku przewlekłej niewydolności serca często koniecznym jest użycie układu wspomagania krążenia w sposób długoterminowy lub permanentny. W tych sytuacjach o powodzeniu terapii decydują nie tylko elementy konstrukcyjne układów wspomagania krążenia ale równie istotny jest dobór odpowiednich materiałów o charakterze biomimetycznym. Dzięki temu minimalizuje się ryzyko indukcji reakcji zapalnej, aktywacji i adhezji płytek krwi. W badaniach zastosowano materiały polimerowe pokrywane: węglikiem krzemu, azotkiem krzemu oraz tlenkiem krzemu. Zastosowano w tym celu technikę wyładowania jarzeniowego. Badania hemokompatybilności wykonywano na modelu przepływu aortalnego wykorzystując w tym celu jednostki krwi pozyskane ze stacji krwiodawstwa. Wykonywano również badania na dużym mechanicznym modelu symulacji przepływu aortalnego, z kolei do tych badań wykorzystano krew świńską. W przypadku modelu mechanicznego symulacji przepływu aortalnego badania wykonywano w układzie statycznym oraz dynamicznym. Wykorzystując technikę cystometrii przepływowej badano główne receptory odpowiedzialne za aktywację płytek krwi CD62P, oceniano również ilość agregatów leukocyarno płytkowych pozytywnych względem receptorów CD45/CD62P. Każdorazowo pobierano również fragmenty materiału do badań mikroskopowych w celu określenia ilości zadherowanych płytek krwi i agregatów leukocyarno-płytkowych. W pracy tej wykazano że technika wyładowania jarzeniowego może być skutecznie stosowana do modyfikacji powierzchniowej elementów protez sercowo-naczyniowych kontaktujących się długoterminowo z krwią. Dzięki zastosowanej metodzie możliwe jest deponowanie na powierzchni związków azotku krzemu, tlenku krzemu i węglika krzemu. Tego rodzaju modyfikacja przyczynia się do hamowania efektu aktywacji płytek krwi i dzięki temu może być wykorzystywana w tworzeniu zaawansowanych biokompatybilnych rusztowań w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Badania wykazały że największy potencjał wiąże się z zastosowaniem warstw węglika krzemu. Praca ta wskazała również na konieczność dalszych badań mających na celu poprawę hemokompatybilności rusztowań biologicznych i syntetycznych. Otrzymane wyniki mogą bowiem sugerować że obserwowane w badaniach zmniejszenie liczby płytek krwi i leukocytów może być związane z ich aktywacją której efektem może być adhezja płytek krwi i agregatów płytkowo-leukocytarnych oraz płytkowo-

plytkowych do powierzchni biomimetycznych materiałów.

7. **Wilczek P**, Lesiak A, Niemiec-Cyganek A, Kubin B, Slomski R, Nozynski J, Wilczek G, Mzyk A, Gramatyka M. Biomechanical properties of hybrid heart valve prosthesis utilizing the pigs that do not express the galactose- α -1,3-galactose (α -gal) antigen derived tissue and tissue engineering technique. *Journal of Material Science – materials in medicine*. 2014. Doi: 10.1007/s10856-014-5295-0 **IF - 2.379, MNISW - 25**

