

AUTOREFERAT

dr n. med. Marek Konop



Zakład Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej

Wydział Lekarsko-Stomatologiczny

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 13.02.2023

1. **Imię i nazwisko:** Marek Konop

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

2017.02.23 - Stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, specjalność fizjologia. Podmiot nadający stopień: Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Tytuł rozprawy: Wpływ keratynowych bioopatrunków na proces gojenia ran chirurgicznych u myszy zdrowych i jatrogennie wywołaną cukrzycą.

Promotor: prof. dr hab. n. med. Lidia Rudnicka

Promotor pomocniczy: dr n. med. Joanna Czuwara

Recenzenci:

dr hab. n. med. Agnieszka Osmola – Mańkowska

dr hab. n. med. Barbara Zegarska

2011 – dyplom magistra chemii – Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

2011 – podyplomowe studia prawa dowodowego, kryminalistyki, nauko pokrewnych – Centrum Nauk Sądowych, Uniwersytet Warszawski

2009 – dyplom licencjata chemii - Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

2018 – obecnie – Adiunkt - Zakład Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

2017 – 2018 - Asystent - Zakład Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

2017 – 2018 - post – doc - Zakład Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

2015-2017 – wykładowca – Katedra i Klinika Dermatologiczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny

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.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.**

- 1.1. Cykl powiązanych tematycznie publikacji pod tytułem: *Wpływu bioopatrunku na bazie nierozpuszczalnej frakcji keratyny na proces gojenia ran chirurgicznych u zwierząt z farmakologicznie indukowaną cukrzycą.*

Cykl obejmuje łącznie 5 oryginalnych publikacji, w których jestem pierwszym i korespondującym autorem; wszystkie prace zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

Sumaryczny współczynnik *Impact Factor* osiągnięcia naukowego: **17.920**.

Sumaryczna punktacja *MEiN* osiągnięcia naukowego: **520**.

Wykaz prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Konop, M.**, Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Zielenkiewicz, U., Brzozowska, I., Nabavi, S. M., & Rudnicka, L. (2018). Development of a novel keratin dressing which accelerates full-thickness skin wound healing in diabetic mice: In vitro and in vivo studies. *Journal of biomaterials applications*, 33(4), 527–540. <https://doi.org/10.1177/0885328218801114>

IF = 2.442

MEiN = 30 (stara punktacja)

Wkład w powstanie osiągnięcia: zaplanowanie eksperymentu, otrzymanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych, opracowanie farmakologicznego modelu cukrzycy u myszy, przeprowadzanie badań *in vivo*, przygotowanie tkanek do badań histopatologicznych, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

2. **Konop, M.**, Kłodzińska, E., Borowiec, J., Laskowska, A. K., Czuwara, J., Konieczka, P., Cieślik, B., Waraksa, E., & Rudnicka, L. (2019). Application of micellar electrokinetic chromatography for detection of silver nanoparticles released from wound dressing. *Electrophoresis*, 40(11), 1565–1572.
<https://doi.org/10.1002/elps.201900020>

IF = 3.081

MEiN = 70

Wkład w powstanie osiągnięcia: zaplanowanie eksperymentu, otrzymanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych z dodatkiem nanocząstek srebra, synteza nanocząstek srebra, opracowanie procedury uwalniania nanosrebra z badanych opatrunków, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

3. **Konop, M.**, Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Sulejczak, D., Damps, T., Zielenkiewicz, U., Brzozowska, I., Sureda, A., Kowalkowski, T., Schwartz, R. A., & Rudnicka, L. (2020). Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 14(2), 334–346.
<https://doi.org/10.1002/term.2998>

IF = 3.963

MEiN =140

Wkład w powstanie osiągnięcia: zaplanowanie eksperymentów *in vitro* i *in vivo*, otrzymanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych z dodatkiem nanocząstek srebra, przeprowadzenie badań *in vivo*, przygotowanie tkanek do badań histopatologicznych, wykonanie barwień, hematoksylina i eozyna, Masson-Trichrome, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

4. **Konop, M.**, Laskowska, A. K., Rybka, M., Kłodzińska, E., Sulejczak, D., Schwartz, R. A., & Czuwara, J. (2021). Keratin Scaffolds Containing Casomorphin Stimulate Macrophage Infiltration and Accelerate Full-Thickness Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2554.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092554>

IF = 4.792

MEiN = 140

Wkład w powstanie osiągnięcia: zaplanowanie eksperymentów *in vitro* i *in vivo*, otrzymanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych z dodatkiem kazomorfiny, opracowanie procedury uwalniania kazomorfiny z badanego opatrunku, przeprowadzenie badań *in vivo*, przygotowanie tkanek do badań histopatologicznych i immunofluorescencyjnych, wykonanie barwień, hematoksylina i eozyna, Masson-Trichrome, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

5. **Konop, M.**, Rybka, M., Szudzik M., Mazurek, Ł., Laskowska, A.K., Sulejczak, D., Ruszczak, Z., Mazgaj, R., Cieślik, B., Schwartz, A.R., Samborowska, E., Frankowski, J., Waszkowski, A., Konopelski, P., Czuwara, J. (2022). Keratin-butyrate scaffolds promote skin wound healing in diabetic rats through down-regulation of IL-1 β and up-regulation of Keratins 16 and 17. *Journal of Natural Fibers* (2022): 1-16. <https://doi.org/10.1080/15440478.2022.2136325>

IF = 3.507

MEiN = 140

Wkład w powstanie osiągnięcia: zaplanowanie eksperymentów *in vitro* i *in vivo*, otrzymanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych z dodatkiem maślanu sodu, opracowanie modelu cukrzycy i rany chirurgicznej u szczurów, opracowanie procedury uwalniania maślanu sodu z badanego opatrunku, przeprowadzenie badań *in vivo*, przygotowanie tkanek do badań histopatologicznych i immunofluorescencyjnych, wykonanie barwień tkankowych, hematoksylina i eozyna, Masson-Trichrome, interpretacja otrzymanych wyników, przygotowanie manuskryptu.

Cel badań:

Gojenie ran jest złożonym procesem fizjologicznym, w którym dochodzi do odzyskania ciągłości uszkodzonego naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Rany mogą powstawać w wyniku urazu lub procesów patologicznych tj. niedokrwienie, niedotlenienie, zaburzenia metaboliczne. Z klinicznego punktu widzenia rany możemy podzielić na ostre i przewlekłe.

Rany ostre (ang. *acute wounds*) powstają na skutek działania siły/czynników zewnętrznych i goją się zwykle w przeciągu kilku dni, rzadko tygodni (< 6-8 tygodni). Więcej problemów przysparzają rany przewlekłe (ang. *chronic wounds, chronic non-healing wounds*), które goją się w czasie powyżej 8 tygodni. Rany te mogą powstawać w wyniku nieprawidłowego leczenia ran ostrych (np. wtórne nadkażenia bakteryjne czy nieprawidłowe opatrzenie rany). Rany przewlekłe powstają najczęściej w przebiegu choroby lub chorób współistniejących, wynikających z zaburzeń funkcjonowania układu immunologicznego, nieprawidłowości przebiegu poszczególnych etapów gojenia lub niewydolności układu krążenia. Współczesna medycyna dzięki opracowaniu standardów postępowania oraz odpowiedniej profilaktyki jest w stanie skutecznie wspomagać proces gojenia nawet najbardziej problematycznych ran (np. zespół stopy cukrzycowej, rany pooparzeniowe, owrzodzenia żyłne i tętnicze kończyn dolnych). Jednakże, różnorodność typów ran i długi czas gojenia rodzi potrzebę poszukiwania nowych typów opatrunków/biomateriałów i wprowadzenia tzw. fazowego leczenia ran, które polega na doborze właściwego opatrunku w zależności od rodzaju rany i fazy gojenia.

