

AUTOREFERAT

dr n.med. Tomasz Dębski

***Zakład Medycyny Regeneracyjnej,
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie,
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie***

Warszawa 2023

Spis treści

1. Imię i Nazwisko	2
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	2
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Wykaz publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku	3
4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników	
4.3.1 Wprowadzenie	
4.3.1.1. Podstawy inżynierii tkankowej	5
4.3.1.2. Inżynieria tkankowa jako narzędzie rekonstrukcji tkanek dla chirurgii rekonstrukcyjnej	10
4.3.1.3. Miejsce badań przedstawionych w cyklu publikacji we współczesnej inżynierii tkankowej	12
4.3.2. Cel badań przedstawionych w cyklu publikacji	13
4.3.3. Szczegółowe omówienie artykułów cyklu publikacji	14
4.3.4. Wnioski płynące z przedstawionego cyklu publikacji	27
4.3.5. Zastosowanie kliniczne przeprowadzonych badań	28
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	
5.1. Inżynieria tkankowa	32
5.2. Chirurgia rekonstrukcyjna	33
5.3. Nowotwory skóry	37
5.4. Podsumowanie opisanego dorobku naukowego (analiza bibliometryczna)	39
6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	
6.1. Projekty naukowe	40
6.2. Indywidualna współpraca naukowa	43
6.3. Zagraniczne staże naukowe	43
7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę	
7.1. Osiągnięcia dydaktyczne	44
7.2. Osiągnięcia organizacyjne	46
7.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę	47
8. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej	
8.1. Nagrody i wyróżnienia	48
8.2. Recenzje prac naukowych w międzynarodowych czasopismach	49
8.3. Członkostwo w towarzystwach naukowych	49
8.4. Wybrane kursy i szkolenia	49
9. Piśmiennictwo	50

1. Imię i nazwisko: **Tomasz Dębski**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne - z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

21.11.2018 r. - uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych w dziedzinie medycyna uchwałą Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pod tytułem „*Wpływ prefabrykacji chirurgicznej rusztowań polimerowych na właściwości angiogenne i osteogenne komórek ADSC*”. Promotor: prof. dr hab. Zygmunt Pojda, recenzenci: prof. dr hab. Maria Podolak-Dawidziak, prof. dr hab. Jerzy Strużyna

06.03.2015 r. - uzyskanie tytułu specjalisty chirurgii plastycznej nadanego przez Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi po złożeniu Państwowego Egzaminu Specjalizacyjnego i zrealizowaniu programu specjalizacji w latach 2009-2015 pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Jethona i prof. dr hab. Bartłomieja Noszczyka. Miejscem odbywania specjalizacji była Klinika Chirurgii Plastycznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

15.06.2007 - uzyskanie dyplomu lekarza medycyny wydanego przez Akademię Medyczną w Warszawie, I Wydział Lekarski po odbyciu studiów medycznych w latach 2001-2007. Studia ukończone z wyróżnieniem za działalność naukową („Złota odznaka” Studenckiego Towarzystwa Naukowego.)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

03.10.2011 – obecnie – asystent (współpraca w ramach projektów naukowych) Zakładu Medycyny Regeneracyjnej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie.

13.12.2014 – obecnie - starszy asystent w Oddziale Chirurgii Plastycznej, SPSK im. Prof. W. Orłowskiego w Warszawie.

01.03.2015 – obecnie - konsultant z zakresu chirurgii plastycznej, Szpital Dziecięcy im. prof. dr. med. Jana Bogdanowicza w Warszawie.

14.07.2015 – obecnie - konsultant z zakresu chirurgii plastycznej, Oddział Chirurgii Urazowo-Ortopedycznej, Szpital Czerniakowski w Warszawie.

20.03.2015 – obecnie - konsultant z zakresu chirurgii plastycznej, Oddział Neurochirurgii, Mazowiecki Szpital Bródnowski w Warszawie.

01.09.2010 - 30.06.2016 – asystent naukowo-dydaktyczny w Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP w Warszawie.

01.01.2019 - 01.03.2020 – starszy asystent, Oddział Chirurgii Plastycznej, Rekonstrukcyjnej i Szczękowej, Państwowy Instytut Medyczny, MSWiA w Warszawie.

15.11.2019 - 30.11.2020 - konsultant z zakresu chirurgii plastycznej, Klinika Nowotworów Piersi i Chirurgii Rekonstrukcyjnej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej – Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie.

01.11.2008 - 12.12.2014 - młodszy asystent rezydent w Oddziale Chirurgii Plastycznej, SPSK im. Prof. W. Orłowskiego w Warszawie.

01.10.2007 - 31.10.2008 - lekarz stażysta, SPSK im. Prof. W. Orłowskiego w Warszawie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Inżynieria tkankowa jako nowe narzędzie rekonstrukcji tkanek w chirurgii plastycznej.
Zastosowanie tłuszczowych komórek macierzystych (ASCs) i rusztowań polimerowych wytworzonych drogą inżynierii tkankowej w wytwarzaniu tkanek dla potrzeb chirurgii rekonstrukcyjnej.
Badania przedkliniczne na modelu zwierzęcym.

4.2. Wykaz publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny:

1. **Dębski T**, Kurzyk A, Ostrowska B, Wysocki J, Jaroszewicz J, Świąszkowski W, Pojda Z. Scaffold vascularization method using an adipose-derived stem cell (ASC)-seeded scaffold prefabricated with a flow-through pedicle. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jan 23;11(1):34. doi: 10.1186/s13287-019-1535-z. PMID: 31973733; PMCID: PMC6979360. **(publikacja 1)**

IF= 6,83; punkty MNiSW = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu badań *in vivo*, stworzeniu bazy danych, zdefiniowaniu hipotez statystycznych i interpretacji uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami i tabelami, korespondencji z redakcją, a także edycji odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. **Dębski T**, Wysocki J, Siennicka K, Jaroszewicz J, Szlązak K, Świąszkowski W, Pojda Z. Modified Histopathological Protocol for Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Preserving Their Trabecular, Honeycomb-like Structure. *Materials (Basel).* 2022 Feb 25;15(5):1732. doi: 10.3390/ma15051732. PMID: 35268968; PMCID: PMC8911251. **(publikacja 2)**

IF= 3,62; punkty MNiSW = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu badań *in vivo*, stworzeniu bazy danych, zdefiniowaniu hipotez statystycznych i interpretacji uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami i tabelami, korespondencji z redakcją, a także edycji odpowiedzi na uwagi recenzentów.

3. Kurzyk A, **Dębski T**, Świąszkowski W, Pojda Z. Comparison of adipose stem cells sources from various locations of rat body for their application for seeding on polymer scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019 Apr;30(5):376-397. doi: 10.1080/09205063.2019.1570433. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30686126. **(publikacja 3)**

IF= 2,69; punkty MNiSW = 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy zakładającej różne właściwości komórek ASCs w zależności od lokalizacji tkanki tłuszczowej, wykonaniu badań *in vivo* oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

4. Siennicka K, Zołocińska A, **Dębski T**, Pojda Z. Comparison of the Donor Age-Dependent and *In Vitro* Culture-Dependent Mesenchymal Stem Cell Aging in Rat Model. *Stem Cells Int.* 2021 May 14; 2021:6665358. doi: 10.1155/2021/6665358. PMID: 34093710; PMCID: PMC8140846. **(publikacja 4)**

IF= 5,44; punkty MNiSW = 100

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy zakładającej różne właściwości komórek ASCs w zależności wieku szczura, wykonaniu badań *in vivo* oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

5. Zołocińska A, Siennicka K, **Dębski T**, Gut G, Mazur S, Gajewska M, Kaminski A, Pojda Z. Comparison of mouse, rat and rabbit models for adipose - Derived stem cells (ASC) research. *Curr Res Transl Med.* 2020 Nov;68(4):205-210. doi: 10.1016/j.retram.2020.07.001. Epub 2020 Aug 22. PMID: 32843322. **(publikacja 5)**

IF= 4,51; punkty MNiSW = 70

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań *in vivo* na modelu szczurzym oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

6. **Dębski T**, Kijeńska-Gawrońska E, Zołocińska A, Siennicka K, Słysz A, Paskal W, Włodarski PK, Świąszkowski W, Pojda Z. Bioactive Nanofiber-Based Conduits in a Peripheral Nerve Gap Management-An Animal Model Study. *Int J Mol Sci.* 2021 May 25;22(11):5588. doi: 10.3390/ijms22115588. PMID: 34070436; PMCID: PMC8197537. **(publikacja 6)**

IF= 5,92; punkty MNiSW = 140

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu badań *in vivo*, stworzeniu bazy danych, zdefiniowaniu hipotez statystycznych i interpretacji uzyskanych wyników badań oraz przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami i tabelami, korespondencji z redakcją, a także edycji odpowiedzi na uwagi recenzentów.

7. Słysz A, Siennicka K, Kijeńska-Gawrońska E, **Dębski T**, Zołocińska A, Świąszkowski W, Pojda Z. The impact of electroconductive multifunctional composite nanofibrous scaffold on adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell.* 2022 Aug 20;78:101899. doi: 10.1016/j.tice.2022.101899. Epub ahead of print. PMID: 36030673. **(publikacja 7)**

IF= 2,59; punkty MNiSW = 40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu badań *in vivo* oraz pomocy w przygotowaniu manuskryptu.

Łączny Impact Factor publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: 31,6

Łącznie liczba punktów MNiSW stanowiących osiągnięcie naukowe: 660

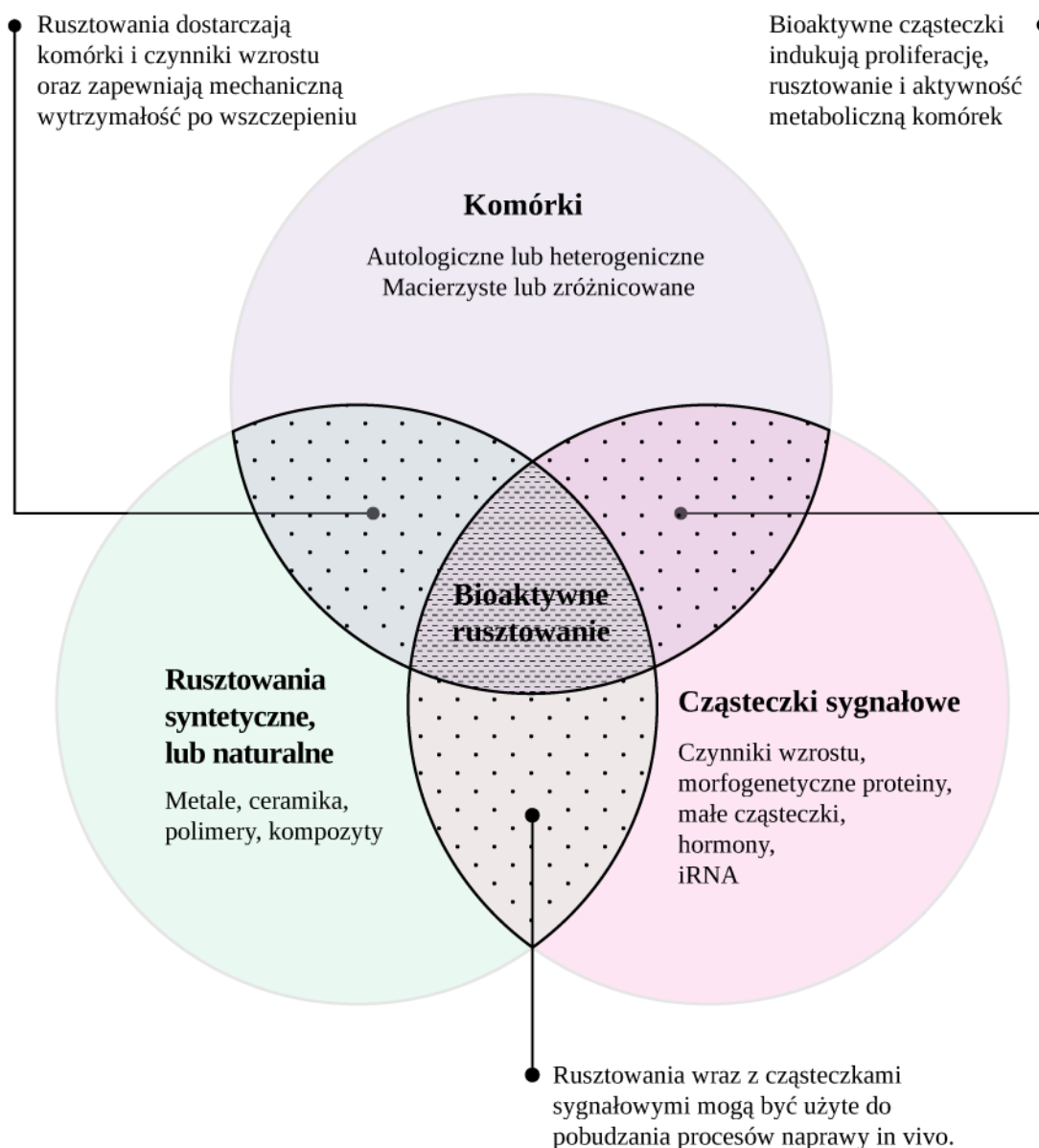
4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

4.3.1 Wprowadzenie

4.3.1.1. Podstawy inżynierii tkankowej

Idea wytwarzania tkanek lub całych narządów w laboratorium intrygowała naukowców od zawsze. Przez długi czas pozostawała jednak w sferze marzeń i była częściej tematem powieści *science-fiction* niż poważnych dyskusji naukowych. Dopiero trwający od końca lat 80-tych ubiegłego wieku intensywny rozwój biologii komórkowej i molekularnej, badania nad komórkami macierzystymi, postępy w inżynierii materiałowej i w technikach obrazowania przyczyniły się do powstania nowej gałęzi nauki – inżynierii tkankowej. Dzięki przełomowym odkryciom ostatnich kilku lat jest ona coraz bliższa urzeczywistnienia odwiecznych marzeń naukowców o regeneracji i wytwarzaniu tkanek *de novo* [1]. Termin „inżynieria tkankowa” został po raz pierwszy użyty w połowie lat 80-tych przez amerykańskiego pioniera w dziedzinie bioinżynierii i biomechaniki Yuan-Cheng Fung, który postulował utworzenie ośrodka naukowego „Center for the Engineering of Living Tissues”. Ośrodek miał zrzeszać naukowców z dziedziny inżynierii, biologii i medycyny a jego zadaniem miało być poznanie mechanizmów funkcjonowania tkanek i opracowanie metody ich wytwarzania i regeneracji [2]. Postulat Yuan-Cheng Fung został odrzucony jednak głoszona przez niego na różnych sympozjach wizja spotykała się z coraz większym zainteresowaniem aż w 1987 r. w ramach sympozjum „Bioengineering and Research to Aid the Handicapped” zorganizowano specjalny panel dyskusyjny poświęcony inżynierii tkankowej. Po raz pierwszy określono cele i założenia tej nowopowstałej dyscypliny [3]. W trakcie tego spotkania powstała także pierwsza definicja inżynierii tkankowej sformułowana przez Allen Zelman’a: „inżynieria tkankowa to nowa multidyscyplinarna dziedzina mająca na celu wyhodowanie tkanek lub organów z pojedynczej komórki pobranej od danego osobnika” [4]. Przez kolejne lata zainteresowanie inżynierią tkankową stale rosnęło a nowe przełomowe odkrycia w zakresie biologii komórkowej i badania nad komórkami macierzystymi czyniły ją coraz bardziej atrakcyjną. Intensywny rozwój nauk biologicznych, medycznych oraz inżynierii materiałowej mający miejsce w latach 90-tych doprowadził do zrewidowania zaproponowanej w 1987 definicji inżynierii tkankowej i zastąpienia jej nową uzupełnioną o ówczesne osiągnięcia. W 1993 Robert Langer i Joseph P. Vacanti na łamach czasopisma „Science” przedstawili podstawy i możliwości inżynierii tkankowej oraz zaproponowali jej nową definicję: „Inżynieria tkankowa jest nową interdyscyplinarną dziedziną, która łączy podstawy inżynierii i nauk przyrodniczych (biologia, chemia, medycyna) w celu wytworzenia biologicznego substytutu danej tkanki, który ma za zadanie przywrócić, utrzymać lub poprawić jej funkcję” [5]. W tym przełomowym artykule wyodrębnione zostały także 3 główne filary regeneracji i wytwarzania tkanek (**Ryc. 1**):

- 1. Komórki**
- 2. Częsteczki sygnałowe**
- 3. Rusztowania syntetyczne lub naturalne**



Ryc. 1. Trzy filary inżynierii tkankowej [6].

Pierwszy filar (**Komórki**) wykorzystuje różnego rodzaju komórki (macierzyste, progenitorowe, zmodyfikowane genetycznie), które zastępują uszkodzone komórki danej tkanki. Najczęściej wykorzystywane są w tym celu mezenchymalne komórki macierzyste (MSC – mesenchymal stem cells). Są one multipotencjalnymi komórkami progenitorowymi, które mają zdolność do różnicowania się przynajmniej w kierunku tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej [7]. Od posiedzenia ISCT (International Society for Cellular Therapy) [8,9] w 2005 roku postuluje się, aby ze względu na nieudowodnioną cechę macierzystości tych komórek nazywać je mezenchymalnymi komórkami zrębu, jednak w publikacjach naukowych i w powszechnym użyciu bardziej zakorzenił się termin mezenchymalne komórki macierzyste i dlatego też będzie on używany poniżej. Mezenchymalne komórki macierzyste muszą spełniać następujące warunki: wzrost in vitro w postaci przylegającej do podłoża, fenotyp charakteryzujący się syntezą antygenów powierzchniowych CD73+, Cd90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14-, lub CD11b-, CD79a- lub CD19-, oraz zdolność do różnicowania się w tkankę

kostną, chrzęstną i tłuszczową [7]. Komórki te mogą być izolowane zarówno z tkanek pochodzenia płodowego (krew pępowinowa [10], galareta Whartona [11,12], sznur pępowinowy [13 – 16], płyn owodniowy [16] jak i z szeregu tkanek w życiu dorosłym: szpik, tkanka tłuszczowa, okostna, błona maziówkowa, mięśnie szkieletowe, skóra, kości, płuca, więzadła przyzębia, miazga zębów [7]. Spośród tych lokalizacji praktyczne zastosowanie mają jedynie komórki izolowane ze szpiku kostnego (BM-MSC – Bone marrow – derived mesenchymal stromal cells) oraz tkanki tłuszczowej (ASCs – Adipose-derived stem cells). Przez wiele lat, szpik kostny był uważany za najlepsze źródło mezenchymalnych komórek macierzystych wykorzystywanych w inżynierii tkankowej. Jednakże ostatnie badania dowiodły, że ilość komórek macierzystych w tkance tłuszczowej jest 100- a nawet 1000-krotnie większa niż w szpiku kostnym [17-19]. Dodatkowo, ASCs namnażają się prawie siedmiokrotnie szybciej niż BM-MSC [20]. Ma to istotne znaczenie ponieważ zmniejsza czas namnażania komórek przed ich różnicowaniem przez co czas pomiędzy ich pobraniem a zastosowaniem ulega znacznemu skróceniu. Poza tym, tkanka tłuszczowa występuje w dużych ilościach w obrębie całego ciała a dzięki jej obecności tuż pod skórą (tłuszczowa tkanka podskórna) ASCs mogą być łatwo izolowane z lipoaspiratu uzyskanego drogą małoinwazyjnego zabiegu liposukcji. ASCs są podobne do BM-MSC zarówno pod względem ich fenotypu jak i ekspresji genów [19,21]. W podobnym stopniu mogą się także różnicować w komórki i tkanki pochodzenia mezodermalnego takie jak adipocyty, chrząstka, kość, mięśnie szkieletowe a nawet komórki nerwowe [22,23]. ASCs są również bardziej homogenne od BM-MSC ponieważ jedyną ilościową znaczącą domieszkę ich populacji stanowią komórki prekursorowe śródbłonna naczyń (EPC – endothelial progenitor cell), biorące czynny udział w angiogenezie. Ze względu na powyższe właściwości ASCs w ostatnich latach trwają intensywne badania nad ich zastosowaniem w inżynierii tkankowej. Badana jest ich biologia, zdolności proliferacyjne, możliwości różnicowania się w różne linie komórkowe czy właściwości angiogenne lub neurogenne. Wymieniony powyżej cykl publikacji (**punkt 4.2**) wpisuje się w nurt tych badań uzupełniając je o ocenę biologii i zdolności proliferacyjnych ASCs w zależności od wieku i ilości pasażu (**publikacja 4**), gatunku zwierzęcia (**publikacja 5**), lokalizacji tkanki tłuszczowej z której są izolowane (**publikacja 3**) czy okresowej ich stymulacji prądem elektrycznym (**publikacja 7**). Dodatkowo same badania nad zasiedlaniem rusztowań polimerowych komórkami ASCs pozwoliły na opracowanie nowej, innowacyjnej metody unaczyniania rusztowań wykorzystującej angiogenne właściwości ASCs (**publikacja 1**) a wytworzenie bioaktywnego przewodnika nerwu (conduitu) zasiedlanego komórkami ASCs umożliwiło zbadanie ich potencjału neurogennego i udowodnienie ich skuteczności w regeneracji nerwów obwodowych (**publikacja 6**).

Drugi filar (**Cząstki sygnałowe**) wykorzystuje czynniki wzrostu i różnicowania, czyli aktywne biologicznie cząstki, które pobudzają zdrowe komórki w obrębie danej tkanki do wzrostu i zastępowania komórek uszkodzonych. Sam proces dostarczania czynników wzrostu do wnętrza rusztowania może odbywać się na drodze bezpośredniej iniekcji czynników do rusztowania (dyfuzja bierna) jak i w wyniku degradacji biomateriału zawierającego czynniki wzrostu. Pierwsza metoda jest coraz częściej zastępowana drugą, ponieważ czynniki wzrostu są niestabilne w warunkach *in vivo*, dlatego wbudowanie ich do rusztowania i stopniowe uwalnianie jest efektywniejsze [24-45]. Czynniki wzrostu mogą być nie tylko wbudowane w strukturę materiału z którego wykonane jest rusztowanie [25-27], mogą być także opłaszczane w biodegradowalnych mikrosferach lub być umieszczone w wolnych przestrzeniach rusztowania [28]. Szybkość degradacji materiału z którego wykonane jest rusztowanie lub mikrosfera określa wtedy kinetykę uwalniania czynników wzrostu. Wszystkie opisane powyżej metody nie są jednak optymalne, ponieważ w praktyce niezwykle trudno jest dopasować kinetykę uwalniania czynników wzrostu do aktualnych potrzeb proliferujących komórek [29]. Dlatego też brak możliwości odtworzenia właściwej kinetyki uwalniania czynników wzrostu, brak odpowiedniej sekwencji ich uwalniania, brak odpowiedniego gradientu stężeń czy też brak

możliwości regulacji procesu uwalniania w zależności od zmieniających się warunków powodują, że czynniki wzrostu i różnicowania stają się w ostatnich latach mniej atrakcyjne dla inżynierii tkankowej. Z tego powodu są coraz częściej zastępowane komórkami macierzystymi (głównie ASCs), które nie posiadają wymienionych powyżej wad. Pełnią one bowiem rolę swoistych „procesorów”, które odbierają sygnały z otoczenia, przetwarzają je i odpowiednio na nie reagują wydzielając odpowiednie czynniki wzrostu i różnicowania przy jednoczesnym zachowaniu ich odpowiedniej kinetyki, sekwencji i gradientu stężeń dostosowanego do zmieniających się warunków otoczenia.

Dwa pierwsze filary mają ograniczone zastosowanie i wykorzystywane są głównie w przypadkach częściowej utraty funkcji danego narządu. Wymagają one bowiem obecności prawidłowego zrębu tkankowego(rusztowania) na którym zasiedlone będą wszczepiane komórki (**pierwszy filar**) lub obecności prawidłowych komórek, które będą mogły zostać pobudzone do wzrostu i różnicowania (**drugi filar**). Ponadto ich zastosowanie jest również niemożliwe w przypadku tkanek uszkodzonych na skutek procesu nowotworowego, ponieważ mogą one przyspieszać rozwój nowotworu [30].

Większe możliwości daje **trzeci filar (rusztowania)**, który poza komórkami i czynnikami wzrostu wykorzystuje specjalistyczne trójwymiarowe rusztowania wykonane zarówno z materiałów wchłanialnych jak i niewchłanialnych.