Celem badania była ocena właściwości biomechanicznych bioprotez zastawek serca pochodzących od świń transgenicznych pozbawionych epitopu 1,3 α -GAL (galactose- α -1,3-galactose (α -Gal) antygen) i przygotowywanych z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej. Chirurgiczny zabieg wymiany chorobowo zmienionej zastawki jest powszechnie przyjętą metodą w sytuacji wyczerpania możliwości leczenia konwencjonalnego. Biorąc pod uwagę ograniczenia związane z komercyjnie dostępnymi protezami zastawkowymi poszukuje się wciąż metod alternatywnych wytwarzania bioprotez sercowych jedną z nich są metody inżynierii tkankowej. Ze względu na podobieństwo fizjologiczne i morfologiczne od dawna wykorzystywane są w tym celu tkanki świńskie. Jednak obecność na ich powierzchni epitopu 1,3 α -GAL sprawia że indukują one reakcję nadostrego odrzucania co jest bezpośrednią przyczyną utraty funkcjonalności bioprotezy. Możliwe jest zastosowanie metod acellularyzacji które mogą istotnie zredukować ilość epitopu 1,3 α -GAL, jednak ograniczona efektywność tych metod powoduje że komórki mogą zostać niecałkowicie usunięte, a wydłużenie czasu inkubacji może skutkować uszkodzeniem kolagenu i pogorszeniem właściwości biomechanicznych. Dlatego też zwierzęta transgeniczne wydają się ciekawym alternatywnym źródłem tkanek. Warto jednak zwrócić uwagę że pomimo dużego postępu jaki dokonał się w tej dziedzinie nie jest możliwe całkowite zredukowanie odpowiedzi immunologicznej a jedynie jej częściowa supresja. Dlatego wydaje się że połączenie metod biologii molekularnej i technik inżynierii tkankowej może zoptymalizować procedurę przygotowywania bioprotez zastawek serca. W prezentowanej pracy badane były właściwości biomechaniczne natywnych i acellularnych zastawek płucnych i aortalnych pozyskiwanych od świń transgenicznych. Badane tkanki pozyskiwane były od dorosłych świń o wadze 60-80 kg. Tkanki poddawano procedurze acellularyzacji z zastosowaniem metod enzymatycznych. Do badań biomechanicznych wykorzystano jednoosiowe test rozciągania. Badano moduł elastyczności, odkształcenie, energię zrywania. Wszystkie tkanki badano w kierunku osiowym i obwodowym. Badano również właściwości wiskoplastyczne tkanek wykonując test histerezy. Tkanki poddawano również ocenie histologicznej stosując barwienia eozyna-hematoksylina oraz Trichromeme Massona oraz ocenie immunohistochemiczne stosując barwienia dla : elastyny, fibronektyny, kolagenu I, kolagenu IV, włókien elastylowych —Verhoeff's Van Gieson (EVG) oraz barwienie Van Kossa dla oceny stopnia kalcyfikacji. Istotne różnice w energii zrywania w kierunku osiowym obserwowano dla zastawek płucnych natywnych i acellularnych pomiędzy zwierzętami transgenicznymi i nie transgenicznymi przy czym wartości te były wyższe dla tkanek zwierząt transgenicznych. Z kolei w kierunku obwodowym obserwowano istotne różnice pomiędzy wartościami energii zrywania dla zastawek aortalnych. Wartości modułów elastyczności wykazywały tendencję spadkową we wszystkich badanych grupach przy czym różnice istotne odnotowano dla zastawek natywnych i acellularnych płucnych zwierząt nie transgenicznych. Wartości odkształcenia różniły się istotnie dla zastawek acellularnych płucnych pomiędzy zwierzętami transgenicznymi i nietransgenicznymi, wartości odkształcenie były wyższe dla tkanek zwierząt transgenicznych. Właściwości wiskoplastyczne różniły się jedynie dla acellularnych zastawek płucnych pomiędzy grupą zwierząt transgenicznych i nie transgenicznych. Z kolei nadania histologiczne i immunohistochemiczne nie wykazały istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami zwierząt. Z mojej wiedzy wynika że są to pierwsze tego rodzaju badania mające na celu określenie właściwości biomechanicznych zastawek płucnych i aortalnych, natywnych i acellularnych pochodzących od świń transgenicznych pozbawionych epitopu 1,3 α -GAL mogących znaleźć zastosowanie w technikach inżynierii tkankowej. Porównanie właściwości biomechanicznych wskazuje że tkanki zwłaszcza zastawki płucnej zwierząt transgenicznych wykazują większą stabilność biomechaniczną, co może

mieć istotne implikacje praktyczne w zastosowaniach długoterminowych. Wydaje się to bardzo istotne wobec faktu mniejszej podatności na odwiedź immunologiczną tych tkanek *in vivo*. W chwili obecnej brak jest standardów dotyczących przygotowywania bioprotez zastawkowych z wykorzystaniem technik inżynierii tkankowej. Dlatego też wykorzystanie zwierząt transgenicznych wydaje się bardzo atrakcyjnym rozwiązaniem, ale wymaga z pewnością optymalizacji procedur i dalszych badań.