Wiele grup naukowych na świecie poszukuje nowych terapii i metod regeneracji, które opierają się na wykorzystaniu biomateriałów pochodzenia naturalnego, mających wspomagać gojenie ran. Znając właściwości fizykochemiczne i biologiczne różnych biomateriałów, można stworzyć nowy materiał, który może być wykorzystany do zastosowań biomedycznych, w tym do opatrywania ran czy systemów dostarczania leków. W tym kontekście, biomateriały keratynowe (rozpuszczalne lub nierozpuszczalne) posiadają unikalny zestaw właściwości, takich jak doskonała biokompatybilność, biodegradowalność i bioaktywność. Dotychczasowe badania dotyczące biomateriałów na bazie keratyny obejmowały głównie metody otrzymywania biomateriałów na bazie białek keratynowych. a także obejmowały badania nad wpływem białek keratynowych (frakcja rozpuszczalna) na proces gojenia ran w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

Niewiele wiadomo na temat wpływu nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych (mikrorusztowań – ang. *scaffolds*) na proces gojenia ran zarówno w warunkach prawidłowych jak i w modelu cukrzycy u zwierząt doświadczalnych. Prowadzone przeze mnie badania nad zastosowaniem biomateriałów na bazie nierozpuszczalnej frakcji keratyny wpisują się w nurt poszukiwania nowych materiałów opatrunkowych, których zadaniem jest przyspieszenie procesu gojenia, eliminacja ryzyka nadkażeń bakteryjnych, dostarczenie substancji o właściwościach przeciwbólowych lub przeciwzapalnych.

Szczegółowy opis osiągnięć przedstawiam poniżej:

Omówienie prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego:

1. **Konop, M.**, Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Zielenkiewicz, U., Brzozowska, I., Nabavi, S. M., & Rudnicka, L. (2018). Development of a novel keratin dressing which accelerates full-thickness skin wound healing in diabetic mice: In vitro and in vivo studies. *Journal of biomaterials applications*, 33(4), 527–540. <https://doi.org/10.1177/0885328218801114>

Celem przeprowadzonych badań było zbadanie w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych jako potencjalnych bioopatrunków w gojeniu ran u myszy z farmakologicznie indukowaną cukrzycą. Nierozpuszczalną frakcję białek otrzymano zgodnie z metodyką opracowaną i zmodyfikowaną w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Metoda otrzymywania polega na połączeniu chemicznej aktywacji (roztworem 3%NaOH) a następnie enzymatycznym trawieniu z wykorzystaniem pepsyny. Otrzymany proszek keratynowy (ang. *fur-keratin derived powder* (FKDP)) zbadano w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. W teście żywotności komórek wykazano, że otrzymany bioopatrunek jest nietoksyczny i stymuluje wzrost zarówno linii komórkowej NIH/3T3 jak i komórek wyizolowanych od myszy z farmakologicznie indukowaną cukrzycą, przy czym wzrost komórek linii NIH /3T3 był istotnie statystycznie większy w porównaniu do kontroli ($p < 0.05$).

Przebadano również właściwości antybakteryjne otrzymanego preparatu w porównaniu do komercyjnie dostępnego opatrunku Atrauman Ag. Nie zaobserwowano statystycznie istotnej różnicy wzrostu bakterii *S. aureus* i *E. coli* w stosunku do komercyjnie dostępnego opatrunku. W kolejnym etapie zbadano preparat w warunkach *in vivo* u samców myszy szczepu C57BL6 (N=20, wiek 12-15 tyg.). Badania *in vivo* składały się z dwóch etapów: farmakologicznej indukcji cukrzycy oraz z części chirurgicznej. Cukrzycę indukowano poprzez dootrzewnowe podanie (i.p.) streptozotocyny (STZ) w modelu „multiple, low doses of STZ (80mg/kg, intraperitoneally, i.p.)”. Po stwierdzeniu stabilnej cukrzycy (stężenie glukozy >250 mg/dL) rozpoczęto procedurę chirurgiczną. Myszy znieczulono, a następnie wykonano 2 nacięcia powłok skórnych (rana lewa – kontrolna, rana prawa – opatrzona badanym preparatem) o średnicy ~ 10 mm w okolicy łopatek na wysokości Th3-Th5. Rany zabezpieczono szwami, wykonano dokumentację fotograficzną (5, 8 i 15 dzień eksperymentu), na podstawie której obliczono procent wygojenia rany. W 5, 8 i 15 dniu eksperymentu pobrano tkanki do badań histopatologicznych. Na podstawie dokumentacji fotograficznej, wykazano, że rany opatrzone badaną zasypką na bazie keratyny (FKDP) goiły się statystycznie szybciej ($p < 0.05$) w 5 i 8 dniu eksperymentu w porównaniu do ran nieopatrzonych (ran kontrolnych), co potwierdza

skuteczność otrzymanego preparatu. Badania histopatologiczne wykazały, że otrzymana zasypka jest biozgodna i biokompatybilna; wbudowuje się w regenerującą tkankę, nie indukuje reakcji zapalnej, a także wykazuje właściwości hemostatyczne. Rany opatrzone szybciej ulegały procesowi naskórkowania (re-epitelizacji) w porównaniu do ran kontrolnych nieopatrzonych.

Dokonano oceny komórek migrujących (100 komórek w polu widzenia) do rany w trakcie procesu gojenia. Oceniono liczbę komórek o morfologii makrofagów, neutrofilów, limfocytów i monocytów. Wykazano, że w ranach opatrzonych dominował odczyn mieszano komórkowy złożony z makrofagów i histiocytów. Obecność tych komórek w ranie sprzyja przebudowie i regeneracji tkanki, co jest spójne z pomiarami planimetrycznymi. W ranach kontrolnych przeważał odczyn złożony z neutrofilów. W barwieniu Masson-Trichrome oceniono organizację włókien kolagenowych w biopsjach pobranych z rany kontrolnej i opatrzonej badany opatrunkiem. Wykazano, że w porównaniu do rany kontrolnej podścielisko rany opatrzonej charakteryzowało się aktywacją fibroblastów oraz w obszarze rany wykryto luźne włókna kolagenowe. Ma to szczególne znaczenie w początkowej fazie gojenia i sugeruje lepsze warunki przebudowy uszkodzonej tkanki wymagane na tym etapie gojenia.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że nierozpuszczalna frakcja białek keratynowych uzyskana z sierści (FKDP), może być uznana za bezpieczny i skuteczny bioopatrunek wspomagający gojenie się ran pełnej grubości u myszy z farmakologicznie wywołaną cukrzycą.

2. **Konop, M.**, Kłodzińska, E., Borowiec, J., Laskowska, A. K., Czuwara, J., Konieczka, P., Cieślik, B., Waraksa, E., & Rudnicka, L. (2019). Application of micellar electrokinetic chromatography for detection of silver nanoparticles released from wound dressing. *Electrophoresis*, 40(11), 1565–1572. <https://doi.org/10.1002/elps.201900020>

Kontynuując badania dotyczące roli biomateriałów na bazie nierozpuszczalnej frakcji białek keratynowych na proces gojenia ran, bazę opatrunku (FKDP) poddano modyfikacji nanocząstkami srebra (AgNP) i oceniono szybkość uwalniania jonów AgNP z powierzchni opatrunku (FKDP+AgNP) w porównaniu do opatrunków komercyjnie dostępnych zawierających srebro: Aquacell Ag oraz Atrauman Ag z wykorzystaniem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) i spektroskopii w zakresie fal UV-VIS. W pierwszym etapie badań otrzymano koloidalne nanocząstki srebra poprzez

redukcję azotanu (V) sodu roztworem cytrynianu trisodowego, co potwierdzono pomiarami spektroskopowymi (Spektroskopia UV-VIS). Zarejestrowano charakterystyczne widmo przy długości fali $\lambda=410$ nm dla otrzymanych nanocząstek, Opatrunek bazowy FKDP nasączono roztworem AgNP (t=1h), wysuszono i zmielono. Otrzymany produkt FKDP+AgNP użyto do dalszych analiz. Zawartość srebra w badanych opatrunkach oznaczono metodą spektroskopii absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu (F-AAS). Badania *in vitro* wykazały, że srebro w stężeniu wyższym niż 10ppm wywierało toksyczny wpływ na fibroblasty izolowane od myszy z cukrzycą w stosunku do NIH/3T3 i linii komórkowych BJ ($p < 0,05$).