Rusztowanie (ang. scaffold) jest substytutem macierzy zewnątrzkomórkowej otaczającej komórki danej tkanki. Pełni ono funkcje nie tylko podporowe, ale także aktywnie oddziałuje z komórkami biorąc udział w ich adhezji, namnażaniu, różnicowaniu, migracji i przekazywaniu sygnałów między nimi. Może także być źródłem komórek, czynników wzrostu i różnicowania, genów i różnych białek biorących udział w tworzeniu się danej tkanki [31,32]. Idealne rusztowanie powinno posiadać następujące cechy: odpowiedniej wielkości pory połączone ze sobą w celu umożliwienia jego unaczynienia i integracji z tkanką, powinno być wykonane z materiałów o odpowiedniej biodegradowalności i bioresorbowalności, powinno posiadać odpowiedni profil chemiczny powierzchni umożliwiający adhezję, różnicowanie i proliferację komórek, odpowiednie właściwości mechaniczne właściwe dla danej tkanki, nie powinno powodować reakcji ubocznych po wszczepieniu do organizmu, powinno umożliwiać w sposób łatwy i przewidywalny formowanie w pożądaną wielkość i kształt [33,34]. W celu wytworzenia takiego rusztowania stosuje się różnego rodzaju materiały biodegradowalne, które można podzielić na:

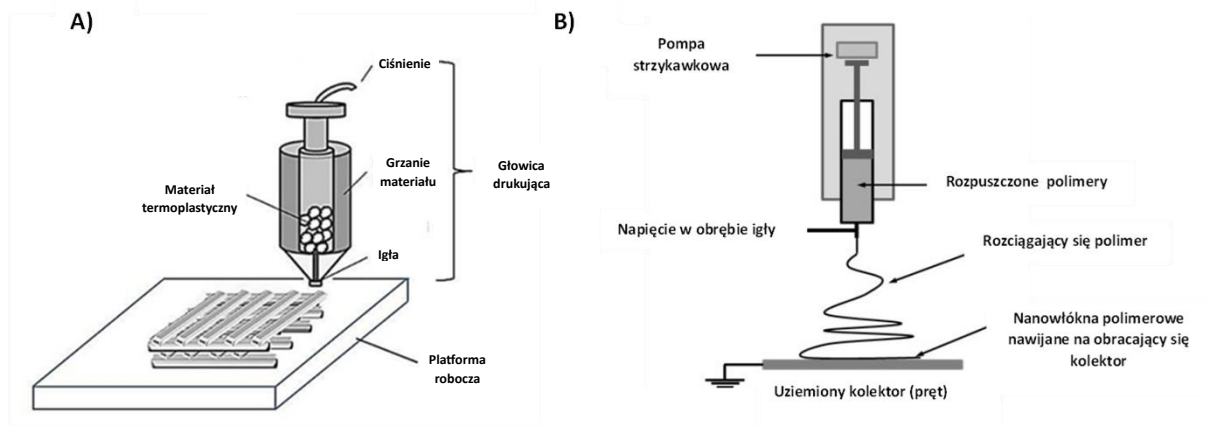
- naturalne: kolagen, hialuronian, chitosan, agarozę/alginat, fibronektyna [35,36],
- syntetyczne: polikaprolakton (PCL), poli(L-laktyd-co-glikolid) (PLGA), poli(L-laktyd) (PLLA), Poly-β-hydroxybutyrat (PHB), poli(tlenek etylenu) (PEG) i wiele innych wraz z ich kopolimerami [35],
- ceramiczne: trójfosforan wapnia (βTCP), hydroksyapatyt (HAp) [36,37],
- kompozytowe: łączące polimerowe materiały syntetyczne z ceramicznymi np. PCL z hydroksyapatytem [38].

Poza doбором odpowiedniego materiału w celu wytworzenia idealnego rusztowania opracowano dotychczas wiele metod jego wytwarzania takich jak elektroprzędzenie (electrospinning), technologie tekstylne, odlew z rozpuszczalnika połączony z ługowaniem cząstek stałych, spienianie gazem, emulgowanie/lifilizacja, indukowany termicznie rozdział faz oraz najbardziej obiecującą technologię druku 3D – metodę przyrostowego kształtowania uplastycznionym polimerem (FDM – Fused Deposition Modeling), która dzięki odpowiedniemu oprogramowaniu CAM/CAD pozwala na zaprojektowanie w najmniejszych szczegółach a następnie wydrukowanie trójwymiarowych rusztowań [35,39-41] (**Ryc. 2A**). Metoda ta wykorzystuje technikę stosowaną w wyciągarkach. Podgrzany w specjalnym zbiorniku do temperatury mięknienia

syntetyczny materiał (np. polikaprolakton) zostaje wytłaczany pod odpowiednim ciśnieniem przez specjalną igłę z wąskim kanałem. W ten sposób uzyskiwane jest pojedyncze włókno polimerowe, które dalej układane jest warstwa po warstwie z tym, że każda kolejna warstwa ułożona jest pod innym kątem względem pierwszej. Budowa wytwarzanego rusztowania, jego wymiary i szczegółowe parametry architektury wewnętrznej takie jak: grubość warstwy, średnica włókien, porowatość, odległość między włóknami w warstwie i orientacja poszczególnych warstw względem kolejnych projektowana jest przez operatora urządzenia w specjalnym programie komputerowym (w technologii CAD) zsynchronizowanym z urządzeniem drukującym. Drukowanie kolejnych warstw zaprojektowanego wcześniej rusztowania powoduje powstanie żądanej trójwymiarowej struktury geometrycznej rusztowania. Technologia ta jako jedna z niewielu pozwala więc na odtworzenie w obrębie wydrukowanego rusztowania dokładnej architektury zrębu tkankowego umożliwiającej wytwarzanie docelowej tkanki poprzez zasiedlenie na rusztowaniu komórki. W oparciu o tą metodę w ramach badań opisanych w **publikacji 1** zaprojektowaliśmy i wydrukowaliśmy innowacyjne rusztowania o architekturze wewnętrznej pozwalającej nie tylko na rozwój tkanki, ale również umożliwiającej wprowadzenie do jego wnętrza naczyń krwionośnych. Wprowadzenie naczyń do wnętrza wytworzonego rusztowania w połączeniu z zasiedleniem rusztowania komórkami ASCs o silnych właściwościach proangiogennych pozwoliło uzyskać efekt synergistyczny i opracować nową, skuteczną metodę unaczyniania rusztowań (**publikacja 1**). Wytworzone w trakcie tych badań innowacyjne, trójwymiarowe rusztowanie polimerowe wykonane z pełni wchłanialnego materiału jakim jest polikaprolakton (PCL) zmusiło nas do opracowania nowego protokołu histopatologicznego pozwalającego na zachowanie skomplikowanej, przypominającej strukturę plastra miodu architektury wewnętrznej zaprojektowanego rusztowania (**publikacja 2**). Dzięki temu, że w opracowanym przez nas procesie obróbki histopatologicznej włókna rusztowania nie ulegają rozpuszczeniu i deformacji, jak w przypadku innych opisywanych metod, możliwa jest ocena przekroju poprzecznego rusztowania w całości, precyzyjna analiza tkanek w obrębie rusztowania uwzględniająca ich rozmieszczenie i interakcje z jego włóknami, a także ocena stopnia degradacji włókien rusztowania.

Kolejną badaną w ramach przedstawionego powyżej cyklu publikacji (**punkt 4.2.**) metodą wytwarzania rusztowań było elektroprzędzenie. Jest to nowoczesna metoda pozwalająca na wytwarzanie różnych nanowłóknistych struktur w formie siatek lub tub. Wykorzystuje ona zjawisko oddziaływania sił elektrostatycznych, które powstają między igłą, przez którą podawany jest ze stałą prędkością roztwór rozpuszczonego polimeru a uziemionym prętem o danej średnicy (kolektorem). Wytworzony między igłą (elektrodą dodatnią) a obracającym się prętem (elektrodą ujemną) ładunek elektryczny powoduje, że podawany przez igłę roztwór ulega rozciągnięciu tworząc włókna o bardzo małej średnicy, które w różnej konfiguracji układane są na obracającym się kolektorze tworząc tubę o danej średnicy [42] (**Ryc. 2B**).

Zastosowanie tej metody pozwoliło nam na wytworzenie tubularnych rusztowań polimerowych tzw. przewodników nerwów (conduit) służących do rekonstrukcji nerwów obwodowych (**publikacja 6**). Pełnią one funkcje swoistych łączników uzupełniających ubytek między końcem proksymalnym a dystalnym nerwu. Ich wewnętrzna struktura i materiał, z którego zostały zbudowane są w pełni biokompatybilne i przyjazne dla regeneracji nerwów a zasiedlenie ich wnętrza komórkami ASCs umożliwia bardziej uporządkowaną i szybszą ich regenerację, co wykazano w **publikacji 6**. Z kolei dołączona do struktury opracowanego przewodnika polianilina umożliwia przewodzenie elektryczne w jego obrębie, co w połączeniu z przedstawionym w **publikacji 7** pozytywnym wpływem stymulacji elektrycznej na właściwości neurogenne komórek ASCs może mieć istotne znaczenie w przyspieszeniu regeneracji nerwów.

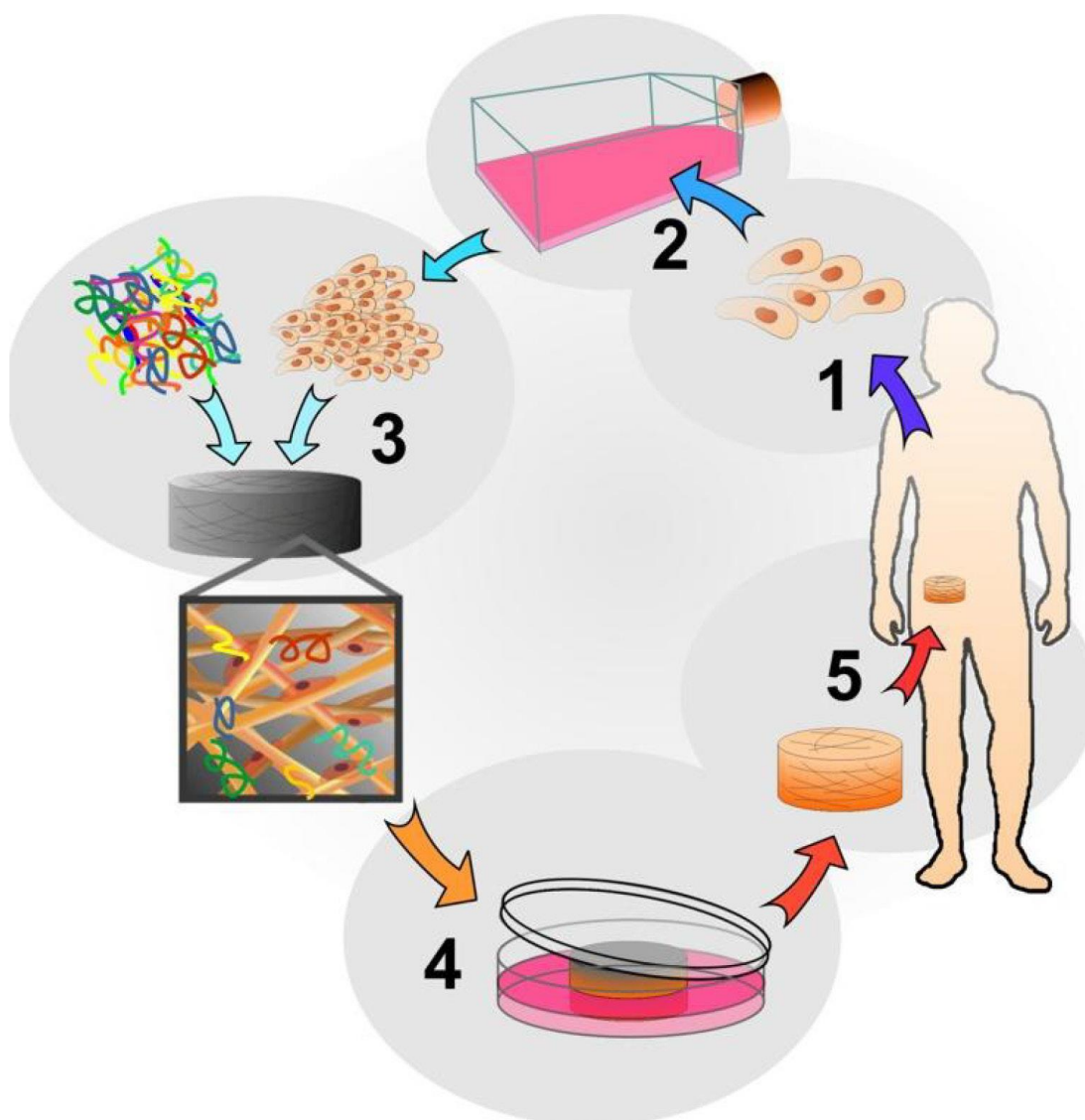


Ryc. 2. Schematy przedstawionych w cyklu publikacji technologii druku polimerowych rusztowań: A) metoda przystosowanego kształtowania uplastycznionym polimerem; B) elektroprzędzenie

4.3.1.2. Inżynieria tkankowa jako narzędzie rekonstrukcji tkanek dla chirurgii rekonstrukcyjnej.

Po wytworzeniu w warunkach laboratoryjnych odpowiednich rusztowań zasiedlane są one komórkami prekursorowymi pobranymi i wyizolowanymi uprzednio od pacjenta. Opcjonalnie, również w warunkach *in vitro*, mogą być one poddawane działaniu różnych czynników wzrostu i różnicowania co w połączeniu z odpowiednimi warunkami pozwala na zróżnicowanie się komórek i wytworzenie pożądanej tkanki na bazie rusztowania już w laboratorium.

W kolejnym etapie wytworzona w ten sposób tkanka wszczepiana jest w miejsce tej brakującej lub usuniętej. Powstały tą metodą tzw. produkt inżynierii tkankowej (TEP – Tissue Engineering Product) zastępuje więc nie tylko uszkodzone komórki, ale całą tkankę (komórki i zrąb tkankowy) uszkodzonego lub brakującego narządu (**Ryc. 3**).



Ryc. 3. Strategia inżynierii tkankowej [43]: 1. Pobranie komórek prekursorowych od pacjenta. 2. Hodowla i izolacja komórek. 3. Zasiedlenie komórkami i czynnikami wzrostu rusztowania. 4. Hodowla i namnażanie komórek w obrębie rusztowania. 5. Wszczepienie zasiedlonego rusztowania w miejsce brakującej tkanki u pacjenta.

Strategia ta otwiera więc drogę do wytwarzania tkanek lub całych narządów, które w przyszłości będą mogły być wszczepione w miejsce tych brakujących lub usuniętych z powodu niewydolności czy procesu nowotworowego. Z punktu widzenia chirurgicznego będzie to zupełnie nowa opcja terapeutyczna. Obecnie stosowane metody leczenia obejmują rekonstrukcję ubytku tkankami własnymi (np. autogeny przeszczep skóry), sztucznymi materiałami (np. proteza stawu biodrowego) lub transplantację całych narządów w układzie allogenicznym (np. przeszczep wątroby). Każda z tych metod posiada wady, do których należą odpowiednio: dolegliwości ze strony miejsca dawczego i brak wystarczającej ilości tkanki potrzebnej do rekonstrukcji dużych ubytków, odsłonięcie protez i reakcje zapalne typu wokół ciała obcego, powikłania związane z leczeniem immunosupresyjnym i mała liczba dawców przeszczepów. Produkt inżynierii tkankowej jest pozbawiony tych wad, przez co inżynieria tkankowa staje się nieuchronnie alternatywą dla chirurgii

rekonstrukcyjnej i transplantacyjnej i zaczyna być nazywana chirurgią regeneracyjną. Zmianą tym jest przykładem jest powstanie Międzynarodowego Towarzystwa Chirurgii Plastycznej i Regeneracyjnej (ISPRES), które w 2012 roku powstało w Rzymie na bazie Międzynarodowego Towarzystwa Chirurgii Plastycznej i Rekonstrukcyjnej. Intensywny rozwój tej dziedziny w ciągu ostatnich kilku lat wymusił zmianę dotychczasowej definicji inżynierii tkankowej: „Inżynieria tkankowa to szybko rozwijająca się dziedzina nauki, której celem jest wytworzenie, naprawa i/lub zamiana tkanek i narządów poprzez zastosowanie w różnych kombinacjach komórek, biomateriałów i/lub biologicznie aktywnych cząstek” [44-9]. Zawężony został także obszar jej zainteresowań, który ogranicza się wyłącznie do tego, co związane jest ze stosowaniem rusztowań. Pozostałe „dawne” strategie inżynierii tkankowej, które wykorzystują działanie komórek lub czynników wzrostu bez łączenia ich z rusztowaniami nazywane są obecnie terapią komórkową. Zarówno inżynieria tkankowa w nowym znaczeniu jak i terapia komórkowa wchodzi w skład nowej dziedziny medycyny – medycyny regeneracyjnej. Choć w ostatnim czasie za sprawą silnego lobby jest ona kojarzona głównie z medycyną estetyczną i zabiegami poprawiającymi jakość skóry i niwelującymi objawy starzenia (terapia komórkowa) to należy zaznaczyć, że medycyna regeneracyjna jest obecna praktycznie w każdej dziedzinie medycyny. Zarówno terapia komórkowa jak i inżynieria tkankowa mają coraz szersze zastosowanie w kardiologii, chirurgii, ortopedii, urologii, neurologii czy dermatologii. Naukowcy na całym świecie intensywnie pracują nad opracowaniem metod regeneracji i wytwarzania tkanek takich jak skóra [45], mięsień sercowy [46], nabłonek pęcherza moczowego [47], nerwy [48], chrząstka [49] czy kość [50]. Nie można jeszcze mówić o pełnym sukcesie, ponieważ część z wytwarzanych tkanek nie jest obecnie w pełni wartościowa. Ówczesne badania koncentrują się głównie na konstrukcji odpowiednich, „przyjaznych” dla komórek rusztowań i efektywnej hodowli i różnicowaniu zasiedlanych nimi komórek. Ich wyniki z każdym dniem przybliżają nas do wytworzenia takich tkanek, które pod względem strukturalnym i funkcjonalnym będą jak najwierniej naśladowały tkanki ludzkie.

4.3.1.3. Miejsce badań przedstawionych w cyklu publikacji we współczesnej inżynierii tkankowej.

Pomimo znacznego postępu w inżynierii tkankowej w dalszym ciągu jednym z ograniczeń i jednocześnie jednym z większych wyzwań pozostaje odpowiednie unaczynienie wytworzonych produktów inżynierii tkankowej. Bez odpowiednio rozwiniętego unaczynienia nie jest możliwe wytwarzanie dużych fragmentów tkanek lub narządów, ponieważ zasiedlone komórki nie przeżyją nawet kilku dni a rusztowanie ulegnie szybszej degradacji i zakażeniu. Z tego powodu jednym z kierunków moich zainteresowań było opracowanie nowej koncepcji unaczyniania produktów inżynierii tkankowej, która łączy prefabrykację chirurgiczną rusztowania naczyniem osiowym umieszczanym wewnątrz rusztowania z metodami inżynierii tkankowej takimi jak zastosowanie trójwymiarowego, przyjaznego dla naczyniotworzenia rusztowania a następnie zasiedlenie go komórkami ASCs o właściwościach angiogennych (**publikacja 1**). Zagadnienie to mogłem realizować w ramach projektu Bio-implant - „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” (POIG.01.01.02-00-022/09) (**punkt 6.1./1**) finansowanego przez Unię Europejską. W trakcie pracy nad tym zagadnieniem konieczna była także optymalizacja metod pozyskiwania ASCs i zasiedlania nimi rusztowań polimerowych (**publikacja 3**). Dzięki wynikom tych prac udało się określić najlepszą lokalizację tkanki tłuszczowej dla pozyskiwania ASCs, opracować metodę chirurgiczną jej pobierania, scharakteryzować i porównać różne modele zwierzęce pod względem dostępności i jakości komórek ASCs w zależności od lokalizacji tkanki tłuszczowej i wieku a także przedstawić metodę optymalnego zasiedlania komórkami ASCs rusztowań polimerowych (**publikacje**

3,4,5). Uzyskane wyniki prac pozwolą naukowcom zajmującym się wykorzystaniem komórek ASCs w różnych modelach badawczych na lepsze zaplanowanie i przeprowadzenie swoich badań.

Kolejnym wkładem w rozwój badań nad rusztowaniami polimerowymi zasiedlanymi komórkami ASCs było opracowanie nowej metody precyzyjnej analizy histopatologicznej wytworzonych rusztowań, która pozwala na zachowanie ich wewnętrznej struktury przestrzennej (**publikacja 2**). Dotychczas stosowane metody histopatologiczne uszkadzały strukturę rusztowania, która ulegała „puchnięciu” przez co uciskała/miażdżyła przerastające rusztowanie tkanki miękkie uniemożliwiając ich precyzyjną i pełną analizę. Opracowana metoda wyeliminowała ten problem i pozwoliła na ocenę nawet najdrobniejszych struktur tkankowych leżących w obrębie rusztowania, ocenę interakcji między tkankami a rusztowaniem i w końcu ocenę całego przekroju rusztowania co pozwala na dokładną analizę różnych struktur tkankowych np. naczyń na pełnym przekroju poprzecznym. Opracowana metoda daje więc naukowcom zajmującym się badaniami nad rusztowaniami tkankowymi nowe narzędzie do precyzyjnej analizy swoich wyników. Chociaż metoda jest zwalidowana dla rusztowań wykonanych z PCL, PCL/ β TCP i PCL/PLGA/ β TCP to jej podstawowe założenia mogą być wykorzystane do opracowywania protokołów histopatologicznych dla rusztowań wykonanych z innych materiałów.

Zachęcające wyniki i doświadczenie jakie wyniosłem z realizowanego projektu skłoniły mnie do zajęcia się kolejnym kierunkiem badań nad rusztowaniami polimerowymi zasiedlanymi komórkami ASCs. Analizując potrzeby chirurgii plastycznej w kontekście możliwości inżynierii tkankowej zainicjowałem prace nad nowym projektem, którego celem było opracowanie przewodnika nerwu (conduit) wykorzystywanego w chirurgii plastycznej do rekonstrukcji nerwów (**publikacja 6**). Jako współautor tego projektu realizowałem prace nad nim w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki („Wielofunkcyjne kompozytowe biomateriały nanowłókniste dla inżynierii obwodowej tkanki nerwowej” (2013/11/B/ST8/03401) (**punkt 6.1./2**). Wytworzone metodą elektroprzędzenia tubularne rusztowanie (przewodnik) zostało zaprojektowane w taki sposób i z takiego materiału aby możliwe było jego zasiedlenie komórkami ASCs zaraz po zespoleniu go z kikutami uszkodzonego nerwu. Wyniki przeprowadzonych na modelu szczurzym badań są zachęcające i pozwalają stwierdzić, że opracowana przez nas koncepcja przewodnika nerwu może stać się alternatywą dla stosowanej rutynowo rekonstrukcji nerwów z użyciem autoprzeszczepu nerwu. Dodatkowo wbudowanie do struktury przewodnika elektroprzewodzącego materiału (polianiliny) pozwalającego na przepływ ładunków elektrycznych doprowadziło do powstania kolejnych interesujących badań – tym razem oceniających wpływ elektrostymulacji na różnicowanie się komórek ASCs i wspomaganie procesu neuroregeneracji w obrębie opracowanego przewodnika nerwu (**publikacja 7**).

4.3.2. Cel badań przedstawionych w cyklu publikacji

Głównym celem naukowym wymienionego powyżej cyklu publikacji (**punkt 4.2.**) była ocena zastosowania tłuszczowych komórek macierzystych (ASCs) i rusztowań polimerowych wytworzonych drogą inżynierii tkankowej w wytwarzaniu tkanek dla potrzeb chirurgii rekonstrukcyjnej. Prezentowany cykl badań przedklinicznych na modelu zwierzęcym miał na celu:

1. Opracowanie nowej metody skutecznego unaczyniania produktów inżynierii tkankowej (**publikacja 1**).
2. Optymalizację metod pozyskiwania ASCs i zasiedlania nimi rusztowań polimerowych (**publikacje 3,4,5,**).

3. Optymalizację metod precyzyjnej analizy histopatologicznej wytworzonych rusztowań polimerowych (**publikacja 2**).
4. Opracowanie tubularnego, bioaktywnego i elektroprzewodzącego rusztowania polimerowego (przewodnika nerwu) zasiedlanego komórkami ASCs (**publikacja 6**).
5. Ocenę wpływu stymulacji elektrycznej na komórki ASCs, które zostały zasiedlone na rusztowaniach polimerowych (przewodnik nerwu) (**publikacja 7**).

4.3.3. Szczegółowe omówienie artykułów cyklu publikacji

1. **Dębski T, Kurzyk A, Ostrowska B, Wysocki J, Jaroszewicz J, Świąszkowski W, Pojda Z.** Scaffold vascularization method using an adipose-derived stem cell (ASC)-seeded scaffold prefabricated with a flow-through pedicle. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jan 23;11(1):34. doi: 10.1186/s13287-019-1535-z. PMID: 31973733; PMCID: PMC6979360. (**publikacja 1**)

Szybki i skuteczny rozwój unaczynienia jest jednym z głównych problemów wymagających rozwiązania aby na szerszą skalę stosować produkty inżynierii tkankowej w praktyce. W nurt tych poszukiwań włącza się niniejsza praca, której celem była ocena nowej metody szybkiego unaczynienia rusztowań polimerowych. Założeniem nowej metody było połączenie dwóch koncepcji pobudzania unaczynienia: znanej z chirurgii rekonstrukcyjnej prefabrykacji płatów oraz udowodnionych w inżynierii tkankowej angiogennych właściwości tłuszczowych komórek macierzystych (ASCs). Prefabrykacja chirurgiczna polega na wszczepieniu szypuły naczyniowej do tkanek o słabszym, przypadkowym ukrwieniu. Dzięki temu poza rozwojem unaczynienia uzyskujemy osiowe, czyli oparte na jednej szypule naczyniowej ukrwienie danego płata. Umożliwia to nie tylko wykorzystanie go jako płata miejscowego ale pozwala także na przeniesienie go przy pomocy technik mikrochirurgicznych w bardziej odległe miejsca. Rozszerzenie tego zastosowania na obszar inżynierii tkankowej polegałoby więc na prefabrykacji rusztowania naczyniem osiowym w danym miejscu, odległym od rekonstruowanego ubytku. W trakcie kilkutygodniowej prefabrykacji możliwa byłaby kontrola rozwoju odpowiedniego unaczynienia w obrębie rusztowania, kontrola ewentualnych infekcji i reakcji odrzucania a także wzmacnianie procesu rozwoju naczyń poprzez komórki lub czynniki wzrostu i różnicowania a w późniejszym etapie nawet zasiedlanie rusztowania odpowiednimi komórkami macierzystymi, które wytworzyłyby docelową tkankę.

W kolejnym etapie przygotowane w ten sposób rusztowanie posiadające pewne i niezależne unaczynienie oparte na szypule naczyniowej byłoby przenoszone w miejsce rekonstruowanego ubytku jako płat uszypułowany lub wolny z zespoleniem mikrochirurgicznym z naczyniami w miejscu ubytku. Uniezależnienie unaczynienia prefabrykowanego rusztowania od otoczenia wyeliminowałoby częste problemy takie jak infekcje, martwice tkanek czy ekstruzje implantu, które są konsekwencją uszkodzonego w wyniku urazu lub naświetlania systemu naczyniowego w miejscu rekonstruowanego ubytku. Poza sprawdzoną i powszechnie stosowaną metodą prefabrykacji badana koncepcja zakładała jednoczesowe zasiedlenie rusztowania komórkami macierzystymi ASCs o udowodnionych właściwościach proangiogennych. Ich dodatkowym atutem jest możliwość różnicowania się w komórki pochodzenia mezenchymalnego takie jak np. osteocyty czy chondrocyty, co otwiera nowe możliwości zastosowań tych komórek jak i całej metody prefabrykacji w rekonstrukcji ubytków kości czy chrząstki.