8. Wilczek P, Malota Z, Baranska A, Niemiec-Cyganek A, Kubin B, Slomski R, Nozynski J, Wilczek G, Mzyk A, Gramatyka M, Opiela J. Age-related changes in biomechanical properties of transgenic porcine pulmonary and aortic conduits. *Biomedical Materials*. Biomed. Mater. 9 (2014) 055006. **IF - 2.922, MNISW - 30**

Większość badań dotyczących zagadnień związanych z inżynierią tkankową zastawek serca wykorzystuje tkanki dorosłych zwierząt. Jednakże, ze względu na to że jednym z czynników wpływających na prawidłowe działanie bioprotezy zastawki po wszczępieniu jest jej odpowiedni dobór dla danego pacjenta, ważne jest, aby ocenić przydatność pozyskiwanych świńskich zastawek serca uwzględniając takie parametry jak wiek zwierzęcia i związana z tym waga. Dlatego celem badania była ocena jak wiek zwierzęcia może wpływać na właściwości biomechaniczne i hemodynamiczne świńskich zastawek serca poddanych procedurze acellularyzacji. Istnieją ograniczone dane dotyczące biomechanicznych i morfologicznych właściwości aortalnych i płucnych zastawek serca, pochodzących od zwierząt o różnym wieku i masie ciała, w szczególności pod względem ich przydatności w zastosowaniach związanych z inżynierią tkankową. Warto tutaj zaznaczyć że sukces tych technik zależy nie tylko od metod acellularyzacji i nahodowywania komórek, ale również od prawidłowego doboru wielkości zastawki, którą determinuje stabilność biomechaniczną i morfologiczną. Powodzenie kliniczne zabiegu wymiany zastawki serca zależy od właściwego doboru rozmiaru zastawki dla danego pacjenta. Odpowiednio dobrany rozmiar zastawki serca optymalizuje efektywną powierzchnię pola otwarcia zastawki (EOA) oraz zapobiega niedopasowania protezy (patient prosthesis mismatch - PPM), co przekłada się na lepsze właściwości hemodynamiczne. Dodatkowym czynnikiem jakie należy brać pod uwagę jest fakt że wraz z wiekiem zmienia się skład białek macierzy zewnątrzkomórkowej co z kolei mieć wpływ na efektywność acellularyzacji tkanek i właściwości biomechaniczne bezkomórkowych rusztowań. Nasze badanie miało na celu ocenę wpływu wieku zwierząt na biomechaniczne właściwości świńskich zastawek serca po acellularyzacji, w celu określenia kryteriów konstrukcji bioprotez zastawkowych w oparciu o techniki inżynierii tkankowej. Badania obejmowały ocenę morfologiczną tkanek, ocenę właściwości biomechanicznych oraz modelowanie komputerowe dla określenie wpływu zmian parametrów biomechanicznych na właściwości przepływu, narażeń ściennych i rozproszenia energii. Uzyskane wyniki wskazują na wzrost parametrów biomechanicznych w relacji do wieku zwierząt. Pomimo rosnącej tendencji, można zauważyć, że parametry biomechaniczne świń dorosłych o masie ciała 70 kg, co jest równoważne do wagi dorosłego człowieka, wykazują niższe wartości niż oczekiwane dla tkanek ludzkich. Modelowanie komputerowe wykazało natomiast że obserwowane różnice w parametrach biomechanicznych pomiędzy tkanką ludzką a świńską nie powinny mieć wpływu na warunki przepływu krwi. Zastawki świńskie są znacznie słabsze od tkanek ludzkich, powoduje to ryzyko niewystarczającej trwałości tkanek świńskich po implantacji w organizmie człowieka. Dane te mogą być szczególnie istotne w przypadku procedury acellularyzacji która dodatkowo obniża stabilność mechaniczną tkanek. Dlatego też tworzenie bioprotez zastawkowych z użyciem technik inżynierii tkankowej powinno uwzględniać zastosowanie nietoksycznych związków stabilizujących ECM.

9. Wilczek P, Zembala M, Zembala OM, Mzyk A, Cichoń T, Smolarczyk R. Cardiac stem and progenitor cells as a potential therapeutic agent for the treatment of damaged cardiac muscle. Polish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2013; 10 (1): 51–61.