Przeprowadzone pomiary z wykorzystaniem spektroskopii UV-VIS wykazały, że w przypadku Aquacel Ag i FKDP-AgNPs srebro z matrycy uwalnia się powoli, a zmiany stężenia podczas badania są niewielkie. Ponadto, skład matrycy i interakcja jonów srebra z FBS może dawać fałszywe wyniki absorbancji, które mogą nie dawać różnic w stężeniu srebra w różnych punktach czasowych. Z drugiej strony, gdy porównano dane z MEKC stwierdzono, że technika ta jest lepsza do monitorowania uwalniania srebra z opatrunków ran niż bezpośrednie pomiary UV, ponieważ proces separacji odbywa się w kapilarze, a pasmo charakterystyczne dla AgNPs może być wykryte po pozbyciu się/wyeliminowaniu przynajmniej części matrycy. Zaobserwowano, że w różnych punktach czasowych stężenie srebra stopniowo wzrastało, potwierdzając stopniowe uwalnianie srebra z badanych opatrunków. Ponadto spektroskopia UV-VIS nie jest selektywna, dlatego nie można było wykryć niewielkich różnic w stężeniu srebra.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że zastosowanie 20 mM buforu boranowego o pH 9 z dodatkiem 20mM SDS daje najlepsze warunki separacji nanocząstek srebra uwalnianych z opatrunku przy użyciu micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC). Wykazałem, że srebro uwalniało się stopniowo ze stworzonego przez nas eksperymentalnego opatrunku FKDP-AgNPs w porównaniu do komercyjnie dostępnych opatrunków. Należy zwrócić uwagę, że micelarna elektrokinetyczna chromatografia (MEKC) cechowała się większą czułością w porównaniu do spektroskopii UV-VIS, ponieważ eliminowała efekt matrycy opatrunku. Tym samym MEKC może być użyteczna w praktyce klinicznej do oceny uwalniania nanocząstek srebra z opatrunków.

3. **Konop, M.**, Czuwara, J., Kłodzińska, E., Laskowska, A. K., Sulejczak, D., Damps, T., Zielenkiewicz, U., Brzozowska, I., Sureda, A., Kowalkowski, T., Schwartz, R. A., & Rudnicka, L. (2020). Evaluation of keratin biomaterial containing silver nanoparticles

as a potential wound dressing in full-thickness skin wound model in diabetic mice. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 14(2), 334–346. <https://doi.org/10.1002/term.2998>

Wśród najciekawszych i najbardziej obiecujących zastosowań biomateriałów na bazie keratyny jest ich wykorzystanie jako potencjalnych materiałów opatrunkowych w terapii trudno gojących się ran, które występują m.in. w cukrzycy. Ponadto, rany te są wysoce podatne na wtórne infekcje. W celu zapobiegania pierwotnym lub wtórnym zakażeniom stosuje się różne środki przeciwdrobnoustrojowe. W niniejszym badaniu, nierozpuszczalna frakcja białek keratynowych impregnowana koloidalnymi nanocząstkami srebra (AgNPs) była badana jako bioopatrunek na rany u myszy szczepu C56/BL6 z farmakologicznie indukowaną cukrzycą.

Badania podzielono na 3 główne etapy: badania fizykochemiczne otrzymanego opatrunku (FKDP+AgNP), badania *in vitro* oraz badania *in vivo* w modelu rany chirurgicznej u myszy. Do oceny morfologii powierzchni otrzymanego opatrunku bazowego (FKDP) oraz FKDP+AgNP wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (ang. *Scanning Electron Microscopy* - SEM). Na podstawie dokumentacji fotograficznej uzyskanej w SEM, wykazano, że powierzchnia opatrunku keratynowego pokryta jest pojedynczą warstwą AgNPs. Pomiar wykazały również regiony z aglomeratami AgNPs na powierzchni FKDP.

W celu scharakteryzowania otrzymanych nanocząstek srebra wykorzystano micelną elektrokinetyczną chromatografię (MEKC) oraz technikę dynamicznego rozpraszania światła (ang. *Dynamic Light Scattering* - DLS), która jest uznaną i precyzyjną techniką pomiarową służącą do charakteryzowania wielkości cząstek w zawiesinach i emulsjach. Za pomocą MEKC oraz DLS wykazano, że na etapie syntezy AgNPs otrzymano 3 frakcje nanocząstek o różnej wielkości, a także samoistną tendencję nanocząstek srebra do tworzenia agregatów, co koreluje z obrazem uzyskanym w skaningowym mikroskopie elektronowym.

Badanie przeciwdrobnoustrojowe (użyte szczepy bakterii: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*) otrzymanych nanocząstek srebra oraz bioopatrunku FKDP+AgNP przeprowadzono na płytkach stałych z bulionem lizogenicznym, metodą shake-flask, oraz wykonano barwienie Live/Dead a także przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Przy użyciu klasycznych metod mikrobiologicznych wykazano, że otrzymany opatrunek z dodatkiem nanocząstek srebra hamuje wzrost badanych bakterii. Przeprowadzono badania żywotności bakterii z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy kapilarnej. Badania z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej korelowały z wynikami uzyskanymi klasycznymi metodami, jednakże, technika ta

pozwała na stwierdzenie zahamowania wzrostu po bezpośredniej inkubacji nanocząstek srebra z badanymi bakteriami.

W kolejnym etapie przebadano wpływ otrzymanych nanocząstek na żywotność komórek oraz właściwości hemolityczne nanocząstek srebra w szerokim zakresie stężeń (0-60 ppm). Wykazano, że nanocząstki srebra w stężeniu powyżej 5ppm wykazywały toksyczny efekt w stosunku do komórek linii NIH/3T3. Wykazano, że właściwości hemolityczne AgNPs były zależne od stężenia. Największą hemotoksyczność obserwowano przy stężeniu powyżej 20ppm.

U 20 samców myszy szczepu C57/BL6 wyindukowano cukrzycę poprzez dootrzewnowe podanie streptozotocyny (80mg/kg.m.c), a następnie wytworzono dwie rany. Rana lewa – nieopatrzona – stanowiła ranę kontrolną, zaś rana prawa – badaną – na którą nałożono keratynowy opatrunek suplementowany nanocząstkami srebra. Rany fotografowano w 5, 8 i 15 dniu eksperymentu w celu obliczenia procentu wygojenia rany. Od zwierząt w 5, 8 i 15 dniu eksperymentu pobrano tkanki oraz krew do badań histopatologicznych i biochemicznych. Określono także rodzaj komórek migrujących, organizację włókien kolagenowych oraz stężenie wybranych cytokin w surowicy.

Na podstawie pomiarów planimetrycznych wykazałem, że rany opatrzone FKDP+AgNP goiły się istotnie statystycznie szybciej w 5 i 8 dniu eksperymentu w porównaniu do ran kontrolnych (bez opatrunku). W początkowym etapie gojenia, rany kontrolne cechował wysięk surowiczo-ropny, w porównaniu do ran opatrzonych, gdzie wysięk był surowiczy i mniej nasilony. W ranach opatrzonych proces naskórkowania przebiegał szybciej, a naskórek był grubszy w porównaniu do ran pozbawionych opatrunku. Na podstawie barwienia hematoksylina-eozyna i pomiarów półilościowych wykazano, że począwszy od 5 dnia w biopsjach pobranych z ran opatrzonych FKDP+AgNP przeważały makrofagi i histocyty w porównaniu do ran nieopatrzonych, gdzie dominowały neutrofile. Podobną tendencję zaobserwowano w pozostałych punktach czasowych (dzień 8 i 15). Z wykorzystaniem barwienia Masson-Trichrome oceniono włókna kolagenowe. W ranach opatrzonych badaną zasypką FKDP+AgNP włókna kolagenowe cechowały się rozluźnieniem na brzegach rany, były grubsze i zorganizowane w gęste struktury, w porównaniu do ran kontrolnych gdzie były bardziej luźne i nieregularnie ułożone. Wyniki te mogą przemawiać za lepszymi warunkami przebudowy (remodelingu) uszkodzonej tkanki w początkowej fazie gojenia w ranach opatrzonych. Z drugiej strony krawędzie ran kontrolnych charakteryzowały się gęsto

upakowanymi włóknami kolagenowymi, co może być związane z wolniejszym procesem gojenia.