Celem pracy było porównanie nowej metody prefabrykacji rusztowań zasiedlanych komórkami ASCs z rusztowaniami niezasiedlonymi i nieprefabrykowanymi. Badania przeprowadzono na modelu szczurzym a jako naczynia osiowe służące do prefabrykacji rusztowania wybrano tętnicę i żyłę nabrzuszną dolną. Spośród wariantów układu szypuły naczyniowej wybrano najmniej traumatyczną w

wykonaniu szypułę typu *flow-through*. Pozostałe warianty układu szypuły tj. podwiązanie szypuły lub pętla tętniczo żylna utworzona poprzez mikrochirurgiczne zespolenie tętnicy z żyłą zostały wyeliminowane ze względu na możliwość wykrzepiania wewnątrz zespolenia lub na końcu kikuta podwiązanej szypuły co prowadziłoby do umieszczenia wewnątrz rusztowania niewydolnych naczyń. Rusztowanie wydrukowane zostało metodą przyrostowego kształtowania uplastycznionym polimerem (fused deposition modeling) z poli-ε-caprolaktonu (PCL) (**Ryc.2a**), który jest jednym z bardziej obiecujących materiałów w inżynierii tkankowej.

Po wyizolowaniu naczyń z cięcia w okolicy pachwinowej bez ich przecinania nakładano na nie (podobnie jak nakłada się opaski termoizolacyjne do ocieplania rur) specjalnie wydrukowane w technologii druku 3d cylindryczne rusztowanie zawierające przestrzeń na naczynia wewnątrz. Zwierzęta podzielono na 3 grupy zawierające po 6 szczurów rasy WAG chowu wsobnego. W pierwszej grupie nie zasiedlano rusztowań, w drugiej grupie zasiedlano je komórkami ASCs, w trzeciej grupie zasiedlano je komórkami ASCs, które indukowano w kierunku osteogenezy. Każdy szczur w danej grupie miał wszczepione po dwa rusztowania – w lewej okolicy pachwinowej umieszczano rusztowanie prefabrykowane nową metodą (z naczyniami wewnątrz) natomiast w prawej umieszczano implant w okolicy naczynia (naczynia przebiegały obok rusztowania). Gęstość naczyń oraz układ sieci naczyniowej był analizowany po 2 miesiącach na podstawie badań histopatologicznych (barwienie HE, immunohistochemia CD31 i SATB2) i mikrotomografii komputerowej.

Wyniki badań wykazały synergistyczne działanie nowej metody prefabrykacji z zasiedlaniem ich komórkami ASCs. Stwierdzono bowiem ponad 10-krotnie większą gęstość naczyń w grupie z nową metodą prefabrykacji i zasiedlaniem komórkami ASCs rusztowań w porównaniu z gęstością naczyń w obrębie rusztowań nieprefabrykowanych i niezasiedlanych komórkami ASCs. Również w grupie rusztowań prefabrykowanych nową metodą ale zasiedlanych komórkami ASCs indukowanymi w kierunku osteogenezy stwierdzono znamienne statystycznie prawie 5 -krotnie większą gęstość naczyń w porównaniu z rusztowaniami nieprefabrykowanymi i niezasiedlanymi. Powstała w obrębie rusztowań sieć naczyniowa była w pełni wydajna i funkcjonalna we wszystkich badanych grupach co potwierdzono w badaniach μ CT z kontrastem. Co ciekawe w grupie zasiedlanej ASCs indukowanymi w kierunku osteogenezy stwierdzono drobne ogniska kostnienia ale nie stwierdzono wytworzenia pełnowartościowej kości w obrębie rusztowań. Mogło być to spowodowane brakiem odpowiedniej impulsacji czynnikami wzrostu i różnicowania dostarczanych z zewnątrz lub miejscowo (brak wszczepienia rusztowań w sąsiedztwo ubytku kości) lub budową rusztowania i brakiem odpowiedniej ilości wapnia i innych substancji naśladujących natywne środowisko (*milleu*) tkanki kostnej. Chociaż celem pracy nie było wytworzenie kości tylko ocena rozwoju unaczynienia obiecujące jest to, że w tej grupie rusztowań powstały drobne ogniska kostnienia co świadczy o tym, że poza wytworzeniem naczyń doszło także do zainicjowania procesów osteogenezy. Otrzymane wyniki upoważniają do postawienia wniosku, że opracowana przez mnie nowa metoda unaczynienia zakładająca nowy model prefabrykacji typu *flow-through* i zasiedlanie rusztowań komórkami macierzystymi ASCs w sposób znaczny poprawia rozwój unaczynienia w obrębie rusztowań i z powodzeniem może mieć zastosowanie w inżynierii tkankowej jak i zastosowaniach klinicznych.

Powyższa praca była wykonywana w ramach dużego projektu Bio-implant - „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych”(POIG.01.01.02-00-022/09) (**punkt 6.1./1**) finansowanego ze środków Unii Europejskiej i zrzeszającego naukowców z różnych uczelni takich jak Narodowy Instytut Onkologii Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Politechnika Wrocławska. W ramach tego projektu kierowałem zespołem zajmującym się badaniami na małych zwierzętach. Dzięki multidyscyplinarnej współpracy zespołów zrzeszonych w ramach tego projektu udało mi się zainicjować kilka mniejszych projektów naukowych, które były odpowiedzią na liczne

pytania i problemy pojawiające się w trakcie realizacji opisanego powyżej projektu. Dotyczyły one problemów z właściwą preparatyką histopatologiczną pozwalającą na zachowanie beleczkowej struktury rusztowania i ocenę jego całego przekroju. Odpowiadały także na pytania z której lokalizacji tkanki tłuszczowej u szczura uzyskujemy najlepsze do zasiedlania komórki macierzyste ASCs, czy na właściwości komórek ASCs wpływa wiek szczura i który model zwierzęcy (mysz, szczur czy królik) jest najlepszy do prowadzenia badań nad komórkami ASCs. Poniżej zostaną szczegółowo opisane wyniki tych prac.

2. **Dębski T, Wysocki J, Siennicka K, Jaroszewicz J, Szlęzak K, Świąszkowski W, Pojda Z. Modified Histopathological Protocol for Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Preserving Their Trabecular, Honeycomb-like Structure. Materials (Basel). 2022 Feb 25;15(5):1732. doi: 10.3390/ma15051732. PMID: 35268968; PMCID: PMC8911251. (publikacja 2)**

W ramach tej pracy opracowany został nowy protokół histopatologiczny dla rusztowań wykonanych z poli-ε-kaprolaktonu, który zachowuje ich wewnętrzną architekturę przypominającą strukturę plastra miodu. Praca była odpowiedzią na problemy powstałe w trakcie standardowej obróbki histopatologicznej badanych rusztowań. Otóż uzyskane w wyniku standardowej preparatyki skrawki nie nadawały się do całościowej oceny ponieważ elementy rusztowania ulegały topnieniu i dodatkowo zwiększały swoją objętość przez co miażdżyły tkanki obecne między beleczkami rusztowania. Poza jednostkowymi fragmentami rusztowania niemożliwa była więc ocena utkania komórkowego wewnątrz porów (beleczek) rusztowania jak również całościowa ocena struktur komórkowych wewnątrz całego przekroju rusztowania co było kluczowe dla obliczenia gęstości powstających naczyń. Analizując potencjalne przyczyny tego problemu w pierwszej kolejności wyeliminowano standardową parafinę o temperaturze topnienia 58°C, której temperatura topnienia jest zbliżona do temperatury topnienia poli-ε-kaprolaktonu wynoszącej 58-60°C. Zastosowanie parafiny o niższej temperaturze topnienia wynoszącej 49°C nie poprawiło jednak jakości preparatów. Choć fragmenty rusztowania nie były już stopione to dalej obecne było „puchnięcie” beleczek rusztowania i miażdżenie przez nie leżących wewnątrz tkanek. Dalsza analiza tego problemu doprowadziła do wyeliminowania z procesu obróbki histopatologicznej ksylenu i zastąpienia go d-limonenem (Histoclear) w procesie płukania szeregiem alkoholi, deparafinizacji i rehydracji. Dzięki zastosowaniu tego rozwiązania nie obserwowano już zmian w strukturze rusztowania ale tylko do momentu nakrycia preparatu szkiełkiem nakrywkowym. Okazało się, że rutynowo stosowane szkiełka zawierają w składzie swojego kleju również ksylen. Zastąpienie tego kleju balsamem kanadyjskim rozpuszczalnym w d-limonenie pozwoliło na wyeliminowanie tego problemu i uzyskanie niezmiennych elementów rusztowania w preparacie histopatologicznym. Dodatkową modyfikacją tego procesu było wprowadzenie silanizowanych szkiełek podstawowych o większej adhezji niż standardowo stosowane co ułatwiło przenoszenie uzyskanych skrawków na szkiełko, które ze względu na małą grubość i brak dobrego przylegania do szkiełka ulegały często przemieszczeniu, zawinięciu czy rozerwaniu. Dopracowana w ten sposób metoda pozwalała na pełną ocenę przekroju rusztowania, ocenę rozmieszczenia tkanek wewnątrz porów rusztowania jak i ocenę interakcji między elementami rusztowania a przylegającymi komórkami. Aby ocenić jej skuteczność i dokonać jej walidacji zaprojektowano badanie szerzej opisane w niniejszym artykule. Badanie przeprowadzono na 16 szczurach rasy WAG chowu wsobnego implantując podskórną w okolicy pachwinowej 2 cylindryczne rusztowania wykonane z poli-ε-kaprolaktonu. Rusztowania wykonano metodą druku 3D wykorzystując technikę przyrostowego kształtowania uplastycznionym polimerem (fused deposition) (**Ryc. 2a**) a każda z zaprojektowanych pięciu kolejnych warstw rusztowania posiadała charakterystyczną beleczkową architekturę przypominającą swoim wyglądem plastry miodu. Po 2 miesiącach implantacji wykonano μ CT pobranych rusztowań a

następnie rusztowania pochodzące z lewej okolicy pachwinowej poddano standardowej procedurze histopatologicznej opisywanej w literaturze a rusztowania pochodzące z prawej okolicy pachwinowej poddano nowej, samodzielnie opracowanej procedurze. Aby móc porównać wyniki w sposób obiektywny i wystandaryzowany wprowadzono parametr Procentowej Zawartości Tkanek Miękkich (PZTM) obliczanej na przekroju poprzecznym rusztowań. Parametr ten obliczono nie tylko na skrawkach histopatologicznych rusztowań poddanych standardowej jak i opracowanej preparatyce histopatologicznej, ale także na obrazach radiologicznych (scan μ CT) korespondujących przekrojów poprzecznych rusztowań wykonanych przed obróbką histopatologiczną.

Analiza otrzymanych w ten sposób wyników dostarczyła informacji, że opracowany protokół pozwala na ocenę prawie 10 - krotnie większej ilości tkanek miękkich na przekroju poprzecznym rusztowania w porównaniu ze standardową procedurą histopatologiczną. Dodatkowo w porównaniu z korespondującymi przekrojami poprzecznymi otrzymanymi w μ CT, obliczony parametr PZTM był tylko o 1,5 % mniejszy dla rusztowań uzyskanych w wyniku opracowanego protokołu histopatologicznego i aż o 41% mniejszy dla rusztowań poddanych standardowej procedurze histopatologicznej. Prowadzi to do wniosku, że dokładność uzyskanych opracowaną metodą obrazów histopatologicznych jest zbliżona do obrazów otrzymanych przy pomocy badania μ CT. Otrzymane wyniki potwierdziły również, że opracowany protokół histopatologiczny jest powtarzalny, dokładny i pozwala na pełną analizę jakościową i ilościową całego przekroju poprzecznego rusztowania z zachowaniem jego wewnętrznej, przypominającej plastry miodu struktury. Pomimo tego, że opracowana metoda była zbadana tylko dla rusztowań wykonanych z PCL to do tej pory została ona z sukcesem zaadoptowana również dla rusztowań kompozytowych takich PCL/ β TCP czy PCL/PLGA/ β TCP i to zarówno w klasycznym barwieniu HE jak i w barwieniach histochemicznych (von Kossa, Masson Trichrome,) czy immunohistochemicznych (CD31, Factor VIII-related antigen, SATB2). Reasumując, opracowana w wyniku tego projektu nowa metoda preparatyki histopatologicznej ma szansę stać się nowym narzędziem pozwalającym na pełniejszą, bardziej wystandaryzowaną i porównywalną ocenę wyników badań z zakresu inżynierii tkankowej.

3. Kurzyk A, Dębski T, Świąszkowski W, Pojda Z. Comparison of adipose stem cells sources from various locations of rat body for their application for seeding on polymer scaffolds. J Biomater Sci Polym Ed. 2019 Apr;30(5):376-397. doi: 10.1080/09205063.2019.1570433. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30686126. (publikacja 3)

Pomysł na powstanie tej pracy powstał również w trakcie realizacji projektu związanego z nową metodą prefabrykacji (publikacja 1). Otóż zasiedlanie rusztowań polimerowych komórkami macierzystymi ASCs wymagało ich wyizolowania z tkanki tłuszczowej. O ile w przypadku komórek ASCs ludzkich pobranie tkanki tłuszczowej może nastąpić drogą małoinwazyjnego zabiegu jakim jest liposukcja to u gryzoni, których wykorzystanie zakładał ten projekt zastosowanie takiego zabiegu nie było możliwe ze względu na małą ilość podskórnej tkanki tłuszczowej i jej specyficzne rozmieszczenie. Opisywane wówczas w literaturze przypadki zakładały najczęściej pobranie tkanki tłuszczowej podskórnej z okolicy pachwinowej szczura jednak ze względu na założenie projektu jakim było podskórne wszczepienie prefabrykowanego rusztowania właśnie w tę okolicę zmuszeni byliśmy poszukać alternatywnego źródła tkanki tłuszczowej. Analizując literaturę dotyczącą rozmieszczenia tkanki tłuszczowej u gryzoni trafiłem na ciekawą pracę S. Cinti pt. „The Adipose Organ” [51] opisująca różne lokalizacje depozytów tkanki tłuszczowej u myszy tj. depozyt karkowy, pachwinowy, okołonerkowy i gonadalny. Opisywane lokalizacje tkanki tłuszczowej były ze sobą czynnościowo połączone i stanowiły swoisty „organ tłuszczowy” reagujący na zmiany temperatury, warunki odżywiania, stres czy wiek. Tłuszcz w lokalizacji karkowej składał się dodatkowo z dwóch morfologicznie różnych rodzajów komórek tłuszczowych: tkanki tłuszczowej brunatnej bogatej w

struktury naczyniowe i nerwowe oraz tkanki tłuszczowej białej. Jak dowodził autor tkanka tłuszczowa brunatna brała czynny udział w procesie termogenezy i mogła zamieniać się w tkankę tłuszczową białą w warunkach niskich temperatur. Ponieważ praca została opublikowana w 2005 roku, kiedy jeszcze wiedza na temat ASCs i ich potencjalnego wykorzystania w badaniach z zakresu inżynierii tkankowej była niewielka nie ujęto w niej informacji o właściwościach poszczególnych obszarów tkanki tłuszczowej w kontekście ASCs. Poza tym, jak wcześniej wspomniano, praca opisywała „organ tłuszczowy” u myszy, która w porównaniu ze szczurem jest znacznie rzadziej stosowana w modelach badawczych z zakresu inżynierii tkankowej. Dlatego celem pracy była charakterystyka poszczególnych lokalizacji tkanki tłuszczowej wchodzących w skład organu tłuszczowego szczura, ocena tych lokalizacji pod kątem pozyskiwania z nich komórek ASCs oraz zbadanie właściwości proliferacyjnych i ewentualnych zastosowań tych komórek w zależności od lokalizacji z której pochodzą. Drugim elementem pracy była optymalizacja zasiedlania tymi komórkami rusztowań polimerowych tj. określenie ich optymalnej ilości, odpowiedniego medium różnicującego je w kierunku kościotworzenia oraz określenie optymalnego materiału z którego powinno być zbudowane rusztowanie polimerowe. Różnicowanie w kierunku kościotworzenia zostało wybrane w tym przypadku głównie ze względu na opisywane w modelach badawczych na szczurach zastosowanie rusztowań polimerowych jako rusztowania dla odbudowy ubytków kostnych w obrębie kości udowej lub sklepienia czaszki u tych zwierząt. Inżynieria tkankowa kości bowiem była i nadal jest wiodącym tematem poszukiwań nowych opcji terapeutycznych dla leczenia ubytków kostnych w chirurgii rekonstrukcyjnej, ortopedii czy chirurgii szczękowo-twarzowej.

Badanie przeprowadzono na 12 szczurach rasy WAG/W chowu wsobnego płci męskiej. W trakcie badania zaproponowano dostępy chirurgiczne dla pobierania tkanki tłuszczowej z poszczególnych okolic *post mortem* oraz opracowano technikę aseptycznego pobierania tkanki tłuszczowej pod laminarem. Aseptyka ta jest o tyle istotna, że nawet najmniejsze skażenie pobieranego tłuszczu choćby małą ilością bakterii może spowodować skażenie całego materiału, który po odpowiedniej procedurze w trakcie izolacji ASCs jest pasażowany na podłożu hodowlanym sprzyjającym proliferacji bakterii. Po uzyskaniu z poszczególnych okolic tkanki tłuszczowej wyizolowano z niej komórki ASCs zgodnie z protokołem opracowanym w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej. W związku z makroskopowo odmiennym wyglądem tłuszczu karkowego brunatnego i jego prawdopodobnie odmienną morfologią opisywaną przez Cinti oddzielono go na etapie pobierania od pozostałego tłuszczu karkowego białego i analizowano w dalszym etapie doświadczenia oddzielnie. Wyizolowane w trakcie doświadczenia z różnych lokalizacji komórki ASCs poddano następnie licznym testom takim jak cytometria przepływowa określająca ich charakterystyczne markery powierzchniowe (CD11b, CD45CD29, CD90), hodowle w różnych mediach różnicujących określające zdolności badanych komórek do różnicowania się w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów, określono także kinetykę wzrostu komórek, ich czas podwojenia (doubling time), zdolności do tworzenia kolonii (colony forming unit). W drugiej części badania optymalizowano proces różnicowania się pozyskanych z tłuszczu karkowego komórek ASCs w kierunku osteogenezy oceniając 4 różne warianty medium różnicującego: bazowe, bazowe z dodatkiem deksometazonu, z dodatkiem BMP i FGF2 oraz z dodatkiem BMP2 i deksometazonu. Skuteczność każdego z wariantów oceniano w badaniu histopatologicznym (barwienie czerwienią alizarynową) oraz jakościowo na podstawie analizy poziomu fosfatazy alkalicznej (ALP), która jest markerem aktywności osteoblastów. Zdolności do różnicowania się w kierunku osteoblastów pozyskanych komórek ASCs sprawdzono także po ich zasiedleniu na porowatych, cylindrycznych rusztowaniach o wymiarach 4x6 mm zbudowanych z dwóch różnych materiałów: poli-ε-kaprolaktonu (PCL) oraz poli-ε-kaprolaktonu (PCL) z dodatkiem 5% trójfosforanu wapnia (TCP). W trakcie tego testu zasiedlano rusztowania pozyskanymi komórkami ASCs nieodróżnionymi stosując 3 różne warianty ilości komórek a następnie hodowano je w standardowym i różnicującym w

kierunku osteogenezy medium przez 14 i 21 dni. Wyniki oceniano badając aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) oraz przy pomocy testu MTS, oceniającego ilość żywych komórek (aktywność metaboliczną) przypadającą na każde rusztowanie w 3, 7 i 21 dniu.

Wyniki badań potwierdziły, że zaproponowane dostępy chirurgiczne umożliwiają skuteczne wyizolowanie komórek ASCs z każdej badanej lokalizacji, uzyskane z każdej lokalizacji komórki spełniają kryteria komórek macierzystych (obecność charakterystycznych markerów powierzchniowych), różnicują się w adipocyty, chondrocyty i osteocyty a ich żywotność nie różni się w zależności od lokalizacji. Największą ilość komórek macierzystych ASCs uzyskano z tłuszczu pachwinowego a największa ich gęstość tj. ilość przypadająca na masę tkanki tłuszczowej obecna była w tłuszczu karkowym brunatnym a następnie odpowiednio w tłuszczu karkowym białym i gonadalnym. Również w tych lokalizacjach stwierdzono najlepsze parametry kinetyki wzrostu komórek, czasu podwojenia czy zdolności do tworzenia kolonii. Wyniki tych badań sugerują, że równie dobrym źródłem komórek ASCs jest okolica karkowa, która co prawda dostarcza mniejszą całkowitą ilość komórek ASCs w porównaniu z okolicą pachwinową ale komórki te są lepsze jakościowo. Opracowany w trakcie badania dostęp chirurgiczny do lokalizacji karkowej tkanki tłuszczowej może być z powodzeniem stosowany w modelu przyżyciowym i stanowi alternatywę dla dostępu pachwinowego obarczonego pewnymi niedogodnościami takimi jak możliwość ingerencji zwierzęcia w ranę i związanych z tym problemów z gojeniem, rozejściem się rany a nawet autokanibalizmem. Dodatkowo w niektórych modelach badawczych takich jak badania nad regeneracją kości, gdzie ubytek kości udowej szczura uzupełnia się różnymi wariantami rusztowań, model ten eliminuje potrzebę powtórnej ingerencji w okolicę pachwinową, która po wcześniejszym pobraniu tkanki tłuszczowej może być zbliznowaciała i gorzej ukrwiona przez co może fałszować wyniki badania. W opisanym przez nas modelu czas od przyżyciowego pobrania tłuszczu karkowego do wyizolowania odpowiedniej do zasiedlenia rusztowań ilości komórek ASCs wyniósł od 14 do 30 dni co pomimo mniejszej ilości tkanki tłuszczowej uzyskanej z tej okolicy jest czasem porównywalnym z czasem do zasiedlenia rusztowań komórkami ASCs uzyskanymi z okolicy pachwinowej, która posiada większą ilość tkanki tłuszczowej i co za tym idzie większą ilość komórek ASCs. Potwierdza to większe zdolności proliferacyjne komórek ASCs pobranych z tej okolicy i czyni opisane źródło tkanki tłuszczowej szczura obiecującą alternatywa dla innych lokalizacji.

Druga część badania w której optymalizowano zasiedlanie rusztowań komórkami ASCs pobranymi z tkanki tłuszczowej karkowej dostarczyła informacji, że najlepszym medium różnicującym te komórki w kierunku osteogenezy jest wariant medium różnicującego z dodatkiem BMP i FGF2. Aktywność fosfatazy alkalicznej w tym wariacie medium była większa niż w wariacie z podłożem różnicującym bez modyfikacji oraz prawie dwukrotnie większa w porównaniu z kontrolą, którą stanowiło standardowe podłoże hodowlane. Najbardziej sprzyjającym osteogenezie materiałem z którego wykonane jest rusztowanie jest kompozyt PCL z 5 % TCP. Porównanie tego materiału z materiałem zbudowanym z samego PCL wykazało znacznie większą aktywność fosfatazy alkalicznej, szczególnie w 14 dniu obserwacji. Optymalna ilość komórek, którymi powinny być zasiedlane rusztowanie wynosi $1,2 \times 10^5$ komórek na porowate rusztowanie o kształcie cylindrycznym (6 mm średnicy, 4 mm wysokości). Największa aktywność mitochondrialna tych komórek widoczna była w 21 dniu hodowli a jej kinetyka i wartości różniły się w zależności od wariantu rusztowania (PCL vs. PCL +TCP).

Reasumując, niniejsza praca przedstawia opracowane dostępy chirurgiczne do różnych lokalizacji tkanki tłuszczowej u szczura oraz ich charakterystykę pod kątem zastosowań w inżynierii tkankowej (izolacja ASCs). Dodatkowo został w niej przedstawiony nowy model przyżyciowego pobrania tkanki tłuszczowej z lokalizacji karkowej, który został oceniony nie tylko pod kątem możliwości pozyskania z niego komórek ASCs ale także zoptymalizowana została procedura indukcji tych komórek w kierunku osteogenezy oraz zasiedlania nimi rusztowań polimerowych. Otrzymane wyniki będą pomocne w

planowaniu badań z wykorzystaniem komórek ASCs w modelu szczurzym a przedstawiony i przebadany model przyżyciowego pobrania tkanki tłuszczowej z okolicy karkowej może zostać z powodzeniem stosowany w badaniach z zakresu inżynierii tkankowej, szczególnie dotyczących regeneracji tkanki kostnej z użyciem polimerowych rusztowań.

4. Siennicka K, Zołocińska A, Dębski T, Pojda Z. Comparison of the Donor Age-Dependent and *In Vitro* Culture-Dependent Mesenchymal Stem Cell Aging in Rat Model. *Stem Cells Int.* 2021 May 14;2021:6665358. doi: 10.1155/2021/6665358. PMID: 34093710; PMCID: PMC8140846. (publikacja 4)

Kontynuacją badań nad właściwościami komórek ASCs, które pobierane były z różnych lokalizacji tkanki tłuszczowej (publikacja 3) była niniejsza praca, której celem była analiza jakości tych komórek w zależności od wieku szczura oraz od ilości pasaży tych komórek w hodowlach komórkowych *in vitro*. Różnice w potencjale do dzielenia się i różnicowania się tych komórek zaobserwowaliśmy już w trakcie przeprowadzania poprzedniego badania jednak badana grupa była zbyt mała do postawienia jednoznacznych wniosków. Dodatkowo dzięki możliwości włączenia do badania szczurów tej samej rasy chowu wsobnego w wieku znacznie przekraczającym wiek szczurów standardowo wykorzystywanych w modelach badawczych postanowiliśmy sprawdzić czy komórki ASCs wyizolowane z tkanki tłuszczowej tych szczurów również się „starzeją” tzn. czy mają podobne właściwości do komórek ASCs wyizolowanych od osobników młodych i w związku z tym mogą być również wykorzystywane w inżynierii tkankowej. W tym celu porównano ze sobą dwie grupy szczurów rasy Wistar płci męskiej chowu wsobnego w wieku 3 miesięcy i 2 lat, co odpowiada biologicznemu wiekowi człowieka wynoszącemu odpowiednio 25 i 80 lat. Jako marker starzenia się komórek ASCs badano aktywność beta-galaktozydazy a z parametrów oceniających ich jakość i potencjalne możliwości zastosowania w badaniach z zakresu inżynierii tkankowej oceniano morfologię komórek (markery powierzchniowe CD29, CD11b, CD90, CD45, CD34), potencjał proliferacyjny (czas podwojenia, tempo wzrostu, zdolność do tworzenia kolonii), aktywność metaboliczną (MTS test po 24h, 7 i 21 dniach), zdolności różnicowania się w kierunku adipocytów (barwienie czerwienią olejową, ekspresja genów CEBPA, ADIPOQ, PPAR γ), chondrocytów (barwienie Masson-Trichrome, ekspresja genów COMP, SOX9, ACAN) oraz osteocytów (barwienie czerwienią alizarynową, ekspresja genów ALPL, RUNX2, IBSP). Oceniano także zdolności tych komórek do indukowania angiogenezy (tubule formation assay, sprouting from 3D spheroids assay) oraz angiogeny efekt ich parakrynnego wydzielania (linia komórek Huvec). Podobne testy przeprowadzono porównując „starzenie się” komórek ASCs w warunkach *in vitro* wynikające z wielokrotnego pasażowania ich. W tym przypadku porównywano ze sobą komórki pochodzące z 3 i 30 pasaży komórkowego pochodzące zarówno od 3 miesięcznych jak i 2 letnich szczurów.