MNISW - 15

Celem pracy była izolacja CSCS/CPC z fragmentów tkanki pochodzących z różnych obszarów mięśnia sercowego, charakterystyka ich fenotypu i cech morfologicznych. Przesłanką do tego rodzaju badań były dane literaturowe wskazujące na różnice morfologiczne pomiędzy kardiomiocytami izolowanymi z przedsionka oraz komory serca. Różnice te skutkowały również odmienną charakterystyką oddziaływania tych komórek z wybranymi rodzajami podłoża. Wydaje się że czynnik ten może mieć istotne znaczenie dla prawidłowej konstrukcji rusztowania tkankowego. Izolacja komórek prowadzona była z zastosowaniem metod enzymatycznych z fragmentów tkanek pochodzących z eksplantowanego mięśnia sercowego. Komórki izolowano z: prawej komory serca, lewej komory serca, prawego przedsionka, lewego przedsionka, przegrody międzykomorowej, koniuszka serca. Przed przystąpieniem do analizy właściwości morfologicznych wykonywana była ocena fenotypowa hodowanych komórek. Badano ekspresję receptorów: c-kit, CD90, CD45, CD31, CD73, CD105, CD144, Lin-1, Lin-2, Lin-3, Nkx 2.5, MDR-1, GATA-4. Oceniając morfologię komórek na każdym z etapów hodowli dokonywano obserwacji z zastosowaniem techniki kontrastu fazowego Plas-DIC. Wykorzystywano również technikę mikroskopii fluorescencyjnej stosując barwienia: DAPI, barwienie filamentów aktynowych przy użyciu falloidyny oraz barwienie cytoszkieletu jądrowego wykorzystując przeciwciała anti-vimentin. Oceniając morfologię hodowli koncentrowano się głównie na obserwacji tempa migracji komórek z fragmentów tkanek, tempo wzrostu hodowli, zmiany indeksu kształtu komórkowego stosując formułę $4\pi A/p^2$ - gdzie A- powierzchnia komórki, p – obwód komórki. Zaobserwowano że komórki po przeniesieniu na podłoża opłaszczone PoliD lizyną tworzyły sfery, z widocznymi strukturami kapilarnymi. Izolowane komórki wykazywały nieznaczny odsetek komórek c-kit pozytywnych, część komórek wykazywała ekspresję czynników transkrypcyjnych: Nkx 2.5, MDR-1 i GATA-4. Ponad 80% komórek było CD90 pozytywnych, podczas gdy ekspresję receptora CD105 i CD144 wykazywało odpowiednio 97.1% 98.1%. Z kolei procent komórek Lin-2 i Lin-3 nie przekraczał 3%. Wyniki te wskazują że izolowane komórki posiadają fenotyp mezenchymalnych komórek zrębu. Parametry morfologiczne izolowanych komórek oceniane były w odniesieniu do miejsca izolacji oraz charakterystyki wzrostu hodowli. Badania morfologiczne obejmowały ocenę parametrów komórkowych takich jak zmiany powierzchni komórkowej, indeksu kształtu komórkowego, powierzchni wzrostu. Odnotowano, że średni czas do rozpoczęcia migracji komórek w hodowli pierwotnej wynosił 1 tydzień, z największym tempem wzrostu pomiędzy 7 i 11 dniem hodowli. W kolejnych dniach wzrost był hamowany głównie na skutek inhibicji kontaktowej. Podobne zależności obserwowano dla indeksu kształtu komórkowego. Z kolei w hodowli wtórnej odnotowano, że największe zmiany wielkości sfer odnotowano pomiędzy 3 i 9 dniem hodowli. Po około 2 tygodniach średnia wielkość sfer wynosiła około 170 μm , pojedyncze sfery osiągały wielkość 300 μm . Analiza morfologiczna oraz charakterystyki wzrostu, komórek pobieranych z różnych fragmentów mięśnia sercowego wskazywała, różnice zarówno w hodowli pierwotnej jak i wtórnej. Badania te mogą wskazywać że jeżeli w obrębie poszczególnych obszarów mięśnia sercowego występują różnice takich parametrów jak ciśnienie krwi, grubość ściany, parametry wiskoplastyczne i mechanobiologiczne to mogą one wpływać na morfologię i wzrost komórek mięśnia sercowego w poszczególnych obszarach. Wydaje się że występujące różnice morfometryczne powinny być uwzględniane w optymalizacji procedur związanych z zastosowaniem terapii komórkowych w medycynie regeneracyjnej. Mogą mieć również znaczenie dla właściwej konstrukcji rusztowania komórkowego przeznaczonego do transferu komórek macierzystych do chorobowo zmienionego obszaru mięśnia sercowego.

for / czub