W przedstawionej pracy wykazałem, że otrzymany keratynowy bioopatrunek z dodatkiem AgNP, jest nietoksyczny, biokompatybilny i biodegradowalny. Badania mikrobiologiczne wykazywał właściwości przeciwdrobnoustrojowe wobec *E. coli* i *S. aureus*. Rany opatrzone opatrunkiem FKDP-AgNP goiły się istotnie szybciej w pierwszym tygodniu po zabiegu w warunkach farmakologicznie wywołanej cukrzycy. Zastosowany opatrunek stanowił mikrorusztowanie dla migracji komórek a ponadto ulegał wbudowaniu w regenerującą się tkankę podczas procesu gojenia. Wykazał działanie immunomodulacyjne, przyciągał monocyty i makrofagi, które sprzyjają przebudowie i regeneracji tkanek w przeciwieństwie do neutrofilów o właściwościach destrukcyjnych. Ponadto praca ta była najlepiej cytowaną pracą w *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* w latach 2020-2021.

4. **Konop, M.**, Laskowska, A. K., Rybka, M., Kłodzińska, E., Sulejczak, D., Schwartz, R. A., & Czuwara, J. (2021). Keratin Scaffolds Containing Casomorphin Stimulate Macrophage Infiltration and Accelerate Full-Thickness Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2554. <https://doi.org/10.3390/molecules26092554>

Upośledzone gojenie ran jest poważnym problemem medycznym, szczególnie u osób chorych na cukrzycę. Ból związany z przewlekłymi trudno gojącymi się ranami może być szczególnie trudny do opanowania. Wielu pacjentów odczuwa ból pomimo stosowania ogólnoustrojowych leków przeciwbólowych. Opioidy są podstawowymi lekami przeciwbólowymi stosowanymi do zwalczania umiarkowanego i silnego bólu. Aby poprawić warunki gojenia się ran, lekarze i naukowcy starają się stworzyć idealny model opatrunku, który przyspieszy gojenie i złagodzi objawy bólowe. Celem badania było wprowadzenie do opatrunku bazowego kazomorfiny – peptydu opioidowego i zbadanie otrzymanego bioopatrunku (FKDP+0,1% Caso) w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Wykazałem, że kazomorfiny uwalniała się z keratynowego opatrunku przez 5 kolejnych dni. Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej NIH/3T3, wykazały, że po 48h inkubacji badanego opatrunku z komórkami linii NIH/3T3 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost żywotności badanej linii. Co więcej, istotność ta potwierdziła się w porównaniu do komórek kontrolnych oraz inkubowanych z bazowym opatrunkiem. Na podstawie dokumentacji fotograficznej

wykazano, że otrzymany bioopatrunek FKDP+0,1%Caso był biokompatybilny, komórki wzrastały na jego powierzchni, co korelowało z pomiarem parametru żywotności komórek.

Kolejny etap badań obejmował farmakologiczną indukcję cukrzycy (i.p. STZ 80mg/kg) a następnie wytworzenie ran chirurgicznych u myszy (N=20 osobników). Od zwierząt pobrano biopsje tkankowe oraz krew w 5, 8 i 15 dniu eksperymentu. Przeprowadzono rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną (H&E), Masson-Trichome oraz barwienia immunofluorescencyjne (makrofagi – CD68, jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa β oraz kolagen IV). W surowicy oznaczono stężenie IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, interferonu-gamma (IFN- γ), oraz TNF- α . Wykazano, że wraz z czasem spadało stężenie prozapalnej IL-1 β , a wzrastało stężenie IL-10. Podwyższony poziom IL-10, który może być w związku ze stwierdzonym wzmożonym naciekiem makrofagów, histiocytoz i tworzeniem wielojądrowych komórek olbrzymich (MNGCs), a zmniejszonym naciekiem z neutrofilów i limfocytów, co stwierdzono w badaniach tkankowych gojących się ran. Zaobserwowano również wzrost stężenia IL-17A, IFN- γ , oraz TNF- α . Zwiększone stężenie IFN- γ korelowało z odpowiedzią tkankową i zwiększoną infiltracją makrofagów. Na podstawie dokumentacji fotograficznej wykazano, że rany opatrzone keratynowym opatrunkiem z dodatkiem 0,1% kazomorfiny goiły się istotnie statystycznie szybciej ($p < 0.05$) w 5, 8 i 15 dniu eksperymentu w porównaniu do ran kontrolnych. W biopsjach tkankowych pobranych w 5 dniu eksperymentu wykazano, że w ranach opatrzonych keratynowym opatrunkiem z dodatkiem kazomorfiny przeważał odczyn mieszano-komórkowy złożony z makrofagów i histiocytoz, z naciekiem neutrofilów na powierzchni rany (pod strupem). W ranach kontrolnych (pozbawionych opatrunku) dominował naciek komórkowy złożony z neutrofilów oraz pojedynczych histiocytoz. W 8 i 15 dniu eksperymentu w ranach opatrzonych FKDP+0,1%Caso dominował odczyn złożony z makrofagów, histiocytoz, komórek olbrzymich (ang. *foreign-body giant cell*) oraz limfocytów. W ranach kontrolnych obserwowano powolne wygaszanie odczynu neutrofilowego i migrację histiocytoz oraz komórek olbrzymich. Na podstawie dokumentacji histologicznej wykazano, że rany opatrzone badanym opatrunkiem szybciej ulegały procesowi epitelizacji w porównaniu do ran kontrolnych. Oceniono również liczbę wynaczynień krwi do przestrzeni rany. Wykazano, że rany opatrzone badanym opatrunkiem cechowały się mniejszą liczbą wynaczynionych erytrocytoz do ran w 8 i 15 dniu eksperymentu w porównaniu do ran kontrolnych. Świadczy to o właściwościach hemostatycznych otrzymanego opatrunku. Barwienia immunofluorescencyjne na obecność makrofagów wykazały silne znakowanie makrofagów w ranach opatrzonych FKDP+0,1%Caso w porównaniu do ran kontrolnych w

trakcie trwania całego doświadczenia. Tkanki pobrane z rany kontrolnej i opatrzonej badanym opatrunkiem wyznakowano także na obecność jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF-kappa β (NF- $\kappa\beta$), który jest związany z proliferacją komórek, adhezją i stanem zapalnym. Zaobserwowano, że w ranach opatrzonych keratynową zasypką z dodatkiem kazomorfiny podczas gojenia wzrastało znakowanie immunologiczne dla NF- $\kappa\beta$. Podobne wyniki obserwowano w ranach kontrolnych, jednak znakowanie immunologiczne było słabsze w porównaniu do rany opatrzonej.

Podsumowując, w pracy tej wykazałem że zastosowanie nierozpuszczalnej frakcji keratyny suplementowanej kazomorfina jako bioopatrunku przyspiesza proces gojenia ran u myszy z farmakologicznie indukowaną cukrzycą. Kazomorfina uwalniała się z badanego opatrunku przez 5 kolejnych dni. Otrzymany bioopatrunek stymulował wzrost komórek *in vitro*. Badania *in vivo* wykazały, że otrzymany opatrunek przyspieszał proces gojenia ran, był biokompatybilny, biozgodny i nie wywoływał reakcji zapalnej w kontakcie z tkanką. W ranach opatrzonych dominował odczyn złożony z makrofagów i ich morfologicznych wariantów, w porównaniu do ran kontrolnych, gdzie dominowały neutrofile. Co więcej stanowił rusztowanie dla migrujących komórek z brzegów rany, a tym samym powstała blizna była praktycznie niewidoczna.