Wyniki badań nie wykazały żadnej różnicy w morfologii komórek ASCs i ekspresji charakterystycznych dla nich markerów powierzchniowych pomiędzy komórkami pochodzącymi od starej jak i młodej populacji szczurów jak i pochodzącymi z wczesnego i późnego etapu pasażowania. Podobnych różnic nie zaobserwowano po zbadaniu tempa wzrostu jak i czasu podwojenia tych komórek co stawia komórki pochodzące od „starych” dawców na równorzędnym poziomie z komórkami pochodzącymi od „młodych” dawców i umożliwia ich stosowanie w badaniach wykorzystujących komórki macierzyste. Wyniki testu MTS wykazały niezależną od wieku dawców znacznie większą aktywność metaboliczną komórek ASCs po 30 pasaży niż po 3-cim ale tylko w 7 dniu inkubacji. Podobną zależność wykazano w przypadku badania zdolności tworzenia kolonii. Wiedza o tym, że komórki wraz z ilością pasaży zwiększają swoją aktywność metaboliczną i zdolność do tworzenia kolonii może mieć istotne implikacje w planowaniu badań z wykorzystaniem tych komórek

jednak wyniki tych badań wymagają jeszcze weryfikacji. Badając zdolności do różnicowania się komórek ASCs hodowanych w odpowiednich mediach różnicujących je do adipo-, chondro- lub osteocytów stwierdzono większą ekspresję genów charakterystycznych dla adipogenezy u starych dawców i po dłuższym okresie pasażowania komórek. Podobną zależność stwierdzono dla chondrogenyzy. Ekspresja genów charakterystycznych dla osteogenezy nie różniła się w zależności od ilości pasażu komórkowych ale w przeciwieństwie do adipo- i chondrogenyzy była większa u osobników młodych. Jeśli chodzi o angiogenne właściwości tych komórek to stwierdzono większy ich potencjał w przypadku komórek pochodzących od młodych dawców i z 30-ego pasażu ale różnice statystyczne nie były znaczne. Wyniki tej części badań będą z pewnością przydatne w planowaniu modeli badawczych wykorzystujących potencjał do różnicowania się komórek ASCs w różne linie komórkowe i pozwolą na dobranie dawców jak i czasu pasażowania zgodnie z oczekiwanymi rezultatami. W końcu badając starzenie się tych komórek zarówno *in vivo*, czyli wraz z wiekiem dawców jak i *in vitro* czyli wraz z ilością pasażu, stwierdzono w obu tych przypadkach efekt starzenia się mierzony wzrostem poziomu beta-galaktozydazy jednak różnice te były znacznie mniejsze pomiędzy „młodymi” a „starymi” dawcami (starzenie się *in vivo*) niż pomiędzy 3 a 30 pasażem (starzenie się *in vitro*). Upoważnia to do stwierdzenia, że nadmiernie długie pasażowanie komórek znacznie szybciej powoduje ich starzenie się niż zaawansowany wiek biologiczny dawców. Dzięki zebranym w powyższej pracy wynikom wykazano, że komórki ASCs pochodzące od starszych osobników mają podobny potencjał proliferacyjny do komórek izolowanych od młodych osobników. Przedstawione różnice w ich zdolności do różnicowania się w zależności od wieku dawcy jak i od ilości przeprowadzonych pasażu komórkowych mogą okazać się przydatne w efektywnym planowaniu doświadczeń z wykorzystaniem komórek ASCs.

5. Zołocińska A, Siennicka K, **Dębski T**, Gut G, Mazur S, Gajewska M, Kaminski A, Pojda Z. Comparison of mouse, rat and rabbit models for adipose - Derived stem cells (ASC) research. *Curr Res Transl Med*. 2020 Nov;68(4):205-210. doi: 10.1016/j.retram.2020.07.001. Epub 2020 Aug 22. PMID: 32843322. **(publikacja 5)**

Eksplorując dalej kierunek badań pozwalających na charakterystykę i optymalizację procesów pozyskiwania komórek ASCs z tkanki tłuszczowej postanowiliśmy sprawdzić, który z modeli zwierzęcych będzie najbardziej użyteczny dla badań z zakresu inżynierii tkankowej. Wcześniejsze badania **(publikacja 2 i 3)** dostarczyły nam informacji dotyczących modelu szczurzego wykazując różnice w ilości ASCs w zależności od lokalizacji tkanki tłuszczowej z której są izolowane, przedstawiały nowy model autologicznego pobierania tkanki tłuszczowej z okolicy karkowej czy charakteryzowały właściwości komórek ASCs w zależności od wieku szczura. W niniejszej pracy, dzięki dostępności różnych gatunków zwierząt u których w ramach realizowanych projektów naukowych izolowaliśmy komórki ASCs postanowiliśmy sprawdzić różnice międzygatunkowe pod względem jakościowym i ilościowym komórek ASCs. W tym celu porównaliśmy ze sobą modele badawcze obejmujące model myszy, model szczurzy z podziałem na dwa osobne szczepy zwierząt LEW/W i WAG oraz model króliczy. Wszystkie badane gatunki zwierząt są szeroko wykorzystywane w badaniach naukowych i posiadają swoje zalety i wady. Model myszy jest modelem dobrze przebadanym (dostępność specyficznych przeciwciał i zestawów badań), tanim w utrzymaniu, pozwalającym na użycie dużej ilości zwierząt a dzięki możliwości genetycznej modyfikacji pozwala na tworzenie zwierząt chowu osobnego (identycznych genetycznie) lub imitować choroby ludzkie. Jego wadą jest mała masa zwierzęcia uniemożliwiająca przeprowadzenie w ramach doświadczeń skomplikowanych procedur chirurgicznych czy ortopedycznych. Z tego powodu model myszy stosowany jest obecnie głównie w badaniach nad lekami, gojeniem się ran czy w naukach biomedycznych i jest mało

przebadany pod kątem zastosowań w badaniach z wykorzystaniem ASCs. Z kolei model szczurzy posiada wszystkie wymienione zalety modelu mysiego a jednocześnie eliminuje główną jego niedogodność jakim jest rozmiar zwierzęcia. Dzięki temu jest on chętnie stosowany w badaniach wymagających procedur chirurgicznych lub ortopedycznych również z użyciem ASCs. Ponieważ model ten został przez nas dokładnie przebadany we wcześniejszych pracach ([publikacja 2,3,4](#)) w obecnym badaniu postanowiliśmy się skupić na różnicach pomiędzy dwoma najczęściej używanymi w badaniach szczepami szczurów chowu wsobnego WAG vs. LEW/W. Kolejnym badanym modelem doświadczalnym jest królik. Jego rozmiar umożliwia przeprowadzanie bardziej skomplikowanym procedur chirurgicznych czy ortopedycznych jednak koszty utrzymania, bardziej wymagająca hodowla, słaba odporność na stres, brak dostępności tak dużej jak w poprzednich modelach liczby gotowych przeciwciał czy zestawów badawczych jak i ograniczone możliwości ingerencji genetycznej czynią ten model badawczy mniej popularnym i słabiej przebadanym szczególnie pod kątem pozyskiwania komórek ASCs. Do naszego badania włączyliśmy szczury szczepu LEW/W i szczepu WAG w wieku 6 miesięcy. Tłuszcz pobierano pośmiertnie z wcześniej opracowanych lokalizacji tj. karkowej, pachwinowej, gonadalnej i okołonerkowej. Z podobnych lokalizacji uzyskano tłuszcz od królików rasy White New Zealand w wieku 12 miesięcy. W przypadku królików nie znaleziono odpowiednika tłuszczu pachwinowego – zamiast niego wewnątrzbrzusnie odnaleziono tłuszcz otrzewnowy, który pobrano do badań. Pobranie tłuszczu mysiego odbyło się mysz C57B6 w wieku 6 miesięcy. W tym przypadku ilość tkanki tłuszczowej była na tyle skąpa, że nie udało się podzielić go według opisanych wcześniej lokalizacji. Po wyizolowaniu komórek ASCs zgodnie z używaną w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej procedurą badano ich morfologię (markery powierzchniowe CD29, CD11b, CD90, CD45, CD34), potencjał proliferacyjny (zdolność do tworzenia kolonii), zdolności różnicowania się pod wpływem odpowiedniego medium w kierunku adipocytów (barwienie czerwieni olejowa), chondrocytów (barwienie Masson-Trichrome) oraz osteocytów (barwienie czerwieni alizarynowa). Porównanie dwóch szczepów szczurów wykazało, że ponieważ szczury szczepu LEW/W osiągają większą masę niż szczury szczepu WAG masa ich tkanki tłuszczowej jest większa a spośród wszystkich lokalizacji jest jej najwięcej w okolicy gonadalnej a nie pachwinowej jak w przypadku szczepu WAG. Pomimo tych różnic lokalizacje podskórne tkanki tłuszczowej, czyli tłuszcz karkowy i pachwinowy dostarczają podobnej ilościowo tkanki tłuszczowej jak u szczepu WAG i z powodzeniem mogą być stosowane równorzędnie w modelu autologicznego stosowania komórek ASCs. Natomiast w przypadku modelu allogenicznego stosowania ASCs, które najczęściej zakłada pośmiertne pobranie tkanki tłuszczowej szczury szczepu LEW/W posiadają lepsze właściwości ponieważ można z nich uzyskać więcej tkanki tłuszczowej a co za tym idzie więcej komórek ASCs. W przypadku królika najwięcej tkanki tłuszczowej pobrano z okolicy okołonerkowej a następnie karkowej i gonadalnej. Ponieważ króliki, jak wykazało nasze badanie nie posiadają podskórnego tłuszczu pachwinowego, jedyną dostępną lokalizacją tkanki tłuszczowej podskórnej jest tłuszcz karkowy, którego znaczna masa w stosunku do pozostałych lokalizacji umożliwia uzyskanie odpowiedniej ilości komórek ASCs i ich wykorzystanie w modelu autologicznym. Masa całkowitej tkanki tłuszczowej pobranej u myszy była prawie 16 krotnie mniejsza niż u szczura szczepu LEW/W i ponad 100 krotnie mniejsza niż u królika co czyni ten model badawczy najmniej użytecznym w doświadczeniach wymagających izolacji ASCs z tkanki tłuszczowej. Komórki wyizolowane od wszystkich 3 gatunków zwierząt wykazywały ekspresję antygenów charakterystycznych dla komórek ASCs, miały zbliżoną żywotność i różnicowały się do adipo-, chondro- i osteocytów. Ich gęstość czyli ilość wyizolowana z 1 g tkanki tłuszczowej była największa w modelu szczurzym w lokalizacji karkowej, co jest spójne z naszymi wcześniejszymi badaniami ([publikacja 2](#)). W modelu króliczym największą gęstość stwierdzono w przypadku tłuszczu otrzewnowego. Porównując zdolności proliferacyjne wyizolowanych komórek stwierdzono znacznie lepsze wyniki również w przypadku modelu szczurzego co czyni wybór tego zwierzęcia najbardziej efektywnym dla badań oceniających właściwości komórek ASCs.

Reasumując, na podstawie przedstawionych powyżej wyników, badania na tzw. małych zwierzętach oceniające właściwości komórek ASCs mogą zostać przeprowadzone u wszystkich głównych przedstawicieli tej grupy (mysz, szczur, królik) jednak najbardziej uniwersalnym, efektywnym i racjonalnym wyborem w naszej ocenie pozostaje model szczurzy. Został on przez nas szczegółowo scharakteryzowany pod względem zastosowań w inżynierii tkankowej zarówno w tej pracy jak i w ramach omawianych powyżej prac (**publikacja 2 i 3**) a opracowana technika przyżyciowego pobierania podskórnej tkanki tłuszczowej z okolicy karkowej czyni go najbardziej zbliżonym do modelu ludzkiego, gdzie również przyżyciowo (liposukcja) pobiera się podskórną tkankę tłuszczową aby po wyizolowaniu z niej komórek ASCs wykorzystać je w schemacie autologicznym.

6. **Dębski T, Kijeńska-Gawrońska E, Zołocińska A, Siennicka K, Słysz A, Paskal W, Włodarski PK, Świąszkowski W, Pojda Z.** Bioactive Nanofiber-Based Conduits in a Peripheral Nerve Gap Management-An Animal Model Study. *Int J Mol Sci.* 2021 May 25;22(11):5588. doi: 10.3390/ijms22115588. PMID: 34070436; PMCID: PMC8197537. (**publikacja 6**)

Przedstawione powyżej prace realizowane były w ramach projektu Bio-implant - „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” (POIG.01.01.02-00-022/09) (**punkt 6.1./1**), który miał na celu wytworzenie na bazie rusztowania tkanki kostnej niezbędnej do rekonstrukcji ubytków kostnych. Opracowana w ramach tego projektu nowa metoda unaczyniania rusztowań (**publikacja 1**) oraz liczne prace optymalizujące sposób pozyskiwania komórek ASCs (publikacje 2,3,4) i potwierdzające ich pluripotencjalne właściwości skłoniły mnie do poszukiwań nowych zastosowań inżynierii tkankowej w chirurgii rekonstrukcyjnej. Analiza potrzeb bazująca nie tylko na moim chirurgicznym doświadczeniu w rekonstrukcji różnych ubytków ale i na ówczesnych możliwościach terapeutycznych doprowadziła mnie do wniosku, że poza rekonstrukcją ubytków kostnych bardzo istotne jest również zagadnienie rekonstrukcji ubytków nerwów. Problem ten był mi znany nie tylko z pracy klinicznej w której na co dzień wykonywałem rekonstrukcje nerwów przeszczepami nerwu łydkowego ale również z moich zainteresowań naukowych i prac dotyczących tego tematu w których oceniałem odległe wyniki rekonstrukcji nerwów (**publikacja 13**) czy badałem epidemiologię urazów rąk, w trakcie których najczęściej dochodzi do uszkodzeń nerwów (**publikacja 12**). Dlatego bazując zarówno na doświadczeniu klinicznym jak i zdobytym w ramach realizacji poprzedniego grantu doświadczeniu w zakresie inżynierii tkankowej postanowiłem zainicjować wystąpienie o nowy grant, którego celem byłoby opracowanie bioaktywnego, elektroprowadzącego przewodnika nerwu (conduitu) zasiedlanego komórkami macierzystymi ASCs. Zdobyty grant Nano4Nerve - „Wielofunkcyjne kompozytowe biomateriały nanowłókniste dla inżynierii obwodowej tkanki nerwowej” (NCN 2013/11/B/ST8/03401) (**punkt 6.1./2**) pozwolił nie tylko na realizację projektu dotyczącego samego opracowanego przewodnika nerwu ale także dzięki założeniu, że jego elektroprowadzące właściwości mogą w przyszłości zostać wykorzystane do stymulowania prądem stałym np. odnerwionych mięśni, dał on podstawę do badań nad wpływem elektrostymulacji na właściwości komórek ASC (**publikacja 7**). W ramach realizacji grantu we współpracy z wydziałem Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej powstał przewodnik zbudowany z Poly(L-lactic acid co-ε-caprolactone) [P(LLA-CL)]. Dodany do struktury włókien przewodnika naturalny kolagen został wybrany spośród innych białek w fazie badań wstępnych jako najlepiej rokujący nośnik brakujących receptorów dla komórek ASCs, który umożliwia ich łatwe przyłączanie się do światła przewodnika i szybką proliferację. Dzięki temu możliwa stała się nie tylko neuroregeneracja nerwu ale także wykorzystanie w tym procesie pluripotencjalnych komórek ASCs, które posiadają wiele cech sprzyjających regeneracji nerwów. Należą do nich: pleiotropowy efekt immunomodulujący zmniejszający stan zapalny, wydzielanie czynników wzrostu i różnicowania, różnicowanie się w komórki przypominające komórki Schwanna (Schwann-like cells)[52,53] czy też przyspieszanie za pośrednictwem egzosomów proliferacji, migracji i mielinizacji komórek Schwanna [54-56]. Dodatkowym innowacyjnym elementem opracowanego rusztowania było wbudowanie do jego

struktury polianiliny (Poli), która dzięki właściwościom elektroprzewodzenia wzmacnia neuroregenerację [57] i może być w przyszłości wykorzystana do elektrostymulacji mięśni unerwianych przez uszkodzony nerw motoryczny. Pozwoliłoby to na wyeliminowanie problemu zaniku odnerwionych mięśni w trakcie trwającej kilka miesięcy regeneracji nerwu. Ze względów technicznych ocenę wpływu elektrostymulacji na neuroregenerację postanowiono wykonać najpierw w warunkach *in vitro* (**publikacja 7**) a potem ewentualnie po pozytywnych wynikach tych badań opracować elektrostymulator mający zastosowanie w modelu *in vivo*. W celu oceny skuteczności opracowanej koncepcji przewodnika nerwu zastosowano standardowy model szczurzy, w którym oceniano wpływ nowego materiału jak i komórek ASCs na regenerację 1 cm ubytku nerwu kulszowego. Badanie nad zwierzętami poprzedzono wykonaniem licznych testów oceniających właściwości fizykochemiczne, biokompatybilność i wpływ na różnicowanie się komórek ASCs opracowanego przewodnika. W celu oceny biokompatybilności na wykonanych z badanego materiału specjalnych matach badano aktywność metaboliczną (ABS 490nm) komórek ASCs oraz ekspresję genu *Neurod-1* (RQ), który jest jednym z ważniejszych czynników transkrypcyjnych w różnicowaniu do komórek nerwowych. Badania te dowiodły, że aktywność metaboliczna komórek hodowanych na matach zbudowanych z opracowanego przez nas materiału jest większa niż na matach zbudowanych z tożsamego materiału ale pozbawionego dodatku kolagenu. Podobne obserwacje dotyczyły ekspresji genu *Neurod-1* świadczącego o potencjale różnicowania do komórek nerwowych. W przypadku badanego materiału była ona odpowiednio 7 -krotnie i 2 krotnie większa w porównaniu do materiału pozbawionego kolagenu i plastiku. Dodatkowo ocena zasiedlania przewodników *in vitro* wykazała, że komórki ASCs, którymi są one zasiedlane przyczepiają się do receptorów kolagenowych i pozostają w ich świetle w większej ilości niż na zewnątrz.

Badanie na zwierzętach przeprowadzono na 28 szczurach rasy *Levis* chowu wsobnego, które po usunięciu 1 cm fragment nerwu kulszowego podzielono na 4 grupy. W grupie kontrolnej pozostawiano ubytek nerwu bez rekonstrukcji. W grupie z autoprzeszczepem usunięty fragment nerwu obracano o 180 stopni a następnie przy pomocy technik mikrochirurgicznych wszywano z powrotem. Kolejną grupę stanowiły szczury, u których ubytek nerwu rekonstruowano opracowanym przewodnikiem nerwu. W trakcie rekonstrukcji wprowadzano kikuty nerwu do przewodnika i zabezpieczano je przed wysunięciem dwoma szwami. W ostatniej badanej grupie po rekonstrukcji ubytku przewodnikiem nerwu dodawano do jego światła komórki ASCs. Po 6 -cio miesięcznej obserwacji badano funkcję nerwu kulszowego (test *Sciatic Functional Index*), stosunek masy mięśnia brzuchatego łydki zaopatrywanego przez rekonstruowany nerw do masy mięśnia zdrowego (*muscle mass ratio*), oceniano obecność włóknienia w obrębie mięśnia brzuchatego łydki (barwienie HE, *Trichrom-Masson*) oraz wykonano analizę morfometryczną włókien nerwowych na przekrojach poprzecznych użytych do rekonstrukcji nerwów (autoprzeszczep) i przewodników (barwienie immunohistochemiczne NF – 200 oraz histochemiczne *Weigert-Pal* na obecność osłonek mielinowych).

Wyniki badań funkcjonalnych (SFI) nie wykazały istotnych różnic statystycznych pomiędzy grupą z rekonstrukcją przeszczepem nerwu (autoprzeszczep) a grupami w których nerw rekonstruowano przy pomocy opracowanego przewodnika zarówno bez jak i z dodatkiem komórek ASCs (najlepszy wynik). Dowodzi to tego, że opracowany przewodnik zapewnia uzyskanie wyników porównywalnych z rekonstrukcją autoprzeszczepem, która uważana jest obecnie za złoty standard w rekonstrukcji nerwów. Badanie stosunku masy mięśniowej jak i obecności włóknienia w obrębie mięśni dostarczyło podobnych obserwacji z najlepszym wynikiem dla grupy z autoprzeszczepem, następnie odpowiednio dla grup z przewodnikiem niezasiedlonym, zasiedlonym komórkami ASCs i dla grupy bez rekonstrukcji nerwu, gdzie stosunek masy mięśniowej był najniższy a zawartość procentowa włóknienia na przekroju poprzecznym mięśnia najwyższa. Z kolei analiza morfometryczna włókien nerwowych na przekroju przewodników wykazała, że w grupie z przewodnikami zasiedlanym ASCs gęstość włókien, ich zaokrąglenie (*nerve fiber circularity*) i stosunek średnicy aksonu do średnicy całego włókna (*G-ratio*) są statystycznie większe niż w pozostałych grupach a pozostałe parametry w tej grupie takie jak powierzchnia aksonów czy grubość mieliny są wyższe niż w grupie z przewodnikami niezasiedlanymi ale porównywalne z grupą z autoprzeszczepem.

Uzyskane wyniki potwierdzają dobre właściwości opracowanego przewodnika nerwu zbliżone do najlepszej dostępnej w chwili obecnej formy leczenia, czyli autoprzeszczepu nerwu, którego podstawową wadą jest konieczność pobrania go z innej okolicy z następowym brakiem czucia w jej obrębie. Chociaż dodatek komórek ASCs do przewodnika zwiększył tylko nieznacznie (nieistotnie statystycznie) jego wyniki funkcjonalne i paradoksalnie (również nieistotnie statystycznie) obniżył stosunek masy mięśniowej w porównaniu do grupy z przewodnikiem niezasiedlanym to mniejsza obecność włóknienia mięśni jak i lepsza morfologia nerwów w tej grupie pozwala przypuszczać, że dodatek ASCs do opracowanego przewodnika zwiększa jego właściwości neuroregeneracyjne.

Reasumując należy uznać, że opracowany przewodnik jest biokompatybilny i zapewnia swobodną regenerację nerwu zbliżoną do autoprzeszczepu nerwu a wpływ zasiedlania go komórkami ASCs wymaga jeszcze dalszych badań potwierdzających ich właściwości proneurogenne. Jednym z takich badań prowadzonych w ramach opisywanego projektu było zbadanie wpływu elektrostymulacji opracowanych przewodników na właściwości zasiedlonych nimi komórek ASCs, co szczegółowo zbadano w ramach pracy przedstawionej poniżej.

7. Słysz A, Siennicka K, Kijeńska-Gawrońska E, Dębski T, Zołocińska A, Świąszkowski W, Pojda Z. The impact of electroconductive multifunctional composite nanofibrous scaffold on adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 2022 Aug 20;78:101899. doi: 10.1016/j.tice.2022.101899. Epub ahead of print. PMID: 36030673. **(publikacja 7)**

W niniejszej pracy poza oceną wpływu elektrostymulacji na właściwości komórek ASCs zdecydowaliśmy się jeszcze wykorzystać możliwości jakie daje nam proces elektroprądzenia za pomocą którego wytwarzane są przewodniki. Otóż włókna, które są potem używane w procesie elektroprądzenia mogą być zbudowane z dwóch materiałów, z których jeden stanowi rdzeń, wewnętrzną część takiego włókna a drugi stanowi jego zewnętrzną otoczkę. Ponieważ materiał z którego zbudowano przewodniki jest w pełni rozpuszczalny to na skutek rozpuszczania się zewnętrznej otoczki po kilku dniach mógłby być odsłaniany rdzeń takiego włókna posiadający inne właściwości i dodatkowo stymulujący neuroregenerację. Pozwala to więc na dostarczanie np. czynników wzrostu i różnicowania w sposób dynamiczny a nie w formie jednorazowego bolusu. Takie dynamiczne dostarczanie czynników wzrostu byłoby jak najbardziej zbliżone do występujących w przyrodzie warunków, gdzie istotne dla wzrostu nerwów jest zarówno kinetyka jak i gradient działających w danym momencie i w danej fazie regeneracji czynników wzrostu. Analizując literaturę przedmiotu, wyniki badań wstępnych porównujące różne neurogenne czynniki wzrostu jak i fizyczne możliwości inkorporowania ich do rdzenia włókien przewodnika wybraliśmy czynnik wzrostu NGF. Czynnik ten jest powszechnie stosowany w neruregeneracji i ma również udowodniony wpływ na komórki ASCs zwiększając ich przeżycie, proliferację i różnicowanie w kierunku ASCs [58]. W połączeniu z komórkami ASCs udowodniono też jego skuteczność w neuroregeneracji nerwów z użyciem biodegradowalnych przewodników [59]. Z tego powodu dołączenie go do przewodników nerwów pozwoliłoby na powolne uwalnianie go z rdzenia włókien w miarę upływu czasu i rozpuszczania się zewnętrznej otoczki. Pozwoliłoby to na stałe, dynamiczne uwalnianie tego czynnika w miarę postępowania procesu regeneracji nerwów, co w połączeniu z komórkami macierzystymi zapewniającymi dalszą humoralną regulację tego procesu stworzyłoby warunki najbardziej zbliżone do fizjologicznego procesu neuroregeneracji. Równie istotne w procesie neuroregeneracji jest generowane w trakcie życia człowieka pole elektromagnetyczne (potencjał czynnościowy) zapewniające różnice ładunku między błonami komórek wynoszącą od -10 do -90 mV i ułatwiające przekazywanie sygnałów ułatwiających proliferację i różnicowanie w kierunku komórek nerwowych [60]. Dodatkowym elementem imitującym naturalne środowisko (milieu) rekonstrukcji tkanki nerwowej byłoby także zastosowanie prądu stałego imitującego fizjologiczny ładunek elektryczny tkanki nerwowej (wysokość 90 mV i częstotliwości 1 Hz) [61]. Zatem zastosowanie dodatkowo

czynnika NGF i elektrostymulacji o potwierdzonych właściwościach poprawiających proces regeneracji nerwów [62] pozwoliłoby na uzyskanie jeszcze lepszych wyników i optymalizację opracowanego przez nas modelu przewodnika.