5. **Konop, M.**, Rybka, M., Szudzik M., Mazurek, Ł., Laskowska, A.K., Sulejczak, D., Ruszczak, Z., Mazgaj, R., Cieślik, B., Schwartz, A.R., Samborowska, E., Frankowski, J., Waszkowski, A., Konopelski, P., Czuwara, J. (2022). Keratin-butyrates scaffolds promote skin wound healing in diabetic rats through down-regulation of IL-1 β and up-regulation of Keratins 16 and 17. *Journal of Natural Fibers* (2022): 1-16. <https://doi.org/10.1080/15440478.2022.2136325>

Pacjenci z cukrzycą doświadczają przewlekłych niegojących się owrzodzeń, które stanowią globalny problem medyczny obciążający system opieki zdrowotnej i socjalnej. Głównym celem inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej jest poszukiwanie nowego typu biomateriałów, które przyspieszałyby proces gojenia ran i fizjologicznej regeneracji tkanek. Biomateriały keratynowe zyskują wiele uwagi, ponieważ są biokompatybilne, biodegradowalne oraz wspierają migrację i proliferację komórek. Ponadto, ze względu na rozbudowaną powierzchnię, możliwe jest wbudowanie w nie substancji o działaniu wspomagającym np. przeciwmikrobowym, przeciwbólowym czy przeciwzapalnym. W tym kontekście sól sodowa kwasu n-masłowego (Na-Bu) zyskuje uwagę ze względu na swoje

właściwości przeciwzapalne. Maślan powstaje w wyniku fermentacji błonnika pokarmowego przez bakterie beztlenowe w jelicie grubym. Na-Bu indukuje różnicowanie komórek, jest także inhibitorem deacetylazy histonowej (HDAC). Jest to nietoksyczny, naturalnie występujący związek, który łagodzi stany zapalne nabłonka. Celem prowadzonych badań było otrzymanie i zbadanie biomateriału na bazie nierozpuszczalnych białek keratynowych z dodatkiem maślanu sodu w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

Badania podzielono na dwa etapy: badania fizykochemiczne charakteryzujące stworzony opatrunek oraz badania otrzymanego opatrunku w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Opatrunek bazowy (FKDP) – nierozpuszczalną frakcję białek keratynowych otrzymano z sierści szczurów szczepu Sprague-Dawley. Sierść poddano chemicznej aktywacji roztworem 3%NaOH, a następnie trawiono enzymatycznie z wykorzystaniem pepsyny. Otrzymany biomateriał inkubowano w roztworze 0,1% maślanu sodu (NaBu) przez 24h, a następnie poddano procesowi liofilizacji. Otrzymany produkt FKDP+0,1%NaBu wykorzystano do dalszych badań. Przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) dokonano oceny kształtu i morfologii powierzchni substratów (sierść szczurza oraz FKDP) i produktu (FKDP+0,1%NaBu). Badanie SEM wykazało, że pod wpływem działania wodorotlenku sodu i pepsyny doszło do wyraźnego zmniejszenia grubości łożdgi włosa poprzez częściową degradację osłonki włosa i komórek korowych. W celu zbadania właściwości chłonnych przeprowadzono test absorpcji wody, który wykazał, że największą zdolność chłonną posiadał bazowy opatrunek FKDP, następnie opatrunek keratynowy z dodatkiem 0,1%NaBu, a najmniejszą sierść szczurza. Otrzymane wyniki wykazały, że otrzymany bioopatrunek posiada właściwości chłonne, a tym samym może być stosowany do ran cechujących się niewielkim wysiękiem. Dokonano oceny zawartości maślanu sodu w badanym opatrunku używając atomowej spektrometrii emisyjnej z atomizacją w plazmie mikrofalowej, a także oceniono uwalnianie maślanu sodu z opatrunku przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Wykazano, że maślan sodu uwalniał się z powierzchni keratynowego opatrunku przez 5 kolejnych dni. Badania *in vitro* wykazały, że badany opatrunek w zakresie stężeń 0,01-1% nie powoduje hemolizy. Fibroblasty szczurze poddane działaniu FKDP i FKDP+0,1%NaBu w stężeniach 0,1%, 0,5% i 1% wykazywały zmniejszoną żywotność komórek po 24-godzinnym okresie inkubacji. Przy tych stężeniach FKDP+0,1%NaBu powodował znacznie mniejszy spadek żywotności komórek w porównaniu z komórkami eksponowanymi na sam FKDP. Badania *in vivo* podzielono na dwa etapy: pierwszy etap obejmował opracowanie farmakologicznego modelu cukrzycy, a następnie wytworzenie 2 ran pełnej grubości u szczurów szczepu Spraug-Dawley. Cukrzycę u szczurów

wywołano poprzez jednorazowe, dootrzewnowe podanie streptozotocyny w dawce 65mg/kg. Po stwierdzeniu stabilnej cukrzycy, rozpoczęto procedurę chirurgiczną, wytworzono dwie rany: badaną na którą nałożono badany opatrunek oraz ranę kontrolną pozbawioną opatrunku. Rany fotografowano w dniu 0, 4, 7, 14, 21 i 28. Tkanki do badań histopatologicznych i molekularnych pobierano w 4, 7, 14, 21 i 28 dniu eksperymentu.

Wykazano, że badany opatrunek przyspieszał proces gojenia ran u szczurów obciążonych cukrzycą w 4 i 7 dniu eksperymentu w porównaniu do ran kontrolnych. Od 14 dnia tempo gojenia się rany było podobne, ale utracono istotność statystyczną. W 28 dniu obserwacji, zregenerowana skóra w ranie opatrzonej keratynową zasypką z dodatkiem maślanu sodu wykazywała pełną grubość naskórka i skondensowane włókna kolagenowe w skórze właściwej ze skąpyimi resztkami keratyny obecnymi w makrofagach z pojawiającym się nabłonkiem mieszków włosowych. Procesy te były opóźnione w ranach kontrolnych o kilka dni, gdzie dominował odczyn neutrofilowy. Ponadto zaobserwowano, że liczba mikrokrwawień (wynaczynionych erytrocytów) była istotnie mniejsza w ranach badanych w okresie gojenia w porównaniu do rany kontrolnej. Otrzymane wyniki korelowały z danymi uzyskanymi w mikroskopie fluorescencyjnym. Barwienia immunofluorescencyjne na obecność makrofagów wykazały silne znakowanie makrofagów w ranach opatrzonych badanym opatrunkiem, w porównaniu do ran kontrolnych, gdzie przeważały neutrofile. Wykazano również silniejsze znakowanie dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) oraz jego receptora Flk-1.

Techniką RT-qPCR dokonano oceny ekspresji wybranych cytokin w tym IL-1 β , IL-10, TNF- α , VEGF, cytokeratyn KRT16, KRT17 oraz białek połączeń ścisłych Tjp1 (ZO1) oraz F11r (JAM-A) w biopsjach tkankowych pobranych z ran kontrolnych i opatrzonych keratynowym opatrunkiem w 4, 7, 14, 21 i 28 dniu eksperymentu. W ranach opatrzonych keratynową zasypką z dodatkiem maślanu sodu (FKDP+0,1%NaBu) wykazano statystycznie istotny ($p < 0.05$) wzrost ekspresji mRNA dla IL-10, VEGF, KRT16 oraz Tjp1 oraz F11r począwszy od 14 dnia eksperymentu w porównaniu do ran kontrolnych. W ranach kontrolnych zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji IL-1 β w 4, 7 i 14 dniu eksperymentu w porównaniu do rany opatrzonej, co potwierdza przeciwzapalną skuteczność badanego opatrunku. Analiza poziomu ekspresji mRNA TNF- α wykazała, że była wyższa w ranach opatrzonych FKDP+0,1%NaBu w trakcie trwania całego eksperymentu. Zbadano również poziom mRNA KRT17 w ranie kontrolnej i badanej w trakcie trwania eksperymentu. W 7 dniu eksperymentu stwierdzono wyższą ekspresję mRNA KRT17 w ranie kontrolnej. Począwszy od

14 dnia eksperymentu, mRNA KRT17 było istotnie statystycznie wyższe w ranie opatrzonej w porównaniu do rany kontrolnej.

Badanie western blot wykonano w celu określenia ekspresji poziomu fosforylowanego czynnika transkrypcyjnego (p-AKT) i kinaz białkowych (mAKT, AKT i RPS6), które mogą być potencjalnie zaangażowane w wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe. Wykazano wyższą ekspresję rybosomalnego białka R6 (RPS6) w ranach opatrzonych FKDP+0,1%NaBu w porównaniu do ran kontrolnych w trakcie trwania eksperymentu. Białko RPS6 reguluje ścieżkę sygnałową kompleksu białkowego mTORC2, który pełni rolę dodatniej pętli sprzężenia zwrotnego w aktywacji AKT. Otrzymany opatrunek nie wpływał na ekspresję kinazy białkowej mTOR. Wykazano, że w 14 i 28 dniu eksperymentu ekspresja kinazy AKT była wyższa w ranie opatrzonej opatrunkiem FKDP +0,1%NaBu. W ranach opatrzonych w 4 i 14 dniu eksperymentu zaobserwowano wyższy poziom ekspresji p-AKT.