Aby zbadać wpływ elektrostymulacji i czynnika NGF na neuroregenerację zaprojektowano specjalne urządzenie bazujące na 6 - dołkowej płytce do hodowli komórkowych w której w każdym z dołków umieszczano dwie elektrody pomiędzy którymi wytwarzano pole elektromagnetyczne. Badane przewodniki zasiedlane komórkami ASCs podzielono na kilka grup w zależności od obecności lub nie czynnika NGF w ich strukturze oraz elektrostymulacji lub jej braku. Podobnego podziału dokonano badając same komórki ASCs bez zasiedlania nimi przewodników hodowane na plastikowym podłożu. Grupą kontrolną były komórki hodowane na plastikowym podłożu bez dodatku NGF i bez elektrostymulacji. Po okresie hodowli trwającym 4 dni oceniano w każdej grupie następujące parametry: liczbę i żywotność komórek, ekspresję genów potwierdzających neuroregenerację (NES, NCAM, NEUROD1), obecność β III-tubuliny, która jest markerem niedojrzałych neuronów oraz analizę chromosomów oceniającą wpływ badanych czynników na kariotyp komórek ASCs. Otrzymane wyniki wykazały podobną liczbę i żywotność komórek we wszystkich grupach za wyjątkiem grupy hodowanej na plastikowym podłożu z dodatkiem NGF i poddanej elektrostymulacji w której stwierdzono mniejszą żywotność. Stymulacja elektryczna zmniejszyła proliferację ASCs we wszystkich grupach podobnie jak dodanie czynnika NGF ale były to różnice nieistotne statystycznie i mogą one wynikać z szybszego różnicowania się komórek w tych grupach, które zmniejsza ilość komórek proliferujących. Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku ASCs hodowanych na plastikowych płytkach bez dodatku NGF i niepoddawanych elektrostymulacji a najgorsze dla ASCs zasiedlonych na przewodnikach z dodatkiem NGF poddanych elektrostymulacji. Najwyższą ekspresję wszystkich trzech genów zaobserwowano w przypadku grupy przewodników zasiedlanych ASCs zawierających NGF i poddanych elektrostymulacji choć wyniki dla poszczególnych genów były bardzo zróżnicowane. I tak największą ekspresję genu NES (wczesny marker neurogenezy) stwierdzono w przypadku przewodników bez dodatku NGF i bez elektrostymulacji, genu NEUROD1 (wczesny i późny marker neurogenezy) w przypadku przewodników z NGF poddanych elektrostymulacji, genu NCAM (późny marker neurogenezy) w przypadku przewodników z NGF ale bez elektrostymulacji. Z kolei ekspresja β III-tubuliny (marker niedojrzałych neuronów) była większa w wariantach z elektrostymulacją niezależnie od dodatku NGF. Analiza chromosomów nie wykazała żadnych anomalii w kariotypie komórek ASCs poddawanych zarówno elektrostymulacji i działaniu czynnika NGF. Uzyskane wyniki są kolejnym krokiem w kierunku jak najwierniejszego odtworzenia naturalnego środowiska dla regeneracji nerwów obwodowych. Zastosowanie jednoczesowe, elektroprzewodzących przewodników, elektrostymulacji prądem stałym oraz czynnika wzrostu NGF wykazały brak cytotoksycznego wpływu na komórki ASCs oraz synergię w działaniu na różnicowanie się komórek ASCs w kierunku komórek nerwowych.

Reasumując, wyniki tej pracy są kontynuacją prac nad optymalizacją wcześniej opracowanego przewodnika nerwu ([publikacja 6](#)) i dowodzą, że dodanie do niego czynnika wzrostu NGF i zastosowanie elektrostymulacji może znacznie poprawić wyniki rekonstrukcji nerwów i jeszcze bardziej zbliżyć nas do uzyskania wyników porównywalnych lub lepszych z rekonstrukcjami przeszczepami nerwów, które pomimo tego, że w dalszym ciągu są suboptymalne to w chwili obecnej są najlepsze. W kolejnym etapie projektu planowane jest stworzenie lub wykorzystanie istniejącego stymulatora nerwu implantowanego podskórnym i weryfikacja uzyskanych powyżej wyników w badaniach na modelu szczurzym.

4.3.4. Wnioski płynące z przedstawionego cyklu publikacji

1. Opracowana metoda prefabrykacji chirurgicznej rusztowań polimerowych jest skutecznym sposobem unaczyniania produktów inżynierii tkankowej. Jej zastosowanie pozwala na szybszy i bardziej kompleksowy rozwój unaczynienia co jest kluczowe nie tylko dla przeżycia i różnicowania zasiedlanych w obrębie rusztowania komórek ale także zapewnia ochronę przed jego zakażeniem i szybką degradacją. Daje też możliwość rozszerzenia osiągnięć i zastosowań inżynierii tkankowej na większe i bardziej kompleksowe produkty, których wytwarzanie było do tej pory ograniczone do rusztowań o małych rozmiarach, gdzie przeżycie zasiedlonych komórek warunkowane było zdolnościami dyfuzyjnymi tkanek. Opracowana metoda znalazła zastosowanie nie tylko w inżynierii tkankowej ale także w klinice o czym świadczą prace z zakresu ortopedii czy chirurgii szczękowo-twarzowej ją cytujące. Obecnie prowadzimy badania nad dalszym udoskonalaniem opracowanej metody poprzez modyfikacje materiału, z którego zbudowane jest rusztowanie. Opracowane nowe rusztowanie wzbogacone jest dodatkowo PLGA o silnych właściwościach angiogennych i TCP o właściwościach osteogennych i sprzyjających szybszej proliferacji komórek. Ich stopniowe uwalnianie mające miejsce w trakcie powolnej degradacji rusztowania mogłoby wspomóc angio- i osteogenezę. Wyniki tych badań są obiecujące a publikacja zawierająca wyniki tych badań jest w trakcie recenzowania. Kolejne modyfikacje materiału nad którymi obecnie pracujemy wraz z Wydziałem Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej dotyczą włączenia w strukturę włókien polimerowych rusztowania różnych czynników wzrostu i różnicowania, które uwalniane w trakcie degradacji rusztowania wspomagały dodatkowo angio- i osteogenezę.
2. Opracowana nowa metoda preparatyki histopatologicznej rusztowań polimerowych zachowuje ich delikatną, bełczkowatą strukturę i pozwala na pełną ocenę przekroju poprzecznego rusztowania. Dzięki temu możliwa jest bardziej kompleksowa wizualizacja wnętrza rusztowania i interakcji pomiędzy rusztowaniem a otaczającymi go komórkami a także ocena stopnia degradacji jego włókien. Dodatkowo możliwość oceny pełnego przekroju poprzecznego rusztowania pozwala na ilościową ocenę struktur tkankowych w jego wnętrzu i określenie ich stosunku do powierzchni tkanek go przerastających np. określenie gęstości naczyń krwionośnych na danych przekroju poprzecznym. Dzięki temu opracowana metoda ma szansę stać się nowym narzędziem pozwalającym na pełniejszą, bardziej wystandaryzowaną i porównywalną ocenę wyników badań z zakresu inżynierii tkankowej.
3. Scharakteryzowany model doświadczalny badań nad komórkami ASCs opierający się na modelu szczurzym oraz opracowana technika autologicznego wykorzystania komórek ASCs w tym modelu stanowią optymalną platformę do badań z zakresu inżynierii tkankowej. Przeprowadzone badania oceniające model szczurzy jako źródło komórek ASCs dostarczyły szeregu informacji, które mogą być pomocne w planowaniu i przeprowadzaniu doświadczeń z zakresu inżynierii tkankowej. Opracowanie dostępow chirurgicznych do różnych lokalizacji tkanki tłuszczowej szczura, ocena tych lokalizacji pod kątem zawartości komórek ASCs, ich właściwości proliferacyjnych i zdolności do różnicowania się w zależności od lokalizacji, wieku czy ilości pasażu komórkowych, optymalizacja zasiedlania tymi komórkami rusztowań polimerowych czy optymalizacja procesów różnicowania się tych komórek w kierunku osteogenezy pozwoliły lepiej poznać model szczurzy w kontekście wykorzystania go do badań nad komórkami ASCs, które w ostatnim czasie ze względu na łatwość pozyskania tych komórek i dobre właściwości regeneracyjne są bardzo popularne. Dzięki wynikom przeprowadzonych badań wiemy, że najbardziej optymalną lokalizacją dla pozyskania komórek ASCs jest lokalizacja karkowa, komórki ASCs nie tracą swoich właściwości wraz z wiekiem szczura tylko z ilością przeprowadzonych pasażu komórkowych, najlepszym medium różnicującym te komórki w kierunku osteogenezy jest

wariant z dodatkiem BMP i FGF2, komórki te lepiej proliferują na rusztowaniach zbudowanych z PCL z dodatkiem TCP w porównaniu z rusztowaniami zbudowanymi z samego PCL, znamy też optymalną ilość i sposób zasiedlania rusztowań polimerowych tymi komórkami. W toku tych badań opracowano i scharakteryzowano także metodę przyżyciowego pobierania tkanki tłuszczowej karkowej szczura, która pozwala na pozyskanie dużej, wystarczającej do większości eksperymentów ilości komórek ASCs o dobrych właściwościach proliferacyjnych i różnicujących. Umożliwia to wykorzystanie tych komórek w modelu autologicznym, który jest najbardziej zbliżonym do modelu ludzkiego, gdzie również przyżyciowo (liposukcja) pobiera się podskórną tkankę tłuszczową aby po wyizolowaniu z niej komórek ASCs wykorzystać je u tego samego osobnika. W końcu porównanie przebadanego przez nas modelu szczurzego z innymi dostępnymi modelami w grupie tzw. małych zwierząt (mysz, szczur, królik) pod kątem efektywności wykorzystania tych gatunków zwierząt w badaniach z zakresu inżynierii tkankowej wykazało, że najbardziej uniwersalnym, efektywnym i racjonalnym wyborem pozostaje w naszej ocenie przebadany przez nas kompleksowo model szczurzy.

4. Opracowany przewodnik nerwu jest kolejnym krokiem w kierunku wdrożenia narzędzi inżynierii tkankowej do praktyki klinicznej (chirurgii rekonstrukcyjnej). Uzyskane wyniki potwierdzają jego biokompatybilność i dobre właściwości regeneracyjne zbliżone do najlepszej dostępnej w chwili obecnej formy leczenia, czyli autoprzyszczepu nerwu. Dodanie komórek ASCs do światła przewodnika nerwu zwiększa jego właściwości regeneracyjne wyrażone poprzez poprawę wyników funkcjonalnych, zmniejszenie włóknienia w obrębie mięśni zaopatrywanych przez rekonstruowany nerw oraz poprawę morfologii regenerującego się nerwu na przekroju poprzecznym (większa gęstość włókien, ich zaokrąglenie (nerve fiber circularity) i stosunek średnicy aksonu do średnicy całego włókna). Jednak wpływ komórek ASCs na neuroregenerację w obrębie przewodnika wymaga jeszcze dalszych badań, które są w dalszym ciągu kontynuowane. Z kolei badania nad optymalizacją składu przewodnika poprzez dodanie do jego włókien czynnika NGF oraz zastosowanie elektrostymulacji prądem stałym w jego obrębie wykazały brak cytotoksycznego wpływu tych czynników na komórki ASCs oraz synergii w pobudzaniu różnicowania się komórek ASCs w kierunku komórek nerwowych. Może to znacznie poprawić wyniki rekonstrukcji nerwów a dzięki zdolnościom elektroprzewodzącym materiału, z którego jest wykonany przewodnik możliwa jest elektrostymulacja nie tylko w obrębie przewodnika, która jak dowiedliśmy ma korzystny wpływ na zasiedlone w jego świetle komórki ASCs ale także możliwa będzie elektrostymulacja zaopatrywanych przez rekonstruowany nerw mięśni, która zapobiegnie ich degeneracji będącej skutkiem odnerwienia. W kolejnym etapie poza zbadaniem opisanej wyżej modyfikacji składu przewodnika w badaniach *in vivo* na szczurach planowane jest także stworzenie lub wykorzystanie istniejącego już stymulatora nerwu implantowanego podskórnie zapewniającego elektrostymulację zarówno samego przewodnika jak i grupy mięśniowej zaopatrywanej przez rekonstruowany nerw.

4.3.5. Zastosowanie kliniczne przeprowadzonych badań.

Opracowana metoda unaczyniania rusztowań polimerowych (**publikacja 1**) znajdzie zastosowanie głównie w chirurgii plastycznej, ponieważ pozwoli na wytwarzanie struktur tkankowych takich jak kość czy chrząstka, gdzie odpowiednie unaczynienie i funkcja podporowa rusztowania są najistotniejsze. Kliniczne zastosowanie opracowanej metody składałoby się z kilku etapów. W pierwszym etapie zostałby opracowany trójwymiarowy model ubytku kości, który powstał lub powstanie po jej usunięciu. Opracowanie takiego modelu jest możliwe ponieważ dokładny zakres usuwanej kości można już zaplanować przed operacją na podstawie trójwymiarowej rekonstrukcji

kości wykonanej przy pomocy badania CT. Na takiej rekonstrukcji zaznaczany jest obszar kości, który zostanie usunięty a następnie zaplanowane linie cięcia są odwzorowywane przy pomocy nawigacji śródoperacyjnej w polu operacyjnym, gdzie ręka chirurga, a co za tym idzie linia cięcia korygowana jest przez nawigację. Po określeniu kształtu i wielkości powstałego albo planowanego ubytku zostanie wydrukowane na drukarce 3D specjalne rusztowanie, które będzie zakładało umieszczenie w jego wnętrzu szypuły naczyniowej. W kolejnym etapie rusztowanie będzie zasiedlone komórkami macierzystymi indukowanymi w kierunku osteogenezy a następnie wszczepione zgodnie z założeniem metody w taki sposób, aby główne naczynia znajdowały się w jego wnętrzu. Najdogodniejsze lokalizacje naczyń, które będą mogły stanowić szypułę płata to okolica pachwinowa (naczynia powierzchowne okalające udo), przyśrodkowa część przedramienia (naczynia promieniowe), okolica łopatkowa (naczynia okalające łopatkę), czołowa (naczynia nadbłoczkowe) i skroniowa (naczynia skroniowe powierzchowne). Wymienione lokalizacje oraz unaczynienie zostały już wcześniej opisane i mają zastosowanie, jako płaty skórno-tłuszczowe (odpowiednio płat pachwinowy, promieniowy tzw.chiński, łopatkowy, płat czołowy tzw.indyjski, skroniowy) stosowane w celu rekonstrukcji ubytków tkanek w chirurgii rekonstrukcyjnej. Po 2 miesięcznej prefabrykacji rusztowanie wraz z otaczającymi je tkankami byłoby przeniesione w miejsce ubytku kości z pozostawieniem jego pierwotnej szypuły naczyniowej, która byłaby albo przeniesiona w nową lokalizację albo w przypadku braku takiej możliwości przecięta i zespolona mikrochirurgicznie z naczyniami w miejscu biorczym. Pozwoliłoby to na dostarczenie zdrowych tkanek i uniezależnienie ich od słabego ukrwienia w miejscu ubytku, które może być następstwem naświetlania z powodu nowotworu, przebytego urazu lub anomalii naczyniowych związanej z wadą wrodzoną.

Pierwsze doświadczenia z prefabrykacją opisał ponad 20 lat temu Schliephake i Langner [63], którzy prefabrykowali pyrolizowany przeszczep kości bydłowej w celu rekonstrukcji ubytku żuchwy u mini świni. Po 5 miesięcznej implantacji w okolicy ubytku przenieśli go w miejsce ubytku uzyskując wgojenie kości. Po 5 latach zespół Terheydena [64] użył ksenogenicznej kości (Bio-Oss) wraz BMP-7, którą umieścił w obrębie mięśnia najszerzego grzbietu u mini świni. Po 6, 12 i 24 tygodniach stwierdzili oni w obrębie rusztowań prawidłową tkankę kostną. W kolejnym etapie badań po 6 tygodniach przenieśli prefabrykowaną w ten sposób ksenogeniczną kość w miejsce ubytku w zakresie żuchwy zwierzęcia. W porównaniu z grupą kontrolną, gdzie badali wgajanie się przeszczepu kości nieprefabrykowanego stwierdzili znacznie lepsze wyniki w zakresie kościotworzenia [65]. Po dwóch latach ta sama grupa [65] wykonała pierwszą operację u człowieka. Po 7 tygodniach prefabrykacji ksenogenicznego przeszczepu kości wzbogaconego BMP-7 i aspiratem szpiku kostnego przenieśli go w miejsce ubytku żuchwy. Zabieg został przeprowadzony bez żadnych komplikacji, po 4 tygodniach pacjent mógł spożywać normalne posiłki zamiast płynnych pokarmów, które spożywał przez ostatnie 9 lat. W tomografii komputerowej i scyntygrafii stwierdzono remodeling kości i postęp mineralizacji już 11 dni po transplantacji. Po roku od operacji Warnke [66] opublikował późne wyniki operacji. Po 6 miesiącach tytanowa siatka osłaniająca przeszczep kości uległa złamaniu i przebiła śluzówkę ekspozując cały przeszczep na działanie flory bakteryjnej jamy ustnej. Doszło do powstania martwicy kości, która była konsekwentnie usuwana a ubytek był uzupełniany przeszczepami kości gąbczastej. Niestety nie udało się opanować infekcji kości i zamknąć ubytku śluzówki nad nią. Po 15 miesiącach pacjent zmarł z powodu zawału serca a rodzina nie zgodziła się na pośmiertne badania histopatologiczne. Warnke w podsumowaniu stwierdził, że przyczyną niepowodzenia było zastosowanie nierozpuszczalnej tytanowej sieci, brak zastosowania komórek prekursorowych w celu większego wyindukowania wytwarzania kości oraz niewłaściwy dobór pacjenta (powinien być młodszy, nie palić papierosów i nie pić alkoholu) [66].

Opracowana przez mnie metoda prefabrykacji wydaje się wykluczać wspomniane przez Warnke przyczyny niepowodzenia. Otóż wytworzone drogą druku 3D rusztowanie jest stabilniejsze i

swoją wytrzymałością zbliżone do wytrzymałości zdrowej tkanki kostnej. Może być ono także zaprojektowane w taki sposób, aby wraz z główną częścią rusztowania wydrukować odpowiedni system mocowań zapewniający stabilne i wytrzymałe zespolenie z kością. Dodatkowo rusztowanie jest rozpuszczalne i może być wzbogacone o uwalniające się z niego wraz z procesem jego rozpuszczania czynniki wzrostu i różnicowania oraz antybiotyki. Umieszczone w jego wnętrzu naczynia krwionośne pozwolą na powstanie bogatej sieci naczyniowej, która będzie je dodatkowo chroniła przed zakażeniem i nadmierną resorpcją nawet w momencie ekspozycji na zakażone środowisko (dobrze ukrwione tkanki są bardziej odporne na zakażenia i łatwiej docierają do nich podawane ogólnoustrojowo antybiotyki). Wreszcie kontrolowane i wykonane w warunkach certyfikowanego laboratorium zasiedlenie rusztowań odpowiednią ilością żywych i walidowanych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASCs) zapewni szybkie unaczynienie rusztowania przy jednoczesnym rozwoju kości w jego obrębie.

Otrzymane w trakcie badań nad nową metodą prefabrykacji wyniki upoważniają mnie także do postawienia hipotezy, że aby szybko i skutecznie wytwarzać gęstą sieć naczyniową w tkankach niedokrwionych np. w płatach tkankowych zagrożonych martwicą czy niedokrwionych kończynach lub palcach konieczne jest podanie komórek macierzystych w okolicę naczynia zaopatrującego dany obszar. Udowodniłem bowiem, że tworzenie nowych naczyń przebiega znacznie szybciej w przypadku, gdy komórki macierzyste znajdują się w bliskim sąsiedztwie naczyń odżywczych (nowa metoda prefabrykacji z naczyniem wewnątrz zasiedlonego komórkami macierzystymi rusztowania). Chociaż udowodnione zostały już właściwości angiogenne komórek macierzystych w tego typu przypadkach [67,68,69] to miejsce ich podania było zawsze przypadkowe. Podanie komórek macierzystych bezpośrednio w okolicę naczynia zaopatrującego ulegający martwicy płat czy ulegającą niedokrwieniu kończynę lub palec powinno znacznie szybciej doprowadzić do wytworzenia gęstej sieci naczyniowej niż po podaniu tych komórek w inną przypadkową okolicę np. w okolicę najbardziej niedokrwioną. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe stałoby się szybsze wytworzenie naczyń i wygranie walki z czasem niedokrwienia, który jest kluczowym czynnikiem determinującym przeżywalność niedokrwionych tkanek.

Poza bezpośrednim wpływem opracowanej metody unaczyniania nie sposób pominąć wkładu badań nad komórkami ASCs ([publikacje 3,4,5](#)) czy badań nad preparatyką histopatologiczną rusztowań ([publikacja 2](#)) w rozwój inżynierii tkankowej, która w ostatnim czasie przeżywa swój intensywny rozkwit. Wyniki tych prac pozwolą naukowcom wykorzystującym komórki ASCs w różnych modelach badawczych na lepsze zaplanowanie i przeprowadzenie swoich badań. Nie do przecenienia jest też rola opracowanego przewodnika nerwu w rekonstrukcji nerwów obwodowych ([publikacja 6,7](#)).

Leczenie uszkodzeń nerwów obwodowych stanowi istotny problem kliniczny. W samych Stanach Zjednoczonych wykonuje się rocznie ponad 200 000 rekonstrukcji nerwów. Do uszkodzeń nerwów obwodowych dochodzi najczęściej w następstwie urazów. Ponieważ spośród wszystkich urazów występujących u człowieka urazy rąk występują najczęściej (2,8-6,1%) to najwięcej rekonstrukcji nerwów wykonuje się właśnie w zakresie ręki ([publikacja 12](#)) [70]. Ręka pozbawiona czucia staje się bezużyteczna i traktowana jest przez pacjenta niczym ciało obce. Niesie to za sobą nie tylko konsekwencje zdrowotne i obniża jakość życia pacjenta, ale także generuje wysokie koszty społeczne (renta inwalidzka). Optymalnym postępowaniem w przypadku urazu nerwu jest pierwotne jego zespolenie przy użyciu technik mikrochirurgicznych w taki sposób, aby napięcie między końcami nerwu było minimalne. Napięcie jest bowiem głównym czynnikiem powodującym opóźnioną neuroregenerację [71]. Często jednak ze względu na zakres urazu (np. uraz piłą tarczową) ubytek nerwu jest tak duży, że nie jest możliwa jego pierwotna beznapięciowa naprawa. W tej sytuacji, aby połączyć kikuty nerwów stosuje się auto- lub alloprzeszczepy nerwów [72]. Choć alloprzeszczepy nerwów są obecnie uznaną metodą leczenia ubytków nerwów palcowych nieprzekraczających 3 cm

[73] to z różnych przyczyn (etycznych, legislacyjnych, organizacyjnych) nie są powszechnie stosowane. W chwili obecnej złotym standardem leczenia ubytków nerwów pozostaje nadal autogeny przeszczep nerwu. Powinien być on zastosowany w każdym przypadku uszkodzenia nerwu motorycznego lub mieszanego i przy rekonstrukcji ubytków nerwów przekraczających 3 cm [73]. W trakcie tej procedury powstały między kikutami nerwu ubytek uzupełnia się pobranym z innej okolicy nerwem czuciowym a następnie mikrochirurgicznie zespala się go beznapięciowo z końcami nerwu. Najczęściej w tym celu pobiera się nerw łydkowy ([publikacja 13](#)) lub nerw skórny przyśrodkowy przedramienia. Jednak postępowanie takie obarczone jest wieloma wadami takimi jak przede wszystkim pozbawienie czucia w obszarze unerwianym przez pobierany nerw (np. bocznej grzbietowej powierzchni stopy w przypadku nerwu łydkowego). Często w takich przypadkach rodzi się pytanie czy warto dla powrotu czucia w zakresie palca ręki poświęcać zdrowy nerw i narażać pacjenta na utratę czucia w zakresie stopy? Inne niedogodności tej metody związane są z powikłaniami ze strony miejsca dawczego takimi jak tworzące się w obrębie kikutów pobranego przeszczepu nerwu bolesne nerwiaki czy tkliwa blizna. Dodatkowo różnice w strukturze pęczkowej i średnicy pomiędzy nerwem przeszczepianym a nerwem w miejscu ubytku odpowiedzialne są często za niezadowalające wyniki rekonstrukcji nerwu tą metodą, szczególnie przy dużych ubytkach. Innym ograniczeniem jest też ilość materiału jaką możemy pobrać z miejsca dawczego. Niedogodności związane z metodą autoprzyszczepu nerwu dotyczą także innych, niezwiązanych z urazami rąk przypadków uszkodzeń nerwów takich jak jatrogenne uszkodzenie nerwu twarowego w następstwie resekcji guzów ślinianki czy uszkodzenia nerwów w następstwie usunięcia nerwiaka nerwu obwodowego.

Z tego powodu od wielu lat trwają intensywne poszukiwania alternatywy dla przeszczepu nerwu – jedną z nich jest rekonstrukcja nerwu przy pomocy przewodnika nerwu. Jego zadaniem jest izolacja przestrzeni między kikutami nerwu i stworzenie optymalnych warunków (podłużny układ włókien przewodnika, czynniki wzrostu) dla uporządkowanego wzrostu włókien nerwowych od kikuta bliższego w kierunku kikuta dalszego nerwu. Zastosowanie tej metody eliminuje wspomniane wyżej wady rekonstrukcji nerwu autoprzyszczepem i ma szansę stać się złotym standardem postępowania. Dotychczas zarejestrowano przewodniki zbudowane z kolagenu typu I, kwasu poliglikolowego, polikaprolaktonu, alkoholu poliwinylowego czy chitasanu. Są one zarejestrowane głównie do rekonstrukcji małych (<3 cm) ubytków nerwów palcowych jednak ich skuteczność w leczeniu tych ubytków jest dużo niższa w porównaniu z rekonstrukcjami autoprzyszczepem nerwu. Z tego powodu w ostatnich latach trwają intensywne poszukiwania nowych wariantów przewodnika nerwu, który powinien być zbudowany w taki sposób i z takiego materiału aby w pełni imitował on epineurium nerwu obwodowego. W nurt tych poszukiwań włączają się również moje badania nad przewodnikiem nerwu ([publikacja 6 i 7](#)), który ma szansę stać się ciekawą alternatywą dla przewodników obecnie zarejestrowanych. Opracowany przewodnik wykonany został metodą elektroprzędzenia poprzez wyplatanie poszczególnych odpowiednio ułożonych nanowłókien zbudowanych z Poly(L-lactic acid co-ε-caprolactone [P(LLA-CL)]) z dodatkiem naturalnego kolagenu umożliwiającego adhezję komórek nerwowych i komórek ASCs, których jednoczesne zastosowanie wpływa stymulująco na regenerację nerwu. Dodatkowym innowacyjnym elementem opracowanego przewodnika było wbudowanie do jego struktury polianiliny (Poli), która dzięki właściwościom elektroprzewodzenia wzmacnia neuroregenerację. Z klinicznego punktu widzenia przewodnik przewodzący ładunki elektryczne mógłby znaleźć zastosowanie w elektrostymulacji mięśni unerwianych przez uszkodzony nerw motoryczny. Pozwoliłoby to na wyeliminowanie problemu zaniku odnerwionych mięśni w trakcie trwającej kilka miesięcy regeneracji nerwu. Dzięki elektroprzewodzącym właściwościom opracowanego przewodnika zaraz po jego wszczepieniu możliwa byłaby także elektrostymulacja mięśni co ograniczyłoby ich zanik do czasu pełnej regeneracji nerwu i dotarcia do płytek motorycznych mięśni jego włókien nerwowych. Dotychczasowe wyniki badań oceniające właściwości

opracowanego przewodnika nerwu są bardzo obiecujące ale aby możliwe było jego wprowadzenie do użycia klinicznego konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań *in vitro* i *in vivo* potwierdzających jego skuteczność i bezpieczeństwo w regeneracji nerwów nad czym w dalszym ciągu pracujemy.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Inżyniera tkankowa

Zainteresowanie inżynierią tkankową i jej zastosowaniem w chirurgii plastycznej zaczęło się już we wczesnym etapie mojej kariery zawodowej kiedy w 2010 roku jeszcze jako rezydent chirurgii plastycznej w Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP napisałem wraz z prof. Jethonem pracę poglądową omawiającą najnowsze trendy i osiągnięcia w chirurgii plastycznej.

Dębski T, Jethon J. Chirurgia Plastyczna w 2011 roku. Postępy Nauk Medycznych; 2012; Tom XXV; Supl.1; 63-68 (publikacja 8)

IF=0; punkty MNiSW = 5

W pracy tej przedstawiłem poza nowymi wówczas elementami tzw. drabiny rekonstrukcyjnej (terapia podciśnieniem, matryce skóry) oraz ówczesnymi osiągnięciami i ograniczeniami związanymi z transplantacją twarzy i kończyn górnych postępy jakie dokonują się w inżynierii tkankowej. Omówiłem jej potencjalne miejsce w chirurgii plastycznej jako narzędzie do wytwarzania brakujących tkanek „na zamówienie” bez uszkodzania miejsca biorczego lub allotransplantacji. Przedstawiłem też obiecujące jak na tamte czasy osiągnięcia w zakresie inżynierii tkankowej skóry, tkanki tłuszczowej, chrząstki, kości czy nerwów obwodowych. Omówiłem też istniejące wówczas problemy i ograniczenia tej nowej dziedziny oraz prognozowałem jej dynamiczny rozwój i możliwość wykorzystania jej osiągnięć jako nowych opcji terapeutycznych w chirurgii plastycznej. Fascynacja inżynierią tkankową powstała w trakcie eksploracji tego tematu w trakcie pisania tego artykułu skłoniła mnie do poszukiwań możliwości rozwijania moich zainteresowań. Konsekwencją tego było dostanie się do projektu Bio-implant - „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” (POIG.01.01.02-00-022/09)(**punkt 6.2/1**), który zakładał wytworzenie drogą inżynierii tkankowej kości w celu rekonstrukcji ubytków tkanek po resekcjach z powodu nowotworów. Powierzone mi wówczas zadanie realizowane w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej pod kierunkiem prof. Pojdy obejmowało przygotowanie zaplecza i zespołu do przeprowadzenia badań nad implantacją wytworzonych metodą druku 3D rusztowań u małych zwierząt. Poza oceną samej biokompatybilności wszczepianych rusztowań postanowiłem zająć się też tematem ich szybkiego unaczyniania, niezbędnego do prawidłowej integracji i funkcjonowania, optymalizacją procesów pozyskiwania komórek ASCs oraz doskonaleniem metod diagnostycznych w tym oceny histopatologicznej i technik obrazowych (prace omówione ramach cyklu publikacji – **punkt 4.2**). Na wstępnym etapie prac wraz zespołem prof. Pojdy opublikowaliśmy poglądowy artykuł na temat ówczesnego miejsca mezenchymalnych komórek macierzystych w regeneracji tkanek.

Pojda Z, Machaj E, Kurzyk A, Mazur S, Dębski T, Gilewicz J, Wysocki J. Mezenchymalne komórki macierzyste [Mesenchymal stem cells]. Postępy Biochem. 2013;59(2):187-97. Polish. PMID: 24044283. (publikacja 9)

IF=0; punkty MNiSW = 8

W artykule tym na podstawie przeglądu piśmiennictwa dokonano ujednolicenia nomenklatury i przedstawiono najnowszą definicję mezenchymalnych komórek macierzystych,

omówiono ich potencjalne źródła, wyniki najnowszych badań określających ich właściwości oraz potencjalne zastosowanie kliniczne. Dokonano także oceny ich profilu bezpieczeństwa oraz określono wpływ na komórki nowotworowe, co jest istotne z punktu widzenia klinicznego zakładającego ich stosowanie w obrębie tkanek po resekcjach nowotworowych. We wnioskach stwierdzono, że zdolność do ich wielokierunkowego różnicowania, własności immunomodulacji i regulacji endogennej naprawy tkanek sprawiły, że są one coraz szerzej wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej jednak aby w pełni określić ich właściwości, bezpieczeństwo ich stosowania w różnych chorobach oraz potencjalne wykorzystanie potrzebne jest przeprowadzenie lepiej zaprojektowanych randomizowanych badań na szerszej grupie z bardziej obiektywną oceną wyników.

Posiadając już pierwsze doświadczenia i wyniki prac oceniających opracowaną metodę prefabrykacji jako sposób szybkiego unaczyniania rusztowań postanowiliśmy przedstawić wstępne wyniki na Międzynarodowym Kongresie Chirurgii Plastycznej, Rekonstrukcyjnej i Estetycznej w Chile. Praca została bardzo dobrze przyjęta i wyróżniona jako jedna z trzech najlepszych spośród kilkuset prac z całego świata prezentowanych na Kongresie. W ramach wyróżnienia wyniki tej pracy zostały opublikowane w branżowym czasopiśmie IPRAS Journal.

Dębski T, Gilewicz J, Kurzyk A, Ostrowska B, Induced Angiogenesis in PCL Bioactive Scaffolds with a new Prefabrication Method. Experimental study on rats. IPRAS Journal, Issue 12/2013, 58-59. (publikacja 10)

IF=0; punkty MNiSW = 0

W ramach tej pracy omówiono wstępne wyniki przeprowadzonych doświadczeń, zaprezentowano założenia nowej metody prefabrykacji i wstępne wyniki badań histopatologicznych i obrazowych. Już wtedy na podstawie wyników badań można było zauważyć, że nowa metoda prefabrykacji jest skuteczna i zapewnia szybsze i lepsze unaczynienia rusztowań.

Kolejna praca prezentująca również wstępne wyniki dotyczyła badań obrazowych przeprowadzanych przyżyciowo na szczurach u których w miejsce ubytku kości udowej wszczepiano rusztowanie z PCL, które stabilizowano przy pomocy 4 mikrośrub. Wyniki pracy zostały przedstawione na kongresie Europejskiego Towarzystwa Regeneracji Tkanek w Grecji a następnie opublikowane w formie rozszerzonego streszczenia w czasopiśmie Wound Repair and Regeneration.

Gilewicz J, Dębski T, Szałwiński M, Jaworowski J, Lekszycki T. In vivo microtomography in assessment of bone tissue regeneration in bioactive scaffolds. Wound Repair and Regeneration 20 (5), A93-A93 2012 (publikacja 11)

IF=3,22; punkty MNiSW = 35

W pracy przedstawiono optymalny sposób przygotowania zwierząt do badania, omówiono metodę ich znieczulenia oraz optymalną pozycję zwierząt w trakcie badania, przedstawiono parametry obrazowania oraz wyniki badań. Omówiono też ograniczenia i wady tego typu badania oraz kierunek dalszych prac nad optymalizacją tej metody.

5.2. Chirurgia rekonstrukcyjna

Poza działalnością naukową prowadzoną w ramach projektu Bio-Implant „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” (POIG.01.01.02-00-022/09) **(punkt 6.2/1)** a potem w ramach projektu Nano4Nerve - „Wielofunkcyjne kompozytowe biomateriały nanowłókniste dla inżynierii obwodowej tkanki nerwowej” (NCN 2013/11/B/ST8/03401) **(punkt 6.2/2)** realizowanych w Narodowym Instytucie Onkologii - Państwowym Instytucie Badawczym (NIO-

PIB) równoległe rozwijałem działalność zabiegową w zakresie chirurgii plastycznej w Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP najpierw jako rezydent a po ukończeniu specjalizacji z chirurgii plastycznej jako asystent naukowo-dydaktyczny. W ramach mojej pracy klinicznej zajmowałem się zagadnieniami związanymi z chirurgią ręki, mikrochirurgicznymi rekonstrukcjami nerwów obwodowych, leczeniem opadania powiek górnych, leczeniem wad poroszczepowych czy leczeniem nowotworów skóry. Zainteresowanie chirurgią ręki wynikało głównie ze specyfiki oddziału w którym pracowałem, który jako jeden z nielicznych w Polsce prowadził ostry dyżur z zakresu chirurgii ręki. Swoistym podsumowaniem działalności ostrodyżurowej tego oddziału było retrospektywna praca przedstawiająca epidemiologię urazów leczonych w tym ośrodku:

Dębski T, Noszczyk BH. Epidemiology of complex hand injuries treated in the Plastic Surgery Department of a tertiary referral hospital in Warsaw. Eur J Trauma Emerg Surg. 2020 Feb 5. doi: 10.1007/s00068-020-01312-5. Epub ahead of print. PMID: 32025767. (publikacja 12)

IF=3,69; punkty MNiSW = 70

W pracy przedstawiłem analizę kolejnych przypadków urazów ręki zaopatrywanych w Klinice Chirurgii Plastycznej na przełomie 5 lat. Oceniałem wiek i płeć pacjentów, rodzaj, etiologię, sezonowość i charakter urazów sklasyfikowany według międzynarodowej skali HISS (Hand Injury Severity Scoring System) a także czas absencji w pracy. Spośród 1091 pacjentów z urazami rąk ponad 84% stanowili mężczyźni poniżej 40 roku życia. Do urazów najczęściej dochodziło w pracy w okresie jesienno-zimowym. Najczęściej uszkodzane były ścięgna zginacze w obrębie palców (56,1 %) a amputacje występowały u co 4 - tego pacjenta. Złamania stanowiły 9,6%, uszkodzenia nerwów 6,1% a stawów 5,5%. Według skali HISS ponad połowę urazów stanowiły urazy bardzo ciężkie (25,5%) i ciężkie (26,5%). Czas powrotu do pracy w tych przypadkach zajmował minimum 6 miesięcy a często kończył się trwałą niezdolnością do pracy co powoduje liczne niekorzystne następstwa ekonomiczne i socjologiczne. Wnioski płynące z tej pracy wskazują na konieczność poprawy warunków pracy, propagowania zasad bezpieczeństwa i higieny w miejscach pracy oraz podkreślają znaczenie lepszej dostępności do specjalistycznych ośrodków zajmujących się chirurgią ręki.

Spośród wszystkich urazów występujących u człowieka to właśnie w przypadku urazów rąk dochodzi najczęściej do uszkodzenia nerwów obwodowych, głównie w zakresie palców ręki. Z powodu towarzyszącego urazu sąsiadujących struktur, znacznego ubytku pourazowego nerwu, niesprzyjających warunków miejscowych czy braku specjalistycznego sprzętu często rekonstrukcja pierwotna nerwu nie jest możliwa. Wówczas odracza się ją w czasie i wykonuje dopiero po kilku miesiącach w specjalistycznych ośrodkach posiadających zaplecze mikrochirurgiczne do wykonywania rekonstrukcji nerwów. W większości przypadków zeszywanie nerwu koniec do końca nie jest możliwe, dlatego niezbędne jest wykonanie przeszczepu nerwu najczęściej łydkowego, który połączy powstały ubytek nerwu. Po mikrochirurgicznym zespoleniu jego końców następuje powolna regeneracja zapewniająca powrót czucia w obszarze zaopatrywanym przez dany nerw. Odległe wyniki takich rekonstrukcji przedstawiłem w kolejnej pracy:

Dębski T, Złotorowicz M, Noszczyk BH. Long-term sensibility outcomes of secondary digital nerve reconstruction with sural nerve autografts: a retrospective study. Eur J Trauma Emerg Surg. 2021 Jul 19. doi: 10.1007/s00068-021-01747-4. Epub ahead of print. PMID: 34279668. (publikacja 13)

IF=3,69; punkty MNiSW = 70

U 61 pacjentów oceniono 174 rekonstrukcje nerwów dłoniowych palców z użyciem przeszczepu nerwu łydkowego. Średni czas obserwacji wynosił ponad 6 lat a średni ubytek nerwu 3,6 cm. Większość pacjentów oceniła wynik rekonstrukcji jako dobry (33%) i bardzo dobry (13%), średnie czucie dwupunktowe wyniosło 10,8 mm (6 mm- 17%, 10 mm -12%, 15mm -18%). W zdecydowanej większości przypadków powróciło czucie ochronne i propriocepcja. Analizując czynniki mające wpływ na odległy wynik rekonstrukcji wykazano, że czas od urazu do rekonstrukcji jest głównym czynnikiem determinującym dobry wynik rekonstrukcji. Poza tym uzyskane wyniki potwierdziły wysoką skuteczność tej metody w przywracaniu czucia po uszkodzeniu nerwów i potwierdziły, że rekonstrukcja nerwu przeszczepem nerwu jest nadal złotym standardem w leczeniu ubytków nerwów. Wyniki tej pracy oraz stosowanie tej metody rekonstrukcji nerwów w praktyce skłoniły mnie do poszukiwań alternatywy dla przeszczepu nerwu, którego pobranie skutkowało nieodwracalnymi zaburzeniami czucia w miejscu z którego nerw był pobierany, w tym przypadku w obrębie grzbietowej części stopy. Stało się to bodźcem do napisania wniosku na grant naukowy dotyczący wytworzenia przewodnika nerwu. Ówczesna znajomość podstaw inżynierii tkankowej, jej osiągnięć oraz dotychczasowa współpraca z Zakładem Medycyny Regeneracyjnej NIO-PIB oraz Wydziałem Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej doprowadziły w krótkim czasie do napisania wniosku a następnie realizowania grantu Nano4Nerve - „Wielofunkcyjne kompozytowe biomateriały nanowłókniste dla inżynierii obwodowej tkanki nerwowej” (NCN 2013/11/B/ST8/03401) (**punkt 6.2/2**) w którym na modelu szczurzym oceniałem opracowany prototyp przewodnika nerwu co zostało szerzej omówione w **punkcie 4.2. (publikacja 6 i 7).**

Kolejne prace kliniczne dotyczyły leczenia wad wrodzonych i nabytych powiek górnych oraz rozszczepu wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia.

Dębski T, Jethon J, Pietruski P, Radzikowska E. Podwieszenie powiek górnych na paskach powiezi szerokiej uda-ocena późnych wyników [Frontalis suspension using autogenous fascia lata--evaluation of long-term outcome]. Klin Oczna. 2012;114(3):198-203. Polish. PMID: 23373401. (publikacja 14)

IF=0; punkty MNiSW = 6

W powyższej pracy oceniałem wyniki leczenia wrodzonego i nabytego opadania powiek przy pomocy podwieszenia tarczki powieki górnej na pasku powiezi szerokiej uda mocowanym do mięśnia czołowego. Ta metoda rekonstrukcji stosowana jest w skrajnie ciężkich przypadkach opadania powiek, gdy funkcja mięśnia dźwigacza powieki jest mniejsza niż 4 mm a opadanie przekracza poziom równika źrenicy. W pracy oceniłem wyniki leczenia tą metodą u 41 pacjentów z opadaniem powiek. Czas obserwacji wyniósł 55 miesięcy a w trakcie badania kontrolnego przy pomocy programu komputerowego oceniano na zdjęciach położenie brzegu powieki względem obróbki rogówki. Dodatkowo oceniałem też aspekt estetyczny operacji (kontur i symetria powieki, kresa zgięciowa) oraz satysfakcję pacjenta i poprawę jakości życia. Bardzo dobry wynik operacji stwierdziłem u 36% pacjentów, zadowolający u 59% a zły tylko u 4,7 % pacjentów. U większości efekt estetyczny był bardzo dobry i prawie wszyscy (98%) ocenili wynik operacji bardzo dobrze ze znaczną poprawą jakości życia. Wznowa opadania wystąpiła u 4,6% pacjentów. Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność tej metody w leczeniu ciężkiego opadania powiek nawet w długim okresie obserwacji. Jej wadą jest konieczność pobrania pasków powiezi szerokiej z uda co wobec stosowanych od niedawna sztucznych materiałów czynią tą metodę mniej atrakcyjną. Obecnie trudno jest jednoznacznie ocenić czy wprowadzane jako alternatywa dla powiezi sztuczne materiały będą miały równie korzystne odległe wyniki i czy będą równie wytrzymałe i biozgodne. W związku z tym powyższa publikacja może być pomocna w ocenie porównawczej nowych materiałów.

Kolejne dwie prace dotyczyły istotnego zagadnienia leczenia rozszczepu wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia – jednej z najczęściej występujących wad wrodzonych twarzoczaszki.

Dębski T, Jethon J, Pietruski P, Radzikowska E. Korekcja zniekształcenia wargi po zeszyściu obustronnego rozszczepu wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia - ocena wyników leczenia [Correction of secondary bilateral cleft lip deformity - outcome evaluation]. Pol Merkur Lekarski. 2013 Jan;34(199):33-6. Polish. PMID: 23488282. **(publikacja 15)**

(IF=0; punkty MNiSW = 7)

W pracy tej ocenilem wyniki korekcji zniekształcenia „gwiżdżącego” powstałego po zeszyściu obustronnego rozszczepu wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia. Korekcję wykonywano techniką Skoog’a polegającą na mobilizacji i zeszyściu mięśnia okrężnego ust z następowym zamknięciem czerwieni wargowej plastyką V-Y. Wszyscy pacjenci byli operowani przez tego samego operatora. Wynik estetyczny został oceniony przez pacjentów jak i przez trzech niezależnych chirurgów plastyków. Przed- i pooperacyjna szerokość czerwieni wargowej w największym miejscu została obliczona na podstawie analizy cyfrowej zdjęć. Dodatkowo odnotowywano możliwe powikłania, przypadki bólu wargi i mikrostomii, a także problemy z mową lub uśmiechaniem się oraz wysychanie przemieszczonej śluzówki.

Pacjenci najlepiej ocenili ogólny wygląd wargi, symetrię i jej wypełnienie. Zespół ekspertów natomiast najlepiej ocenił symetrię i ogólny wygląd wargi. Cyfrowa analiza zdjęć wykazała zwiększenie szerokości czerwieni wargowej po operacji od 34 do 142% (średnio o 71,5%). Poza akceptowalnym wysychaniem przemieszczonej śluzówki nie odnotowano żadnych powikłań. Oceniona w tej pracy metoda korekcji zniekształcenia gwiżdżącego jest prostą i skuteczną metodą chirurgiczną odtwarzającą nie tylko funkcję wargi poprzez odtworzenie ciągłości mięśnia okrężnego ust, ale także pozwala ona na poprawę estetyki wargi. Z tego względu powinna być stosowana jako metoda z wyboru w leczeniu tego typu zniekształceń. Jej uzupełnieniem mogą być wykonywane w kolejnych etapach zabiegi przeszczepu tkanki tłuszczowej czy korygowanie drobnych asymetrii czerwieni wargowej przy pomocy kwasu hialuronowego.

Pietruski P, Majak M, Dębski T, Antoszewski B. A novel computer system for the evaluation of nasolabial morphology, symmetry and aesthetics after cleft lip and palate treatment. Part 1: General concept and validation. J Craniomaxillofac Surg. 2017 Apr;45(4):491-504. doi: 10.1016/j.jcms.2017.01.024. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28238558. **(publikacja 16)**

IF=1,96; punkty MNiSW = 35

Powyższa praca jest pracą wielośrodkową, której celem było opracowanie nowatorskiego programu do analizy wyników leczenia rozszczepów wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia. Tocząca się od dekad dyskusja nad przewagą różnych technik stosowanych w leczeniu tej wady nie miała pokrycia w obiektywnych danych. Wszystkie dotychczasowe oceny wyników polegały bowiem na subiektywnej ocenie samych badaczy lub reprezentatywnych chirurgów oceniających randomizowane fotografie pacjentów. Nie uwzględniały także stanu wyjściowego operowanej okolicy. Dlatego we współpracy z inżynierami z Wydziału Informatyki i Telekomunikacji Politechniki Wrocławskiej a także z Kliniką Chirurgii Plastycznej w Łodzi opracowano program komputerowy AID (Analyse It Doc) służący do oceny antropometrycznej okolicy nosowo-wargowej pacjentów poroższczepowych. System ten został zwalidowany z powszechnie stosowanymi programami do

analizy takimi jak Photoshop czy ImageJ. Analiza porównawcza zdjęć pacjentów poroższczepowych wykazała, że jest on 10 krotnie szybszy i dokładniejszy szczególnie w precyzyjnych pomiarach kątowych. Wyniki tej pracy wykazały, że opracowany program jest szybkim, tanim i powtarzalnym narzędziem do badań porównawczych wyników leczenia rozszczepów wargi, wyrostka zębodołowego i podniebienia. Znalazł on zastosowanie także w ocenie okolicy nosowo-wargowej u pacjentów zdrowych poddawanych np. zabiegom estetycznym.

5.3. Nowotwory skóry

Kolejnym obszarem zainteresowań w pracy klinicznej były nowotwory skóry a szczególnie najczęściej występujący u człowieka rak podstawnokomórkowy skóry (basal cell carcinoma). W mojej codziennej praktyce klinicznej w szpitalu spotykałem się często z tym rodzajem nowotworu ponieważ złotym standardem jego leczenia jest leczenie chirurgiczne. Odbywa się ono głównie w ramach oddziałów chirurgii plastycznej i rekonstrukcyjnej ze względu na jego najczęstszą lokalizację w obrębie twarzy i związaną z tym specyfiką postępowania jak i ewentualne zastosowanie zaawansowanych technik rekonstrukcyjnych. Nowotwór ten nie jest nowotworem złośliwym i generalnie nie daje przerzutów, leczony jest poza ośrodkami onkologicznymi i nie jest ujmowany w oficjalnych statystykach. Z tego powodu jego znaczenie kliniczne jest często bagatelizowane a informacje na jego temat w podręcznikach zdawkowe. W związku z tym narodziła się potrzeba kompleksowego opracowania tego tematu na podstawie dostępnych danych literaturowych. W efekcie mojej pracy nad tym zagadnieniem powstał cykl 3 artykułów opublikowanych w Postęпах Nauk Medycznych oraz rozdział w anglojęzycznym podręczniku do chirurgii plastycznej „Current Concepts In Plastic Surgery”:

Dębski T, Lembas L, Jethon J. Basal cell carcinoma. Current views. Epidemiology, pathogenesis, clinical features. Postępy Nauk Medycznych; Tom XXII; 09/2009:696-705. (publikacja 17)

IF=0; punkty MNiSW = 6

Dębski T, Lembas L, Jethon J. Basal cell carcinoma. Current views. Diagnostics and treatment. Postępy Nauk Medycznych; Tom XXII; 09/2009:706-713. (publikacja 18)

IF=0; punkty MNiSW = 6

Dębski T, Lembas L, Jethon J. Basal cell carcinoma. Current views. Surgical treatment. Postępy Nauk Medycznych; Tom XXII; 09/2009:714-724. (publikacja 19)

IF=0; punkty MNiSW = 6

Dębski T., Lembas L., Jethon J.: Basal Cell Carcinoma. Rozdział w książce Current Concepts in Plastic Surgery pod redakcją F. Agullo; 2012, Intech, rozdział 2, str. 13-48; ISBN 978-953-51-6930-7, DOI: 10.5772/27529 (publikacja 20)

IF=0; punkty MNiSW = 0 (rozdział w podręczniku)

W ramach przedstawionych wyżej artykułów w sposób kompleksowy przedstawiłem ówczesne zagadnienia dotyczące epidemiologii, patogenezy, przebiegu klinicznego, diagnostyki i leczenia raka podstawnokomórkowego skóry ze szczególnym uwzględnieniem leczenia chirurgicznego. Dokładnie omówiłem także wskazania do leczenia chirurgicznego, proponowane marginesy usuwania zmian, metodę Mohsa oraz sposób postępowania w przypadku wznowy i po nieradykalnym usunięciu zmiany. Brak konsensusu w zakresie tego ostatniego zagadnienia i liczne często sprzeczne publikacje na ten temat skłoniły mnie do opracowania koncepcji badania i zaprojektowania na materiale własnym Kliniki retrospektywnej pracy odpowiadającej na pytanie o to

czy wycinanie blizny po nieradykalnym wycięciu zmiany nowotworowej jest uzasadnionym postępowaniem. Odpowiedź na to pytanie znalazła się w poniższej publikacji.