Przeprowadzone przeze mnie badania, stanowią jedno z pierwszych doniesień na temat biologicznych funkcji rusztowań keratynowo-maślanowych w gojeniu się ran skóry u szczurów z cukrzycą. Zastosowany opatrunek przyspieszał proces gojenia ran. W ranach opatrzonych dominował odczyn mieszany komórkowy złożony z makrofagów i histiocytołów w porównaniu do ran kontrolnych, gdzie dominowały neutrofile. Nasze dane pokazują również, że FKDP+0,1%NaBu może mieć kluczowe znaczenie dla ekspresji KRT16, KRT17, białek połączeń ścisłych: ZO1, JAM-A. Ponadto otrzymany bioopatrunek wykazywał działanie przeciwzapalne, co potwierdziło badanie RT-qPCR w którym poziom mRNA ekspresji IL-1 β w ranie opatrzonej był istotnie niższy w porównaniu do rany kontrolnej.

Podsumowując, przedstawione prace składają się na cykl 5 oryginalnych publikacji opisujących rolę nierozpuszczalnych białek keratynowych i ich modyfikacji na proces gojenia ran u zwierząt z farmakologicznie indukowaną cukrzycą. Należy podkreślić innowacyjność prowadzonych badań, ponieważ jako pierwszy wykazałem, że nierozpuszczalna frakcja białek keratynowych wpływa korzystnie na proces gojenia ran u zwierząt obciążonych cukrzycą. Również wprowadzone modyfikacje (nanocząstki srebra, kazomorfina, maślan sodu) do opatrunku keratynowego, uwalniane z jego powierzchni w przeciągu kilku dni, zwiększają jego właściwości przeciwzapalne i bakteriobójcze. Wykazałem również, że wprowadzenie do opatrunku bazowego syntetycznego opioidu – kazomorfiny – przyspiesza proces gojenia ran u zwierząt obciążonych cukrzycą. Badania na modelu zwierzęcym (myszy, szczury) wykazały, że otrzymane bioopatrunki są biozgodne, biokompatybilne i stanowią mikrorusztowania dla migrujących komórek z brzegów i wnętrza rany. Badania histopatologiczne i

immuofluorescencyjne wykazały, że w ranach opatrzonych badanymi opatrunkami dominowały makrofagi, histiocyty w porównaniu do ran kontrolnych, gdzie dominowały neutrofile. Wyniki te korelowały z danymi uzyskanymi technikami biologii molekularnej (RT-qPCR, Western Blot).

Należy podkreślić, iż prowadzone przeze mnie badania mają charakter aplikacyjny i mogą przyczynić się do powstania nowej klasy materiałów opatrunkowych, które będą przyspieszały proces gojenia ran u pacjentów obciążonych cukrzycą.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Poza przedstawionym cyklem publikacji, jestem autorem lub współautorem 27 innych prac, w tym w 4 pracach 1 lub korespondującym, o łącznym IF = 103,300 z zakresu dermatologii eksperymentalnej oraz kardiologii eksperymentalnej:

a) artykuły przeglądowe związane tematycznie z gojeniem ran i dermatologią eksperymentalną nie ujęte w cyklu:

Jestem autorem lub współautorem 3 artykułów przeglądowych dotyczących roli biomateriałów (keratyna, jedwab, opatrunki zawierające srebro i nanosrebro) w gojeniu ran oraz 1 Listu do redakcji (Editorial):

1. ***Konop, M.***, Rybka, M. & Drapała, A. Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review. *Pharmaceutics* 2021;13(12):2029.
2. Mazurek, Ł., Szudzik, M., Rybka, M. & ***Konop, M.*** Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing. *Biomolecules* 2022;12(12):1852.
3. Rybka, M., Mazurek, Ł., ***Konop, M.*** Beneficial Effect of Wound Dressings Containing Silver and Silver Nanoparticles in Wound Healing—From Experimental Studies to Clinical Practice. *Life* 2023; 13(1):69 .
4. ***Konop, M.*** Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regenerations—An Overview. *Pharmaceutics* 2022, 14,1291.<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061291>

W mojej pracy naukowo-badawczej zajmuję się głównie problematyką wykorzystania biomateriałów, głównie na bazie keratyny, jako potencjalnych bioopatrunków w gojeniu ran

w warunkach zdrowia jak i w warunkach patologicznych np. w modelu cukrzycy.

W pracy przeglądowej „*Keratin Biomaterials in Skin Wound Healing, an Old Player in Modern Medicine: A Mini Review*” podsumowano najważniejsze informacje na temat roli biomateriałów na bazie keratyny (rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych) w gojeniu ran zarówno w warunkach zdrowia jak i w cukrzycy. Ponadto opisano zastosowanie bioopatrunków w warunkach klinicznych. Dodatkowo praca ta otrzymała zespołową nagrodę naukową III stopnia JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2022 roku.

W kolejnym artykule przeglądowym „*Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing*” opisano właściwości biomedyczne materiałów na bazie jedwabiu. Opatrunki oparte na bazie jedwabiu mają właściwości przeciwzapalne, proangiogenne i znacząco przyspieszają gojenie ran w porównaniu do opatrunków dostępnych komercyjnie. Również badania *in vivo* potwierdzają korzystny wpływ fibroiny jedwabiu w gojeniu ran. Badania kliniczne skupiające się na opatrunkach z fibroiny są również obiecujące.

W pracy przeglądowej „*Beneficial Effect of Wound Dressings Containing Silver and Silver Nanoparticles in Wound Healing - From Experimental Studies to Clinical Practice*” opisano wykorzystanie różnego typu bioopatrunków lub opatrunków z dodatkiem srebra lub nanocząstek srebra w gojeniu ran. Srebro posiada wiele przydatnych właściwości, tj. antybakteryjne, przeciwzapalne lub antyoksydacyjne, które mogą być wykorzystane w leczeniu przewlekłych ran. W postaci nanocząstek, środki srebrne mogą działać jeszcze skuteczniej i mogą być łatwiej wprowadzone do różnych opatrunków. Opatrunki na bazie srebra są komercyjnie dostępne, jednak wciąż odkrywane są ich innowacyjne właściwości czy modyfikacje. W tym artykule skupiono się na opisie badań eksperymentalnych i klinicznych nad opatrunkami zawierającymi srebro lub nanocząstki srebra, których wyniki zostały opublikowane w ostatnich latach.

Jako Guest Editor wydania specjalnego *Pharmaceutics - "Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regenerations vol. I"* omówiono najważniejsze prace związane z tematyką biomateriałów, gojenia ran i inżynierii tkankowej. Podsumowując, najważniejszymi wyzwaniem w nadchodzących dekadach będzie znalezienie nowych biomateriałów, które znacząco przyspieszą proces gojenia ran, zwłaszcza w stanach patologicznych, takich jak cukrzyca, oraz przełożenie ich ze świata laboratorium na badania kliniczne. Aby to osiągnąć, konieczne są innowacyjne rozwiązania opracowywane przez interdyscyplinarne zespoły złożone z chemików, bioinżynierów i lekarzy, a także polityka regulacyjna ułatwiająca dostęp

do badań i pacjentów.

b) najważniejsze prace związane z kardiologią eksperymentalną:

Moje zainteresowania naukowe związane są również z wpływem bakterii jelitowych i ich metabolitów na regulację ciśnienia tętniczego i rozwoju nadciśnienia tętniczego. Poniżej przedstawiam wybrane artykuły, których jestem autorem lub współautorem:

1. Jaworska K, Kopacz W, Koper M, Szudzik M, Gawrys-Kopczyńska M, **Konop M**, Hutsch T, Chabowski D, Ufnal M. Enalapril Diminishes the Diabetes-Induced Changes in Intestinal Morphology, Intestinal RAS and Blood SCFA Concentration in Rats. *Int J Mol Sci*. 2022 May 27;23(11):6060. doi: 10.3390/ijms23116060. PMID: 35682739; PMCID: PMC9181110.
2. **Konop M.**, Rybka M., Waraksa M., Laskowska A.K., Nowiński A., Grzywacz T., Drapała A., Karwowski W.J., Kłodzińska EM. Electrophoretic Determination of Trimethylamine (TMA) in Biological Samples as a Novel Potential Biomarker of Cardiovascular Diseases Methodological Approach, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021; 18(23):12318. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312318>.
3. Jaworska K, **Konop M**, Hutsch T, Perlejewski K, Radkowski M, Grochowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E, Ufnal M. Trimethylamine But Not Trimethylamine Oxide Increases With Age in Rat Plasma and Affects Smooth Muscle Cells Viability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020 Jun 18;75(7):1276-1283. doi: 10.1093/gerona/glz181.
4. Jaworska K, **Konop M**, Hutsch T, Perlejewski K, Radkowski M, Grochowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E, Ufnal M. Trimethylamine But Not Trimethylamine Oxide Increases With Age in Rat Plasma and Affects Smooth Muscle Cells Viability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020 Jun 18;75(7):1276-1283. doi: 10.1093/gerona/glz181.
5. Gawrys-Kopczyńska M, **Konop M**, Maksymiuk K, Kraszewska K, Derzsi L, Sozanski K, Holyst R, Pilz M, Samborowska E, Dobrowolski L, Jaworska K, *Mogilnicka I, Ufnal M*. TMAO, a seafood-derived molecule, produces diuresis and reduces mortality in heart failure rats. *Elife*. 2020 Jun 8;9:e57028. doi: 10.7554/eLife.57028

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

Moja działalność naukowa prowadzona wraz z naukowcami międzynarodowymi z innych instytutów zaowocowała 5 publikacjami, które wchodzą do cyklu habilitacyjnego i dotyczą tematyki gojenia ran i biomateriałów. Utrzymuję stałą współpracę naukową z jednostkami zagranicznymi:

1. Department of Dermatology and Pathology, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ, USA – prof. Robert A. Schwartz
2. College of Medicine and Health Sciences, Khalifa University, Abu Dhabi, United Arab Emirates – prof. Zbigniew Ruszczak
3. Research Group in Community Nutrition and Oxidative Stress and CIBEROBN – Physiopathology of Obesity and Nutrition, University of Balearic Islands, Palma, Spain – prof. Antonio Sureda
4. Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran – prof. Seyed M. Nabavi
5. College of Physical Science and Technology, Sichuan University, 610064 Chengdu, People's Republic of China - dr Joanna Borowiec

Współpracuję również z licznymi ośrodkami naukowymi w kraju w tym:

- a) Katedra i Klinika Dermatologiczna, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska - dr hab. n. med. Joanna Czuwara, prof. dr hab. n. med. Lidia Rudnicka
- b) Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska – dr hab. Dorota Sulejczak, prof. IMDiK
- c) Zakład Chemii Analitycznej i Analiz Instrumentalnych, Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, Polska - dr hab. Ewa Kłodzińska, prof. IMPiB
- d) Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska – dr inż. Bartłomiej Cieślik, prof. inż. Piotr Konieczka
- e) Pracownia Środowiskowej i Ewolucyjnej Biologii Systemów, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa, Polska – dr hab. Urszula Zielenkiewicz
- f) Zakład Biogospodarki, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowy Instytut Badawczy, Poznań, Polska – dr inż. Jakub Frankowski

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

a) działalność dydaktyczna:

Podczas pracy w Katedrze i Klinice Dermatologicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (lata 2015-2017) prowadziłem zajęcia z przedmiotu Dermatologia i Wenerologia dla Studentów Kierunku Lekarskiego i English Division. Po rozpoczęciu pracy z Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (październik 2017) prowadzę wykłady, seminaria i ćwiczenia z przedmiotu fizjologia i patofizjologia, biologia oraz biofizyka dla Studentów Kierunku Lekarsko-Dentystycznego i English Dentistry Division. Prowadzę również zajęcia z biofizyki, fizjologii na kierunku Techniki Dentystyczne oraz Higiena Stomatologiczna. Od 1 października 2017 jestem osobą odpowiedzialną za organizację zajęć dydaktycznych w Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej WUM.

Objąłem opieką i nadzorem przygotowanie wniosków grantowych oraz prac naukowych przez studentów naszego Koła Naukowego. Zaoowocowało to zdobyciem 4 minigrantów dla studentów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz powstaniem 2 artykułów przeglądowych o łącznym IF = 9.317, gdzie Studenci są pierwszymi autorami. Od 1.10.2022 jestem również jednym z opiekunów Koła Naukowego działającego przy Zakładzie Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej WUM. Ponadto jestem promotorem pomocniczym przygotowywanej rozprawy doktorskiej lek. Mateusza Rybki (doktorat w toku).

b) działalność organizacyjna w WUM:

1. Członek Rady Nadzorującej Centrum Badań Przedklinicznych (CBP) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (od 15.12.2022)
2. Przewodniczący Rady Programowej Nauk Podstawowych, Morfologicznych i Ogólnomedycznych (od 10.2022)
3. Członek Komisji ds. weryfikacji wiedzy i umiejętności studentów przenoszonych z uczelni ukraińskich (01.01 – 30.09.2022)
4. Członek Zespołu ds. dobrostanu zwierząt (od 14.01.2022)
5. Członek Rady Programowej Higieny Stomatologicznej w roku akademickim 2021/2022
6. Członkowie Rady Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego w kadencji (połączone RW WLS i WM do czasu wyborów) 2021/2022
7. Członek Rady Programowej Technik Dentystycznych w roku akademickim 2020/2021,

2021/2022

8. Członek Komisji Rekrutacyjnej English Dentistry Division w roku akademickim 2020/2021

c) działalność popularyzatorska – komunikaty ustne

W ostatnich latach zostałem zaproszony do wygłoszenia wykładów na konferencjach naukowych oraz kursach zarówno w Polsce jak i zagranicą. Tematyka wystąpień była ściśle związana z gojeniem ran, biomateriałami oraz szerokopojętymi chorobami skóry. Poniżej przedstawiam szczegóły wystąpień ustnych. (# - autor prezentujący)

1. **M. Konop**[#], Ł. Mazurek, M. Rybka, M. Szudzik, J. Czuwara: ***Keratin butyrate wound dressing accelerates wound healing and increases the expression of tight junction protein in diabetic conditions.*** Foods, Dietary supplements, and Herbal products treating the Diseases of 21st Century: moving from Traditional to Scientific Research. Indie – 16.12.2022 (jako „Invited speaker”)
2. **M. Konop**[#], M. Rybka, Ł. Mazurek, M. Szudzik, A. Laskowska, J. Czuwara, E. Kłodzińska, R.A. Schwartz, M. Ufnal: ***Doctor Jekyll And Mr Hyde – Two Faces Of Opioids In A Wound Treatment.*** 13th International Conference on Skin Ageing and Challenges, Lisboa, Portugal – 17-18.11.2022 (jako „Invited speaker”)
3. **M. Konop**[#], M. Rybka, M. Szudzik, Ł. Mazurek, R. A. Schwartz, A. Laskowska, J.Czuwara, M. Ufnal - ***The regenerative potential of keratin-butyrate dressing on skin wound healing in diabetic rats.*** 5th Baltic Stem Cells Meeting, 21-23.10.22, Warsaw, Poland
4. **M. Konop**[#], J. Czuwara, M. Szudzik, A. Laskowska, D. Sulejczak, M. Rybka, Ł. Mazurek, E. Kłodzińska, R. Schwartz, M. Ufnal: ***Keratin-biphalin scaffold accelerate skin wound healing in diabetic mice.*** 12th International Conference on Skin Ageing and Challenges, 10-12.11.2021, Lisboa, Portugal
5. **M. Konop**[#], J. Czuwara, D. Sulejczak, A. Misicka, L. Rudnicka: ***Preparaty keratynowe jako potencjalne opatrunki w mysim modelu rany chirurgicznej.*** 31 Zjazd Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, 11-14.05.2016, Wrocław, Polska
6. **M. Konop**[#], D. Sulejczak, A. Szczucińska, P. Kosson, A.W. Lipkowski, A. Misicka Kęsik, L. Rudnicka: ***Keratin associated protein as a new type of wound dressing supported wound healing.*** Central European Conference on Regenerative Medicine, 14-15.03.2015, Bydgoszcz, Poland

Dwukrotnie byłem wykładowcą na kursach ogólnopolskich dla lekarzy specjalizujących się w zakresie dermatologii i wenerologii:

1. **M. Konop**[#]: *Diagnostyka immunofluorescencyjna chorób pęcherzowych, naczyń i chorób tkanki łącznej*. „Diagnostyka histopatologiczna chorób skóry” – 20 – 24.02.2017 Warszawa, Polska Organizator: Klinika Dermatologiczna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego.
2. **M. Konop**[#]: *Metody diagnostyki immunologicznych chorób skóry (metoda immunofluorescencyjna, immunoblot, ELISA)*. „Kurs Immunologia Chorób Skóry” – 11-13.05.2017, Serock, Polska Organizator: Klinika Dermatologiczna Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

d) działalność popularyzatorska – plakaty

Wielokrotnie prezentowałem wyniki badań których jestem autorem lub współautorem w formie plakatów na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Poniżej przedstawiam szczegóły prezentacji plakatowych w porządku chronologicznym. (#autor prezentujący):

1. M. Szudzik[#], M. Rybka, Ł. Mazurek, A. Laskowska, J. Czuwara, M. Ufnal, **M. Konop**: *In Vitro and In Vivo Evaluation of Keratin-trimethylamine N-oxide as a Potential Novel Therapeutics Wound Dressing in Diabetic Rats*. 13th International Conference on Skin Ageing and Challenges, Lisboa, Portugal – 17-18.11.2022
2. **M. Konop**[#], M. Gawryś-Kopczyńska, M. Szudzik, M. Rybka, Ł. Mazurek, M. Ufnal: *Hypertensive rats show increased expression of flavin monooxygenases and diminished hypertensive response to trimethylamine, a gut bacterial product and an industry air pollutant*. American Heart Association – HTN 2022 Scientific - Sessions, San Diego, USA - 7-10.09.2022
3. P. Konopelski[#], **M. Konop**, J. Czuwara, M. Szudzik, A. Laskowska, D. Sulejszczak, M. Rybka, Ł. Mazurek, E. Samborowska, R. Schwartz, M. Ufnal: *Keratin-butyrate scaffold accelerate skin wound healing in diabetic rats*. 12th International Conference on Skin Ageing and Challenges, Lisboa, Portugal – 10-12.11.2021
4. Ufnal, M[#]; **Konop, M**; Gawrys-Kopczynska, M; Maksymiuk, K; Sozanski, K; Derzsi, L: *Beneficial Effect of TMAO in Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rats is Associated with Diuretic and Hypotensive Actions*. Annual Meeting on Experimental Biology, San Diego, USA - 04-07.04.2020

5. **M. Konop**, K. Jaworska, K. Bielińska, A. Bielak-Zmijewska, E. Sikora, M. Pilz, L. Derzism K. Sozanska, R. Holyst, M. Ufnal[#]: *Trimethylamine but Not Trimethylamine N-Oxide Increases Blood Pressure in Rats, Affects Viability of Vascular Smooth Muscle Cells and Degrades Protein Structure*. American-Heart-Association Scientific Sessions on Hypertension, New Orleans, USA - 05-08.09.2019
6. **M. Konop[#]**, A. Drapała, K. Jaworska, T. Hutsch, K. Bielinska, M. Gawryś-Kopczynska, M. Ufnal: *Rats with heart failure show increased gut-to-blood penetration of trimethylamine, a gut bacteria metabolite*. Physiology 2019 – The Physiology Society, Aberdeen, UK, 8-10.07.2019

8. Uzyskane nagrody i wyróżnienia:

- a) Nagroda Naukowa III stopnia JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, 09.2022
- b) Wyróżnienie w rankingu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego - „Lista 100 liderów naukowych w latach 2018-2021”, Warszawa, 2022
- c) Nagroda American Heart Association - Paul Dudley White International Scholar – za najlepsze streszczenie z Polski w sesji Hypertension 2022 Scientific Session, San Diego, USA
- d) Nagroda za wygłoszony wykład “Keratin-biphalin scaffold accelerate skin wound healing in diabetic mice” na 12th International Conference on Skin Ageing and Challenges, Lisboa, Portugal – 10-12.11.2021
- e) Nagroda Naukowa I stopnia JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa - 22.11.2021
- f) Nagroda Ministra Zdrowia dla nauczycieli akademickich za znaczące osiągnięcia naukowe, Warszawa - 15.01.2020
- g) Nagroda American Heart Association - Paul Dudley White International Scholar – za najlepsze streszczenie z Polski w sesji Hypertension 2019 Scientific Session, USA
- h) Nagroda “Article Impact Award 2018” Redaktora Naczelnego American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology za artykuł *"Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats"*, Orlando, USA – 08.04.2019
- i) Nagroda APSselect Amerykańskiego Towarzystwa Fizjologicznego za artykuł pt. *"Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart*

fibrosis in hypertensive rats", USA – 01.11.2018

- j) Nagroda Naukowa III stopnia JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa, 30.10.2017
- k) Nagroda za wygłoszony wykład "Keratin associated proteins as a new type of biodressing supported wound healing" na 1st Central European Conference on Regenerative Medicine, Poland, Bydgoszcz – 14-15.03.2015;
- l) Laureat III edycji konkursu na stypendia dla doktorantów prowadzących aplikacyjne badania w Instytutach Biocentrum Ochota, organizowanego przez Ośrodek Transferu Technologii BioTech-IP współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Warszawa, 13.06.2014);

9. Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach

- a) Od 2017 – Polskie Towarzystwo Dermatologiczne - członek
- b) Od 2013 – Polskie Towarzystwo Medycyny Regeneracyjnej - członek

10. Informacja o recenzowanych pracach naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych

Recenzent w czasopismach z listy Journal Citation Reports:

1. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology
2. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine
3. International Journal of Dermatology
4. Journal of Investigative Surgery
5. Advances in Dermatology and Allergology
6. ACS Biomaterials Science & Engineering
7. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials
8. Pharmaceutics
9. Electrophoresis
10. Biomolecules
11. International Journal of Molecular Sciences
12. Folia Neuropathologica
13. Dermatology Review/Przegląd Dermatologiczny

14. International Journal of Environmental Research and Public Health

15. ACS Nano

11. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-10, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Uczestniczyłem w realizacji i kierowałam grantami naukowymi. Poniżej wymieniam najważniejsze z nich:

a) Realizowane granty i projekty naukowe:

2022 – 2023 – Grant zewnętrzny „Najlepsi z najlepszych! 4.0”, w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (Kierownik i opiekun projektu).

2022 – 2023 - Synteza API, opracowanie formulacji oraz przeprowadzenie badań in vivo dla kremu zawierającego postbiotyczny metabolit mikrobioty jelitowej człowieka – U228 do stosowania miejscowego w terapii atopowych stanów zapalnych skóry (1.11.2022 – do chwili obecnej, Wykonawca).

2021-2023 - Opiekun 4 minigrantów studenckich Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

2020-2022 – Wykonawca Grant NCN – *Rola piezolitów i osmolitów w układzie krążenia w zdrowiu i chorobie.*

2022 – do chwili obecnej – Wykonawca Grant NCN - *Trimetyloamina jako toksyna w chorobach układu krążenie.*

2020-2021 - Grant wewnętrzny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego - *Wpływ preparatów na bazie keratyny na proces gojenia ran u szczurów z jatrogenie indukowaną cukrzycą* (12 miesięcy; kierownik i główny wykonawca projektu).

b) Funkcja Edytora w czasopiśmie zagranicznych:

Pełnię funkcję Guest Editor w czasopiśmie Pharmaceutics:

1. Redaktor wydania specjalnego "Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regenerations vol. I" w czasopiśmie Pharmaceutics
2. Redaktor wydania specjalnego "Biomaterials in Skin Wound Healing and Tissue Regenerations vol. II" w czasopiśmie Pharmaceutics

c) *Analiza bibliometryczna publikacji przeprowadzona Bibliotekę Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego:*

Źródło danych (baza)	LICZBA CYTOWAŃ		INDEKS HIRSCHA
	Z autocytowaniami	Bez autocytowań	
Web of Science	457	419	12
Scopus	480	438	13

	PRZED DOKTORATEM		PO DOKTORACIE	
	IF	MEiN	IF	MEiN
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	2,952	35	90,817	2040
Opisy przypadków	-	-	-	-
Prace poglądowe	2,488	45	24,963	440
RAZEM	5,440	80	115,780	2480

Łącznie (przed i po doktoracie):

IF = 121,220

MEiN = 2560