Miszczuk J, Charytonowicz M, **Dębski T**, Noszczyk B. Incomplete excision of basal cell carcinoma (BCC) in the head and neck region: to wait, or not to wait? *Postepy Dermatol Alergol.* 2017 Dec;34(6):607-611. doi: 10.5114/ada.2017.72467. Epub 2017 Dec 31. PMID: 29422827; PMCID: PMC5799764. **(publikacja 21)**

IF=1,471; punkty MNiSW = 15

W pracy tej przeanalizowano 156 przypadków nieradykalnego usunięcia raka podstawnkomórkowego z rejonu głowy i szyi. Średni okres obserwacji wynosił 25 miesięcy. Wznowa wystąpiła u 46% pacjentów a czynnikami związanymi z największym ryzykiem jej wystąpienia (RR- relative risk) była lokalizacja w obrębie owłosionej skóry głowy (RR-2,27), średnica zmiany większa niż 2 cm (RR-1,21), twardzinopodobny typ histopatologiczny (RR-1,67), wznowa (RR-1,88) i nieradykalność w zakresie bocznego marginesu zmiany (RR-1,24). Średni czas od usunięcia zmiany do wystąpienia wznowy wyniósł 20 miesięcy a ponad 85% wznów wystąpiła w okresie 3 lat od usunięcia zmiany. Wnioski płynące z tej pracy potwierdzają, że obserwacja pacjentów w przypadku nieradykalnego usunięcia zmiany jest uzasadnionym postępowaniem, ponieważ w naszym materiale u mniej niż połowy pacjentów doszło do wznowy. Czynniki ryzyka scharakteryzowane w naszej pracy wskazują na przypadki wymagające baczniejszej obserwacji z częstszymi wizytami kontrolnymi (np. co 3 miesiące) przynajmniej w ciągu pierwszych 3 lat od operacji ponieważ w tym okresie doszło do wznowy aż u 85% pacjentów (1 rok – 42%, 2 rok – 26%, 3 rok – 17%).

Kolejnym rozwinięciem tematu raka podstawnkomórkowego skóry był opis przypadku zespołu Gorlina Goltza – rzadkiej wady wrodzonej charakteryzującej się min. większą niż przeciętna skłonnością do występowania tego typu nowotworu.

Dębski T, Jethon J. Zespół Gorlina-Goltza--opis przypadku [Gorlin-Goltz syndrome--a case report]. *Pol Merkur Lekarski.* 2010 Jun;28(168):466-9. Polish. PMID: 20642106. **(publikacja 22)**

IF=0; punkty MNiSW = 6

Zespół Gorlina-Goltza (ZGG), czyli zespół znamionowych nabłoniaków podstawnkomórkowych, jest spowodowany mutacją w obrębie chromosomu 9 i jest dziedziczony autosomalnie dominująco. Poza zwiększoną predyspozycją do występowania raka podstawnkomórkowego skóry cechuje się występowaniem wielonarządowych anomalii. Spośród nich najczęściej opisuje się rogowaciejące torbiele szczęki i żuchwy, dołki na powierzchni grzbietowej lub dłoniowej ręki, zwapnienia w sierpie mózgu, makrocefalię i anomalie żeber i kręgów. W pracy przedstawiono przypadek 36-letniego pacjenta przyjętego do Kliniki Chirurgii Plastycznej CMKP z powodu licznych raków podstawnkomórkowych skóry. Uprzednio pacjent leczony był ortopedycznie, neurologicznie, dermatologicznie, stomatologicznie oraz chirurgicznie z powodu poszczególnych anomalii charakterystycznych dla tego zespołu. Dokładne zebranie wywiadu oraz rozszerzenie diagnostyki umożliwiło rozpoznanie ZGG i wdrożenie właściwego leczenia. W pracy przedstawiono też przegląd współczesnych metod leczenia pacjentów z ZGG. Wnioski płynące z tej pracy podkreślają fakt, że Zespół Gorlina-Goltza jest problemem multidyscyplinarnym a powszechna znajomość jego charakterystycznych cech może znacznie przyspieszyć rozpoznanie i wdrożenie właściwego leczenia, co spowalnia postęp choroby.

Kolejna praca dotyczy nie tylko raka podstawnokomórkowego ale wszystkich nowotworów. Powstała ona w ramach projektu Mentor Eye „Opracowanie polskiego komplementarnego systemu molekularnej nawigacji chirurgicznej dla potrzeb leczenia nowotworów” (STATEGMED1/233624/4/NCBR/2014)(**punkt 6.2./3**) i omawia współczesne aspekty działalności biobanków, które w ostatnim czasie stają się dodatkowym orężem wspomagającym diagnostykę i leczenie nowotworów.

Paskal W, Paskal AM, **Dębski T**, Gryziak M, Jaworowski J. Aspects of Modern Biobank Activity - Comprehensive Review. *Pathol Oncol Res.* 2018 Oct;24(4):771-785. doi: 10.1007/s12253-018-0418-4. Epub 2018 May 5. PMID: 29728978; PMCID: PMC6132819. (**publikacja 23**)

IF=2,433; punkty MNiSW = 20

W pracy omówiono współczesne definicje biobanku, który jest miejscem przechowywania tkanek ludzkich i związanych z nimi danych genetycznych i epidemiologiczno-klinicznych dla celów naukowych. Przedstawiono także podział biobanków na populacyjne, zorientowane na daną jednostkę chorobową oraz biobanki gromadzące tkanki nowotworowe. Omówiono sposób dostarczania i magazynowania pobieranych tkanek oraz aspekty prawne i etyczne funkcjonowania biobanków w Europie. Połączenie tak dużej ilości gromadzonych tkanek z danymi klinicznymi pacjentów, od których one pochodzą wymaga zaawansowanych i uniwersalnych systemów informatycznych, których założenia i przykłady również przedyskutowano. W końcu przedstawiono także współczesną rolę biobanków w diagnostyce i leczeniu chorób a także ich znaczenie dla rozwoju medycyny spersonalizowanej, której dalszy rozwój pozwoli na skuteczniejsze leczenie nie tylko nowotworów ale także innych chorób cywilizacyjnych. Dla przykładu zgromadzone w biobankach duże ilości próbek z DNA pacjentów chorych na dane schorzenie mogą zostać porównane z grupą kontrolną co pozwala na wyłonienie mutacji genu odpowiedzialnego za daną chorobę. Określenie roli tego genu i przeprowadzenie szerokich badań molekularnych pozwoli odkryć np. jakie białko on koduje a to z kolei da podstawę do opracowania skutecznej metody diagnostycznej i leczniczej. Pozwoli to także na opracowanie wskazań do spersonalizowanej terapii odkrytym lekiem, która będzie skuteczna tylko dla pacjentów ze ściśle określonym profilem genetycznym. Określenie takiego specyficznego profilu genetycznego pacjenta, który będzie najlepiej reagował na dane leczenie jest możliwe właśnie dzięki zgromadzonemu w biobankach materiałowi genetycznemu. Reasumując, intensywny rozwój biobanków we wszystkich krajach, międzynarodowa współpraca i wymiana dużej ilości danych pomiędzy nimi otwiera przed naukowcami, klinicystami i firmami farmaceutycznymi nowe możliwości szybszego, bardziej efektywnego i tańszego przeprowadzania badań naukowych, co pośrednio przełoży się na znaczną poprawę diagnostyki i leczenia chorób cywilizacyjnych.

5.4. Podsumowanie opisanego dorobku naukowego (analiza bibliometryczna)

Reasumując moje osiągnięcia naukowo-badawcze, po wyłączeniu 7 prac oryginalnych będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego nauk medycznych (**IF= 31,6, punkty MNiSW = 660**) mój dorobek naukowy obejmuje dodatkowo 16 publikacji (**IF = 16,4, punkty MNiSW = 295**) w tym: 8 prac oryginalnych, 6 prac poglądowych, 1 rozdział w podręczniku, 1 opis przypadku.

Uzupełnieniem wyżej wymienionego dorobku są badania przedstawiane na **49 wystąpieniach zjazdowych** o zasięgu krajowym (22 wystąpienia) i międzynarodowym (27 wystąpienia). Lista wystąpień zjazdowych **w załączniku 2.**

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych mój łączny IF wynosił **5,72** natomiast punktacja **MNiSW – 155 pkt.** Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych łączny IF wynosi **42,28** natomiast punktacja **MNiSW – 800 pkt.** Mój sumaryczny IF wynosi **48,0** natomiast punktacja **MNiSW – 955 pkt.**

Liczba cytowań prac wynosi 113, a bez autocytowań 109 (wg. danych bibliometrycznych Web of Science na dzień 14.05.2023 r, załącznik 3) oraz 144, natomiast bez autocytowań 141 (wg. danych bibliometrycznych wg bazy Scopus na dzień 14.05.2023, **załącznik 1**)

Mój INDEKS HIRSCHA wynosi: 6 wg Web of Science oraz 7 wg Scopus. (**załącznik 1**)

Podsumowanie działalności naukowo-badawczej przedstawia analiza bibliometryczna z dnia 14.05.2023 r. zamieszczona **w załączniku 1.**

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni wykazywałem się podczas mojej równoległej pracy w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej w NIO-PIB w Warszawie i w Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP w Warszawie. Dodatkowo nawiązałem liczne współprace naukowe krajowe i zagraniczne w ramach realizacji projektów naukowych, indywidualnej współpracy naukowej czy staży zagranicznych.

6.1. Projekty naukowe

1. Bio-implant - „Bioimplanty dla potrzeb leczenia ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych” (POIG.01.01.02-00-022/09)

Projekt finansowany ze środków Unii Europejskiej i realizowany przez konsorcjum, w skład którego wchodziły następujące uczelnie: Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie- Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Politechnika Warszawska oraz Politechnika Wrocławska. Celem projektu było opracowanie bioimplantu kości zbudowanego z biokompatybilnego rusztowania wydrukowanego w technologii 3D zasiedlonego komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej. Dodatkowo projekt zakładał opracowanie systemu planowania i przeprowadzania operacji za pomocą nawigacji operacyjnej. Dzięki temu możliwe było zaplanowanie zakresu resekcji guza nowotworowego na podstawie tomografii komputerowej a następnie wydrukowanie rusztowania idealnie pasującego do zaplanowanego ubytku kości. Wykonanie operacji zgodnie z zaplanowanym zakresem resekcji i metodą stabilizacji implantu umożliwiała nawigacja operacyjna, którą dostosowano do potrzeb projektu. W ramach tego projektu odpowiedzialny byłem za rozwijanie koncepcji szybkiego unaczyniania opracowanego implantu a także przeprowadzałem i nadzorowałem prace nad badaniami implantu *in vivo* na małych zwierzętach. W ramach projektu współpracowałem z następującymi instytucjami naukowymi:

- Zakład Genetyki przy Narodowym Instytucie Onkologicznym im. Marii Skłodowskiej-Curie- Państwowy Instytut Badawczy, Pracownia Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych (dr Marta Gajewska) – przeprowadzanie operacji i realizacja badań na małych zwierzętach.
- Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej (prof. Wojciech Świąszkowski) – projektowanie i drukowanie rusztowań polimerowych oraz ich obrazowanie.

- Katedra i Zakład Histologii i Embriologii – Pracownia Inżynierii Tkankowej, Laboratorium Badawcze Banku Komórek WUM (prof. Małgorzata Lewandowska-Szumieł) – współpraca w opracowaniu metod zasiedlania rusztowań i pozyskiwania komórek macierzystych.
- Wydział Informatyki i Telekomunikacji Politechniki Wrocławskiej (dr Marcin Majak) – opracowanie systemu planowania, przeprowadzania operacji i oceny wyników (AID)
- Zakład Patomorfologii przy Szpitalu w SPSK im. prof. W. Orłowskiego CMKP w Warszawie (dr Jarosław Wejman i Michał Pyzlak) - opracowanie metody histopatologicznej oceny rusztowań polimerowych.
- Zakład Transplantologii i Centralny Bank Tkanek przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (prof. Artur Kamiński i dr n.med. Grzegorz Gut) – porównanie komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej pochodzącej od małych i średnich zwierząt (mysz, szczur, królik).

2. Nano4Nerve - „Wielofunkcyjne kompozytowe biomateriały nanowłókniste dla inżynierii obwodowej tkanki nerwowej” (NCN 2013/11/B/ST8/03401)

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki i realizowany przez Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie oraz Politechnikę Warszawską. Celem projektu było opracowanie polimerowego rusztowania spełniającego funkcję przewodnika (conduitu) nerwu. Innowacyjność tego projektu polegała na wytwarzaniu przewodnika techniką elektroprzędzenia włókien polimerowych, dołączeniu do struktury włókien czynników wzrostu i różnicowania aktywnie uwalnianych w trakcie resorpcji przewodnika oraz zastosowaniu materiału elektroprzewodzącego, umożliwiającego elektrostymulację przewodnika. W ramach tego projektu byłem odpowiedzialny za nadzór i przeprowadzenie badań *in vivo*. Byłem także autorem koncepcji badania i współautorem tego projektu. Współpraca w ramach tego projektu dotyczyła następujących instytucji naukowych:

- Zakład Genetyki przy Narodowym Instytucie Onkologicznym im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Pracownia Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych (dr Marta Gajewska) – przeprowadzanie operacji i realizacja badań na małych zwierzętach.
- Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej (prof. Wojciech Świąszkowski) – projektowanie i wytwarzanie przewodnika nerwu.
- Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT przy Politechnice Warszawskiej (dr Ewa Kijeńska-Gawrońska) – koncepcja, projektowanie i wytwarzanie przewodnika nerwu.
- Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego Laboratorium Metodologii Badań Naukowych i Laboratorium Histologii i Embriologii – (prof. Paweł Włodarski, dr Witor Paskal) – analiza morfometryczna przekrojów poprzecznych przewodników pozyskanych w ramach badań *in vivo*.

3. Mentor Eye - „Opracowanie polskiego komplementarnego systemu molekularnej nawigacji chirurgicznej dla potrzeb leczenia nowotworów” (STATEGMED1/233624/4/NCBR/2014)

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju i realizowany przez Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Politechnikę Warszawską i Politechnikę Wrocławską. Celem projektu było opracowanie nowego systemu nawigacji chirurgicznej do śródoperacyjnej, precyzyjnej identyfikacji zmiany nowotworowej i jej radykalnej resekcji. Dzięki zastosowaniu swoistych nowotworowo wektorów rAAV i fluorescencji wszystkich komórek

nowotworowych możliwe było dokładne zobrazowanie rozległości ogniska nowotworowego w czasie rzeczywistym przy pomocy techniki rozszerzonej rzeczywistości. Jednym z elementów tego projektu było stworzenie biobanku tkanek nowotworowych, potrzebnych do opracowania swoistych wektorów rAAV. Mój udział w tym projekcie obejmował nadzór nad zorganizowaniem od podstaw tego biobanku wraz z jego podstawami prawnymi, logistycznymi i merytorycznymi. Współpraca w tym zakresie obejmowała następujące instytucje:

- Centrum Badań Przedklinicznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego Laboratorium Metodologii Badań Naukowych i Laboratorium Histologii i Embriologii (prof. Paweł Włodarski, dr Witor Paskal) - opracowanie podstaw merytorycznych biobanku.
- Zakład Farmacji Stosowanej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (prof. Maciej Małecki, dr Wiktor Paskal) – opracowanie zagadnień logistycznych związanych z prowadzeniem biobanku.

4. Hybrydowe systemy dostarczania czynników wzrostu wspomagające procesy regeneracji tkanki kostnej (NCN 2011/01/M/ST8/07742 POLON)

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki i realizowany przez Politechnikę Warszawską we współpracy z Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università & Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro w Genui i Dipartimento S.A.I.F.E.T. Università Politecnica delle Marche w Anconie. Ten międzynarodowy projekt był częścią szerszego programu badawczego realizowanego w ramach Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (COST) opisanego w MoU Akcji COST MP1005 zatytułowanej: *From nano to macro biomaterials (design, processing, characterization, modeling) and applications to stem cells regenerative orthopaedic and dental medicine (NAMABIO)*. Głównym celem tej akcji było przygotowanie strategii i metod leczenia urazów tkanki kostnej z zastosowaniem medycyny regeneracyjnej.

W ramach projektu opracowano specjalne maty naśladujące strukturę i funkcję macierzy pozakomórkowej poprzez dostarczanie w miejscu implantacji różnych czynników wzrostu i różnicowania w celu wspomagania procesu regeneracji tkanki kostnej. Maty zbudowane były z wytworzonych metodą elektroprzędzenia biodegradowalnych włókien polimerowych typu core-shell w których otoczka (shell) zbudowana z jednego polimeru stanowiła barierę (membranę), kontrolującą kinetykę uwalniania czynników wzrostu (BMP2, VEGF) związanych z drugim polimerem stanowiącym rdzeń (core) materiału. Dawka, kinetyka uwalniania i sekwencyjność uwalniania czynników obecnych w rdzeniu była kontrolowana poprzez budowę i biodegradację samych nanowłókien i tworzących je polimerów. Opracowany w ramach tego projektu złożony hybrydowy system pozwolił na dostarczanie jednocześnie czynników kościotwórczych i naczyńotwórczych w miejscu regeneracji kości co jest kluczowe dla prawidłowego kościotworzenia. Mój udział w tym projekcie polegał na opracowaniu techniki operacyjnej domięśniowego wszczepiania mat i wykonaniu kompleksowych badań *in vivo* na modelu zwierzęcym (model szczurzy). Współpraca w ramach tego projektu dotyczyła następujących instytucji:

- Wydział Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej (prof. Wojciech Świąszkowski) – projektowanie i wytwarzanie hybrydowych kompozytowych mat uwalniających czynniki wzrostu i różnicowania

- Dipartimento di Oncologia, Biologia e Genetica, Università & Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro in Genui (Prof. Ranieri Cancedda) – projektowanie i wytwarzanie hybrydowych kompozytowych mat uwalniających czynniki wzrostu i różnicowania
 - Dipartimento S.A.I.F.E.T. Università Politecnica delle Marche w Anconie (prof. Franco Rustichelli) - projektowanie i wytwarzanie hybrydowych kompozytowych mat uwalniających czynniki wzrostu i różnicowania
5. Dodatkowo brałem udział w pisaniu wniosków i konsultowałem naukowo dwa projekty:
- a. **iTE – „Metoda leczenia dużych ubytków tkanki kostnej u chorych onkologicznych z wykorzystaniem inżynierii tkankowej in vivo”**
(STRATEGMED3/306888/3/NCBR/2017)
 - b. **ABCtherapy - „Potencjał terapeutyczny mezenchymalnych komórek macierzystych testowany w próbach klinicznych oraz in vitro - uzasadnienie dla bankowania scharakteryzowanych komórek”** (STRATEGMED2/267976/13/NCBR/2015)

6.2. Indywidualna współpraca naukowa

1. **Klinika Chirurgii Plastycznej, Rekonstrukcyjnej i Estetycznej – Uniwersytet Medyczny w Łodzi (prof. Bogusław Antoszewski)** - opracowanie i walidacja systemu AID w ramach pracy *„A novel computer system for the evaluation of nasolabial morphology, symmetry and aesthetics after cleft lip and palate treatment. Part 1: General concept and validation”*.
2. **Klinika Ortopedii, Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej CMKP w Otwocku, Oddział Replantacyjno-Rekonstrukcyjny (dr hab. n.med Marcin Złotorowicz)** – ocena późnych wyników rekonstrukcji nerwów dłoniowych palców przy użyciu przeszczepu nerwu łokciowego w ramach pracy *„Long-term sensibility outcomes of secondary digital nerve reconstruction with sural nerve autografts: a retrospective study”*.
3. **Zakład Anatomii Prawidłowej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (prof. Bogdan Cisek)** – badanie przebiegu nerwu twarzowego i jego relacja do przewodu wyprowadzającego ślininki przedusznej w ramach pracy *„An anatomical study on the relationship between the facial nerve and parotid duct in human fetuses”*.
4. **Instytut Metrologii i Inżynierii Biomedycznej Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej (dr Szymon Cygan)** - badania nad zastosowaniem USG w diagnostyce zespołu kanału nadgarstka w ramach pracy *„Gęstość nerwu jako nowy parametr w diagnostyce ultrasonograficznej zespołu kanału nadgarstka – doniesienie wstępne”*.

6.3. Zagraniczne staże naukowe

1. **Staż w Klinice Chirurgii Plastycznej, Chirurgii Ręki i Centrum Leczenia Oparzeń, Uniwersytet RWTH, Aachen, Niemcy. (06.10. -19.12.2014r.)**
Klinika w której odbywałem staż jest pierwszą w Europie Kliniką Chirurgii Plastycznej posiadającą własne laboratorium inżynierii tkankowej oraz dzięki przynależności do kampusu Politechniki RWTH także dostęp do jej licznych Zakładów jak np. Zakładu Inżynierii Materiałowej. Dzięki temu miałem możliwość obserwowania jak w praktyce wygląda kompleksowe prowadzenie badań nad zastosowaniem inżynierii tkankowej w chirurgii plastycznej, wprowadzanie nowych terapii wykorzystujących komórki macierzyste czy praca nad różnymi rodzajami rusztowaniami. Kierownik Kliniki – prof. Norbert Pallua jest nie tylko

chirurgiem plastykiem, ale także cenionym autorytetem w dziedzinie inżynierii tkankowej oraz autorem pierwszego podręcznika opisującego jej zastosowanie w klinice („*Tissue Engineering: from Lab to Clinic*”)[1]. Mój 3 -miesięczny staż pod jego kierunkiem pozwolił mi poszerzyć wiedzę na temat zastosowań inżynierii tkankowej w chirurgii plastycznej oraz nabyć doświadczenie w planowaniu i przeprowadzaniu badań pod kątem ich późniejszego zastosowania w klinice, co wykorzystałem min. w planowaniu badań nad przewodnikiem nerwu (**punkt 6.1./2**).

2. Staże w niemieckich ośrodkach naukowych - stypendium DAAD (01.07. – 31.08.2005 r.):

- a. Instytut Biochemii, Klinika Charite Uniwersytetu Humboldtów w Berlinie,
- b. Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Heinrich-Heine w Düsseldorfie,
- c. Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Bonn.

W trakcie tych staży poszerzałem moją wiedzę i zdobywałem doświadczenie z zakresu biochemii i biologii molekularnej.

3. Staż/wolontariat w Klinice Medycyny Tropikalnej, Szpital Uniwersytecki w Zagazig, Egipt w ramach stypendium IFMSA (01.07. -31.08.2004 r.)

W trakcie stażu/wolontariatu w ramach programu „*Evaluation of upper gastrointestinal bleeding in Egyptian patients*” zajmowałem się epidemiologią i leczeniem krwawień z górnego odcinka przewodu pokarmowego u pacjentów w Egipcie.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

7.1. Osiągnięcia dydaktyczne

1. Asystent naukowo-dydaktyczny Kliniki Chirurgii Plastycznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie (2010-2016r.).

a) Kursy specjalizacyjne (12 kursów w roku akademickim):

W ramach pensum (240 godzin dydaktycznych rocznie) prowadziłem wykłady dla lekarzy w trakcie specjalizacji na następujących kursach:

- Chirurgia plastyczna i rekonstrukcyjna oraz podstawy mikrochirurgii – kurs dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii ogólnej i urologii (6 kursów w roku akademickim)
- Chirurgia ręki i chirurgia rekonstrukcyjna – kurs dla lekarzy specjalizujących się w ortopedii i traumatologii narządów ruchu
- Wprowadzenie do specjalizacji w chirurgii plastycznej – część I – kurs dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii plastycznej
- Wprowadzenie do specjalizacji w chirurgii plastycznej – część II – kurs dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii plastycznej
- Chirurgia Estetyczna – kurs dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii plastycznej
- Chirurgia ręki i mikrochirurgia – kurs dla lekarzy specjalizujących się w chirurgii plastycznej

Tematy moich wykładów obejmowały następujące zagadnienia: nowotwory skóry, blizny i przykurcze bliznowate, plastyki miejscowe, obrzęk limfatyczny, wady wrodzone powiek, uszkodzenia popromienne tkanek.

b) Staże indywidualne specjalistyczne (3 staże w roku akademickim)

W trakcie pracy w Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP opiekowałem się i nadzorowałem staż cząstkowy lekarzy specjalizujących się w otorynolaryngologii, chirurgii plastycznej, chirurgii stomatologicznej, ortodoncji, chirurgii szczękowo-twarzowej, ortopedii i traumatologii.

c) Opiekun studenckiego koła naukowego (9 spotkań rocznie)

W latach 2010 – 2016 r. zorganizowałem i prowadziłem studenckie koło naukowe działające przy Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP. W ramach działalności koła naukowego raz w miesiącu organizowałem spotkania koła składające się z części merytorycznej (wykładu) oraz części praktycznej (kurs szycia, kurs plastyk miejscowych). Ponadto wraz ze studentami koła rozwijaliśmy działalność naukową obejmującą pisanie prac naukowych i przedstawianie ich na Międzynarodowych Kongresach Naukowych Studentów Medycyny i Młodych Lekarzy organizowanych przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Tematyka prac naukowych obejmowała następujące zagadnienia: leczenie wrodzonego opadania powiek, rekonstrukcje małżowin usznych, rekonstrukcje wargi, rekonstrukcje piersi, leczenie nowotworów skóry, leczenie odleżyn, leczenie palczozrostów, korekcje zniekształcenia gwiżdżącego wargi czy zastosowanie płata Limberga w chirurgii plastycznej. Pracą „Chirurgiczne leczenie raka podstawnokomórkowego skóry w rejonie wargi – analiza czynników prognostycznych” studenci koła zdobyli pierwszą nagrodę w sesji chirurgicznej Międzynarodowego Kongresu Naukowego Studentów Medycyny i Młodych Lekarzy w 2011 roku a wykład „Rak piersi i diagnostyka i postępowanie” został uznany za najlepszą pracę (pierwsza nagroda) w ramach „XIV Czwartku chirurgicznego” Studenckiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej (2011 r.) - cyklicznych spotkań chirurgicznych organizowanych w ramach Klinik Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W wielu moich ówczesnych studentach udało mi rozbudzić pasję do chirurgii plastycznej. Kilku z nich jest już obecnie aktywnymi zawodowo chirurgami plastykami (dr hab. Piotr Pietruski, dr Maria Molska, dr Ewa Woźniak-Roszkowska, dr Zofia Bochen, dr Maciej Mazurek, dr Jakub Miszczyk, dr Wiktor Paskal).

2. Wykładowca Centrum Kształcenia Podyplomowego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na kierunku Medycyna Estetyczna (2010 -2014 r.)

Prowadziłem wykłady (4 wykłady w roku akademickim) dla lekarzy w ramach studiów podyplomowych z zakresu medycyny estetycznej. Tematy wykładów obejmowały: zastosowanie nici liftingujących, liposukcję, operacje estetyczne twarzy.

3. Wykładowca Polskiej Akademii Mikrochirurgii (2014-2016 r.)

Byłem instruktorem i wykładowcą kursu dla lekarzy z zakresu mikrochirurgii organizowanego przez Centrum Edukacji Medycznej w Warszawie. Tematyka moich wykładów obejmowała zagadnienia dotyczące procedur ratujących płaty chirurgiczne po mikrozespoleniach oraz podstawy mikrochirurgii. Poza wykładami w ramach tego kursu prowadziłem także warsztaty w trakcie których szkoliłem lekarzy z wykonywania zespołań naczyń i rekonstrukcji nerwów na małym modelu zwierzęcym (królik).

4. Wykładowca na licznych międzynarodowych i ogólnopolskich kongresach z zakresu chirurgii plastycznej.

Na krajowych i międzynarodowych kongresach przedstawiłem łącznie 42 wykłady prezentujące moje osiągnięcia naukowe – wykaz konferencji i abstraktów w **załączniku nr 2**.

5. Szkoleniowiec w ramach programu PROPEL

Program PROPEL (Professional Resource Opportunities in PRS Education and Leadership) organizowany jest przez Amerykańskie Towarzystwo Chirurgii Plastycznej (ASPS) i ma na celu rozwijanie wiedzy i umiejętności z zakresu chirurgii plastycznej na bazie czteroosobowych zespołów, w skład których wchodzi młodszy rezydent, starszy rezydent, młodszy specjalista i starszy specjalista. W ramach zespołów utworzonych zgodnie z obszarem zainteresowań uczestników odbywają się cykliczne spotkania *on-line* w trakcie których prezentowane są wykłady i omawiane trudne przypadki kliniczne. W moim zespole, w którym jestem młodszym specjalistą współpracuję z następującymi chirurgami plastykami:

- Robert A. Hardesty (Imagine Plastic Surgery, Riverside, California, USA) – starszy specjalista,
- Dexter Weeks (University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA) – starszy rezydent,
- Kimberly Fliscella (Albany Medical Center, Albany, New York, USA) – młodszy rezydent.

6. Autor rozdziału „Basal Cell Carcinoma” w podręczniku do Chirurgii Plastycznej pt. „Current Concepts In Plastic Surgery” (ISBN 978-953-307-1036-3, InTech,; 213-48)

Podręcznik przedstawia kompleksowe opracowania nowych trendów w chirurgii plastycznej i adresowany jest do lekarzy specjalizujących się w chirurgii plastycznej. Mój rozdział opisuje kompleksowo epidemiologię, diagnostykę i współczesne metody leczenia raka podstawnokomórkowego skóry.

7.2. Osiągnięcia organizacyjne

1. Kierownik administracyjny kursów specjalizacyjnych organizowanych przez Klinikę Chirurgii Plastycznej CMKP w latach 2010-2016 r. (12 kursów w roku akademickim)

Moim zadaniem była organizacja kursów (lista kursów wymieniona w **punkcie 7.1./1a**), synchronizacja wykładów z zajęciami klinicznymi i dostępnością wykładowców, organizacja zajęć klinicznych, przeprowadzanie ankiet na zakończenie kursu oraz jego zakończenie w formie zaliczenia.

2. Organizacja, stworzenie procedur i wyposażenie stanowiska chirurgicznego wykorzystywanego do przeprowadzania operacji szczurów w ramach programu Bio-implant i Nano4Nerve (punkt 6.1./1 i 2).

Stanowisko to zostało wydzielone w ramach Pracowni Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Narodowych Instytucie Onkologii, Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie we współpracy z dr Martą Gajewską. W trakcie 4 letniej współpracy zoperowałem w ramach tej działalności ponad 200 szczurów u których przeprowadzałem takie procedury jak pobieranie tkanki tłuszczowej do izolacji komórek ASCs, podskórne wszczepianie rusztowań polimerowych (PCL i PCL+TCP+PLGA) wraz z ich prefabrykacją, rekonstrukcje ubytków kości udowej rusztowaniem polimerowym (PCL), rekonstrukcje nerwu kulszowego przy użyciu

przewodnika nerwu. Poza organizacją stanowiska do operacji i operowaniem zorganizowałem także opiekę pooperacyjną dla szczurów zgodną zobowiązującymi standardami oraz nadzorowałem prace mojego zespołu zajmującego się badaniami *in vivo* w ramach wyżej wymienionych projektów.

3. Organizacja biobanku tkanek w ramach programu MentorEye (punkt 6.1./3).

Moja rola w tym projekcie polegała na stworzeniu podstaw prawnych i logistycznych dla działania biobanku tkanek, zaplanowaniu poszczególnych etapów tworzenia biobanku, opracowaniu protokołu transportu, opracowywania i przechowywania materiału tkankowego dla biobanku, opracowaniu podstaw systemu informatycznego biobanku, przygotowaniu dokumentów do uzyskania zgody Komisji Bioetycznej dla prowadzenia biobanku i jego rejestracji, opracowaniu regulaminu wewnętrznego Biobanku oraz wzoru zgody pacjenta na pobranie, przechowywanie i ewentualne wykorzystanie tkanek. Po opracowaniu w/w zagadnień i ułożeniu harmonogramu działań na kolejne lata zmuszony byłem przekazać nadzór nad tym projektem doktorowi Maciejowi Ryszowi, który wraz z moim ówczesnym zespołem (dr Wiktor Paskal, Dr Maciej Gryziak) go kontynuował.

4. Organizacja kursu mikrochirurgicznego w ramach kursów prowadzonych przez Klinikę Chirurgii Plastycznej CMKP.

W trakcie kursu jego uczestnicy mogli przy użyciu wynajętych mikroskopów Zeiss i narzędzi mikrochirurgicznych ćwiczyć zespolenia naczyniowe i nerwowe.

5. Organizacja Studenckiego Koła Naukowego przy Klinice Chirurgii Plastycznej CMKP w 2010 roku.

Koło zostało pierwszy raz formalnie zarejestrowane w 2010 roku w ramach działalności Studenckiego Towarzystwa Naukowego działającego przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym i działa do chwili obecnej.

6. Prace statutowe w ramach Kliniki Chirurgii Plastycznej CMKP

Organizacja finansowania i wykonanie dwóch prac statutowych dotyczących następujących zagadnień: „Ocena wyników leczenia wrodzonego opadnięcia powiek” oraz „Ocena wyników leczenia niedorozwoju małżowiny usznej”

7. Administracja stroną internetową Polskiego Towarzystwa Chirurgii Plastycznej, Rekonstrukcyjnej i Estetycznej w latach 2009-2011.

W czasie mojego aktywnego uczestnictwa w tym Towarzystwie zajmowałem się modernizacją, uaktualnianiem i bieżącą administracją strony internetowej Towarzystwa.

8. Opieka nad biblioteką Kliniki Chirurgii Plastycznej CMKP w latach 2008-2014.

Poza bieżącym prowadzeniem biblioteki zajmowałem się zamawianiem nowych książek i analizą bibliometryczną pracowników Kliniki.

7.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

W trakcie pracy w ramach projektu Bio-Implant i Nano4nerve (**punkt 6.1./1 i 2**) popularyzowałem naukę przybliżając czytelnikom i słuchaczom idee inżynierii tkankowej i

wytwarzania narządów „na zamówienie”. Dodatkowym czynnikiem zwiększającym zasięg popularyzacji nauki był mój udział w ogólnopolskim konkursie „Polacy z Werwą” organizowanym przez Orlen w 2013 roku (I edycja), którego byłem finalistą. W ramach mojego udziału w tym konkursie udzieliłem szeregu wywiadów w czasopismach popularnonaukowych („Medycy z werwą”, Newsweek nr 34/2013, strona 69-70, „21 Polaków z werwą” Newsweek nr 18/2013, strona 73, Natemat – link poniżej), wziąłem udział w nagraniu filmu prezentującego moją pracę naukową, który został wyemitowany w telewizji TVN w ramach cyklu programów poświęconych temu konkursowi, udzieliłem też wywiadu w Polskim Radiu Programie 3. Brałem także czynny udział w Festiwalu Nauki w latach 2011-2013 prezentując ówczesne osiągnięcia projektu Bio-Implant.

Poniżej zamieszczam linki do niektórych artykułów i nagrań:

<https://natemat.pl/104655,chirurg-all-in-one-pracuje-w-trzech-miejscach-na-raz-i-zajmuje-sie-nauka>

<https://trojka.polskieradio.pl/artykul/902216>

<https://www.infodent24.pl/techdentpost/polacy-z-verwa-bioimplant-kosci-z-komerek-macierzystych-w-finale,100065.html>

https://www.infodent24.pl/techdentpost/prefabrykacja-bioimplantu-kluczem-do-leczenia-rozleglych-ubytkow-kostnych,7448_1.html

<https://www.medonet.pl/zdrowie/zdrowie-dla-kazdego,polacy-z-verwa--czyli-mamy-sie-kim-pochwalic,artykul,1683144.html#tomasz-debski-1982-chirurgia-plastyczna-na-najwyzszym-poziomie>

<https://kobieta.onet.pl/zdrowie/zycie-i-zdrowie/polacy-z-verwa-wyjatkowi-ludzie-wyjatkowe-dokonania/6tved>

8. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

8.1. Nagrody i wyróżnienia

- Nagroda główna w konkursie „Najlepszy plakat konferencji PolLasa 2013” w ramach III Ogólnopolskiej Konferencji „Zwierzęta w badaniach naukowych” PolLasa, Warszawa (2013 r.) za cykl prac: „Comparison of ADSC sources from the adipose organ i rat”, „ Induced angiogenesis in PCL Bioactive Scaffolds with a new Prefabrication Method. Experimental study on rats”, „New method of obtaining ADSC in vivo in a rat model”
- Finalista I edycji konkursu „Polacy z Werwą” w kategorii medycyna (2013 r.)
- Wyróżnienie pracy “Angiogenesis in PCL Bioactive Scaffolds with a new Prefabrication Method. Experimental study on rats.” jako jednej z trzech najlepszych prac prezentowanych na International Confederation for Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery (IPRAS) World Congress,Santiago,Chile (2013 r.)
- „Złota Odznaka” Studenckiego Towarzystwa Naukowego Akademii Medycznej w Warszawie za zasługi dla studenckiego ruchu naukowego (2007 r.)
- Pierwsza nagroda w sesji “Otolaryngology and Ophtalmology” za pracę “An anatomical study on the relationship between the facial nerve and parotid duct in human fetuses” prezentowaną na The 3rd International Scientific Congress of Medical Students and Young Doctors, Warsaw (2006 r.)

- Pierwsza nagroda w sesji „Chirurgia - sesja plakatowa” za pracę „*Metody leczenia chirurgicznego choroby Dupuytren’a*” prezentowaną na Ogólnopolskim Kongresie Naukowym Młodych Medyków, Warszawa (2004 r.)
- Nagroda Zarządu Głównego Towarzystwa Chirurgów Polskich za cykl prac poświęconych pierwotnej i wtórnej rekonstrukcji nerwów obwodowych w ramach 2nd International Medical Conference for Students and Young Physicians, Warsaw (2003 r.)

8.2. Recenzje prac naukowych w międzynarodowych czasopismach

- International Journal of Surgery (IF 13,4) – artykuł *IJS-D-22-01840*
- Neural Regeneration Research (IF 5,14) – artykuł *NRR-D-22-00576*
- Plastic and Reconstructive Surgery (IF 4,03) – artykuł *PRS-D-22-02736*
- European Journal of Trauma and Emergency Surgery (IF 2,37) - artykuł *D-20-00705*
- Current Drug Delivery (IF 1,58) – artykuł *BMS-CDD-2022-262*

8.3. Członkostwo w towarzystwach naukowych

- Polskie Towarzystwo Chirurgii Plastycznej, Rekonstrukcyjnej i Estetycznej (PTChPriE)
- International Confederation for Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery (IPRAS)
- European Academy of Facial Plastic Surgery (EAFPS)
- International Society of Plastic Surgeons (ISAPS)
- American Society of Plastic Surgeons (ASPS)
- Rhinoplasty Society of Europe (RSE)
- International Society of Plastic Regenerative Surgeons (ISPRES)

8.4. Wybrane kursy i szkolenia

- 13 IANR (International Association of Neurorestoratology) Meeting and International Conference "Stem cells: therapeutic outlook for nervous system disorders", Warszawa, 2021,
W ramach tego kongresu wygłosiłem wykład na zaproszenie prezentujący wyniki prac nad przewodnikiem nerwu („*Bioactive nanofiber-based conduits in a peripheral nerve gap management- an animal model study*”).
- ISAPS Regenerative Medicine Virtual Symposium, 2021
- Szkolenie w zakresie wymaganych dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywanych w procedurach na podstawie §2 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 maja 2015 r.; Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk, Warszawa, 2016 r.
- Plastic Surgery MasterClass Program on Perforator Flaps, Covidien European Training Centre, Elancourt, Francja, 2010 r.
- Fakultet „Inżynieria tkankowa jako narzędzie rekonstrukcji tkanek”, Zakład Inżynierii Tkankowej Akademii Medycznej w Warszawie, 2006 r.
- Warsztaty z zakresu statystyki medycznej i obsługi programu EpiInfo 3.3; Akademia Medyczna w Warszawie, 2005 r.
- Kurs z zakresu Evidence Based Medicine; Akademia Medyczna w Warszawie, 2005 r.

9. Piśmiennictwo

1. Pallua N, Suschek CV. Tissue Engineering. From Lab to Clinic. (2011). doi:10.1007/9783-642-02824-3.
2. Fung YC. A Proposal to the National Science Foundation for An Engineering Research Center at UCSD, CENTER FOR THE ENGINEERING OF LIVING TISSUES. UCSD#865023 August 23, 2001.
3. Allen Zelman, July 17, 2001; Y.C. Fung, interview, August 23, 2001.
4. Zelman A TEAFNCiHC, internal discussion memo, first draft, Sept. 22, 1987.
5. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science. 1993 May 14;260(5110):920-6.
6. Carvalho JL, Carvalho PH, Gomes DA, Goes AM. Innovative Strategies for Tissue Engineering, Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications, Prof. Rosario Pignatello (Ed.), (2013). ISBN: 978-953-51-1051-4, InTech, DOI: 10.5772/53337.
7. Pojda Z, Machaj E, Kurzyk A, et al. Mesenchymal stem cells. Postepy Biochem. 2013;59(2):187-97.
8. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2005;7(5):393-5.
9. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.
10. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood. 2004 Mar 1;103(5):1669-75.
11. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003;21(1):50-60.
12. Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, et al. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. Exp Neurol. 2003 Aug;182(2):288-99.
13. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. Stem Cells. 2007 Jun;25(6):1384-92.
14. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005 Feb;23(2):220-9.
15. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells. 2007 Feb;25(2):319-31.
16. Karahuseyinoglu S, Kocaefe C, Balci D, et al. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. Stem Cells. 2008 Mar;26(3):682-91.
17. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. Cytotherapy. 2005;7(3):282-91.
18. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. Stem Cells. 2007 Dec;25(12):3234-43.

19. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004 Jul 20;110(3):349-55.
20. Janssen FW, Oostra J, Oorschot A, van Blitterswijk CA. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials*. 2006 Jan;27(3):315-23.
21. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004 Feb 6;94(2):223-9.
22. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292-8.
23. Sumi M, Sata M, Toya N, et al. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci*. 2007 Jan 16;80(6):55965.
24. Santos MI, Reis RL. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*. 2010 Jan 11;10(1):12-27.
25. Karal-Yilmaz O, Serhatli M, Baysal K, et al. Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique. *J Microencapsul*. 2011;28(1):46-54.
26. de Boer R, Knight AM, Spinner RJ, et al. In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Dec 15;95(4):1067-73.
27. d'Angelo I, Garcia-Fuentes M, Parajo Y, et al. Nanoparticles based on PLGA:poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors. *Mol Pharm*. 2010 Oct 4;7(5):1724-33.
28. Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R, et al. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 1991 Sep;12(7):619-26.
29. Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol*. 2003 Nov-Dec;12(6):295-310.
30. Walter M, Liang S, Ghosh S, Hornsby P.J, Li R. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2009 Jul 30;28(30):2745-55.
31. Kim TH, Eltohamy M, Kim M, et al. Therapeutic foam scaffolds incorporating biopolymer-shelled mesoporous nanospheres with growth factors. *Acta Biomater*. 2014 Jun;10(6):2612-21.
32. Seras-Franzoso J, Steurer C, Roldán M, et al. Functionalization of 3D scaffolds with protein-releasing biomaterials for intracellular delivery. *J Control Release*. 2013 Oct 10;171(1):63-72.
33. Liu W. & Cao Y. Application of scaffold materials in tissue reconstruction in immunocompetent mammals: our experience and future requirements, *Biomaterials* 2007 Vol. 28, No. 34, pp. 5078–5086.
34. Sachlos E. & Czernuszka J.T. Making tissue engineering scaffolds work Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 2003 Vol. 5, pp. 29-40, ISSN: 1473-2262.
35. Smith BD, Grande DA, The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Apr;11(4):213-22.

36. Asti A, Gioglio L., Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation. *Int J Artif Organs*. 2014 Mar;37(3):187-205.
37. Park HJ, Min KD, Lee MC, Fabrication of 3D porous SF/ β -TCP hybrid scaffolds for bone tissue reconstruction. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Jul;104(7):1779-87.
38. Amoabediny G, Salehi-Nik N, Hrli B. The Role of Biodegradable Engineered Scaffold in Tissue Engineering. *Biomaterials, Science en Engineering*. InTech Open.
39. Scaffolding In Tissue Engineering. Boca Raton: CRC, 2005. ISBN 1-57444-521-9.
40. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000 Mar;21(5):431-40.
41. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003 Jun 30;5:29-39.
42. Li, D. and Xia, Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Adv. Mater.*, 2004 Jul;16(14): 1151-1170.
43. www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/images/background/TE
44. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):569–76.
45. Klar AS, Zimoch J, Biedermann T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9747010. doi: 10.1155/2017/9747010. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28337463; PMCID: PMC5350314.
46. Cho J, Lee H, Rah W, Chang HJ, Yoon YS. From engineered heart tissue to cardiac organoid. *Theranostics*. 2022 Mar 14;12(6):2758-2772. doi: 10.7150/thno.67661. PMID: 35401829; PMCID: PMC8965483.
47. Wang X, Shi C, Hou X, Song S, Li C, Cao W, Chen W, Li L. Application of biomaterials and tissue engineering in bladder regeneration. *J Biomater Appl*. 2022 Mar;36(8):1484-1502. doi: 10.1177/08853282211048574. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35060797.
48. Selim OA, Lakhani S, Midha S, Mosahebi A, Kalaskar DM. Three-Dimensional Engineered Peripheral Nerve: Toward a New Era of Patient-Specific Nerve Repair Solutions. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Apr;28(2):295-335. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0355. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33593147.
49. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Zhang W, Riches P, Li B, Shu W. 3D biofabrication for soft tissue and cartilage engineering. *Med Eng Phys*. 2020 Aug;82:13-39. doi: 10.1016/j.medengphy.2020.06.003. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32709263.
50. Xie C, Ye J, Liang R, Yao X, Wu X, Koh Y, Wei W, Zhang X, Ouyang H. Advanced Strategies of Biomimetic Tissue-Engineered Grafts for Bone Regeneration. *Adv Healthc Mater*. 2021 Jul;10(14):e2100408. doi: 10.1002/adhm.202100408. Epub 2021 May 5. PMID: 33949147.
51. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Jul;73(1):9-15. doi: 10.1016/j.plefa.2005.04.010. PMID: 15936182.
52. Ma Y., Dong L., Zhou D., Li L., Zhang W., Zhen Y., Wang T., Su J., Chen D., Mao C., et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *J. Cell. Mol. Med*. 2019;23:2822–2835. doi: 10.1111/jcmm.14190.

53. Chen J., Ren S., Duscher D., Kang Y., Liu Y., Wang C., Yuan M., Guo G., Xiong H., Zhan P., et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote sciatic nerve regeneration via optimizing Schwann cell function. *J. Cell. Physiol.* 2019;234:23097–23110. doi: 10.1002/jcp.28873.
54. Grimoldi N., Colleoni F., Tiberio F., Vetrano I.G., Cappellari A., Costa A., Belicchi M., Razini P., Giordano R., Spagnoli D., et al. Stem Cell Salvage of Injured Peripheral Nerve. *Cell Transplant.* 2015;24:213–222. doi: 10.3727/096368913X675700.
55. Erba P., Mantovani C., Kalbermatten D.F., Pierer G., Terenghi G., Kingham P. Regeneration potential and survival of transplanted undifferentiated adipose tissue-derived stem cells in peripheral nerve conduits. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 2010;63:e811–e817. doi: 10.1016/j.bjps.2010.08.013.
56. Klein S.M., Vykoukal J., Li D.P., Pan H.L., Zeitler K., Alt E., Geis S., Felthaus O., Prantl L. Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable U.S. Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plast. Reconstr. Surg.* 2016;138:132–139. doi: 10.1097/PRS.0000000000002291.
57. Anderson M., Shelke N.B., Manoukian O.S., Yu X., McCullough L.D., Kumbar S.G. Peripheral Nerve Regeneration Strategies: Electrically Stimulating Polymer Based Nerve Growth Conduits. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2015;43:131–159. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.2015014015.
58. Zha K, Yang Y, Tian G, Sun Z, Yang Z, Li X, Sui X, Liu S, Zhao J, Guo Q. Nerve growth factor (NGF) and NGF receptors in mesenchymal stem/stromal cells: Impact on potential therapies. *Stem Cells Transl Med.* 2021 Jul;10(7):1008-1020. doi: 10.1002/sctm.20-0290. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33586908; PMCID: PMC8235142.
59. Moattari M, Kouchesfehiani HM, Kaka G, Sadraie SH, Naghdi M. Evaluation of nerve growth factor (NGF) treated mesenchymal stem cells for recovery in neurotmesis model of peripheral nerve injury. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018 Jun;46(6):898-904. doi: 10.1016/j.jcms.2018.03.015. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29716818.
60. Ning C, Zhou Z, Tan G, Zhu Y, Mao C. Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives. *Prog Polym Sci.* 2018 Jun;81:144-162. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2018.01.001. Epub 2018 May 7. PMID: 29983457; PMCID: PMC6029263.
61. Thrivikraman G, Boda SK, Basu B. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective. *Biomaterials.* 2018 Jan;150:60-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.003. Epub 2017 Oct 3. PMID: 29032331.
62. MacEwan MR, Gamble P, Stephen M, Ray WZ. Therapeutic electrical stimulation of injured peripheral nerve tissue using implantable thin-film wireless nerve stimulators. *J Neurosurg.* 2018 Feb 9:1-10. doi: 10.3171/2017.8.JNS163020. Epub ahead of print. PMID: 29424647.
63. Schliephake H, Langner M. Reconstruction of the mandible by prefabricated autogenous bone grafts. An experimental study in mini-pigs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26: 244– 52.
64. Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:373– 9.
65. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004;364: 766– 70.

66. Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, et al. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 2006;27:3163–7.
67. Bhang SH, Cho SW, La WG, et. Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):2734-47.
68. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jan;121(1):50-8.
69. Pu CM, Liu CW, Liang CJ et al. Adipose-Derived Stem Cells Protect Skin Flaps against Ischemia/Reperfusion Injury via IL-6 Expression, *J Invest Dermatol*. 2017 Jun;137(6):1353-1362.
70. Huckhagel T, Nüchtern J, Regelsberger J, Lefering R; TraumaRegister DGU. Nerve injury in severe trauma with upper extremity involvement: evaluation of 49,382 patients from the TraumaRegister DGU® between 2002 and 2015. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2018 Sep 10;26(1):76. doi: 10.1186/s13049-018-0546-6. PMID: 30201025; PMCID: PMC6131878.
71. Clark WL, Trumble TE, Swiontkowski MF, Tencer AF. Nerve tension and blood flow in a rat model of immediate and delayed repairs. *J Hand Surg Am*. 1992 Jul;17(4):677-87. doi: 10.1016/0363-5023(92)90316-h. PMID: 1629548.
72. Nassimizadeh M., Nassimizadeh A.K., Power D. Managing the nerve gap: New tools in the peripheral nerve repair toolbox. *J. Musculoskelet. Surg. Res*. 2019;3:4. doi: 10.4103/jmsr.jmsr_98_18.
73. Huayllani M.T., Boczar D., Forte A.J., Rinker B. Evidence-Based Approach to Nerve Gap Repair in the Upper Extremity: A Review of the Literature and Current Algorithm for Surgical Management. *Ann. Plast Surg*. 2020;84:S369–S374. doi: 10.1097/SAP.0000000000002278.