

Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego
Anny Burdzińskiej

AUTOREFERAT

dr n. wet. Anna Burdzińska

**Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

SPIS TREŚCI

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie i omówienie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych	21
5.1. Porównanie komórek MSC z różnych źródeł.....	22
5.2. Modyfikacje właściwości przeszczepianych komórek	23
5.3. Badania metodologiczne na dużych modelach zwierzęcych.....	25
5.4. Aktualne kierunki badawcze.....	26
5.5. Inne publikacje wyników własnych oryginalnych badań	27
5.6. Artykuły poglądowe	27
5.7. Rozdziały w podręcznikach.....	27
6. Analiza bibliometryczna dorobku.....	28
7. Kierowanie oraz uczestnictwo w projektach badawczych	29
8. Patenty	29
9. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych	30

1. IMIĘ i NAZWISKO

Anna Maria Burdzińska

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- **ukończenie studiów wyższych z wynikiem bardzo dobrym i uzyskanie tytułu lekarza weterynarii (2002)**
Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
- **uzyskanie stopnia doktora nauk weterynaryjnych (2007)**
Wydział Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
na podstawie rozprawy doktorskiej: „Ocena przeżywalności autologicznych przeszczepów komórek satelitowych w okolicę zwieracza cewki moczowej – badania na modelu szczurzym”,
praca wyróżniona decyzją Rady Wydziału dn. 21 lutego 2007 r.

Promotor: Prof. dr hab. n. wet. Arkadiusz Orzechowski

Recenzenci: Dr hab. Marek Galanty, Prof. dr hab. Ryszard Bobowiec

3. DOTYCHCZASOWE ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

od 03.09.2007 r.:

Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

na stanowisku:

od 2007 – specjalistka, stanowisko naukowo-techniczne

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ. 1311.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl 6 publikacji poświęconych definiowaniu problemów związanych z docewkowymi przeszczepieniami komórkowymi, proponowaniu nowych rozwiązań w tym obszarze i weryfikacji hipotez w doświadczeniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych zebranych pod zbiorczym tytułem:

„Udoskonalanie technik związanych z transplantacjami komórkowymi stosowanymi w celu wzmocnienia mięśni zwieraczy cewki moczowej”.

Sumaryczny Impact Factor cyklu: 16,168

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu: 168

b) Publikacje wchodzące w skład cyklu

1. **Burdzińska A**, Gala K, Paczek L. Myogenic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46: 401-12.

IF-1,21 MNiSW- 13

Mój udział polegał na dokonaniu przeglądu literatury, krytycznej analizie zebranych informacji, wybraniu aspektów wartych opisanie i napisaniu manuskryptu i szacuję go na 90%.

2. **Burdzinska A**, Gala K, Kowalewski C, Zagozdzon R, Gajewski Z, Pączek L. Dynamics of acute local inflammatory response after autologous transplantation of muscle-derived cells into the skeletal muscle. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 482352. doi: 10.1155/2014/482352.

IF – 3,236 MNiSW – 30

Mój udział polegał sformułowaniu hipotez badawczych, zaplanowaniu doświadczeń, wykonywaniu doświadczeń na zwierzętach, optymalizacji metod hodowli komórek, prowadzeniu hodowli komórkowych, przeprowadzaniu analizy ekspresji genów w pobranych tkankach, analizie wyników, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu i szacuję go na 80%.

3. **Burdzińska A**, Crayton R, Dybowski B, Idziak M, Gala K, Radziszewski P, Pączek L. The effect of endoscopic administration of autologous porcine muscle-derived cells into the urethral sphincter. *Urology.* 2013;82(3):743.e1-8.

IF-2,132 MNiSW- 30

Mój udział polegał na sformułowaniu celów badawczych, pozyskaniu finansowania do realizacji projektu, zaplanowaniu doświadczeń. Ponadto, brałam udział w wykonywaniu doświadczeń na zwierzętach, optymalizacji warunków hodowli komórek, prowadzeniu hodowli komórkowych, przygotowywaniu komórek do transplantacji, a także analizowałam i interpretowałam wyniki. Odpowiadałam za logistykę doświadczeń, kierowałam projektem obejmującym badania wykonane w tej pracy, przygotowałam wstępną wersję manuskryptu, a także wersję zrewidowaną po uwagach recenzentów i szacuję go na 70%.

4. **Burdzinska A**, Dybowski B, Zarychta-Wisniewska W, Kulesza A, Zagozdzon R, Gajewski Z, Paczek L. The Anatomy of Caprine Female Urethra and Characteristics of Muscle and Bone Marrow Derived Caprine Cells for Autologous Cell Therapy Testing. *Anat Rec (Hoboken).* 2017 Mar;300(3):577-588.

IF – 1,37 MNiSW – 25

Mój udział polegał na sformułowaniu celów badawczych, pozyskaniu finansowania do realizacji projektu, zaplanowaniu doświadczeń, optymalizacji metod hodowli komórek. Brałam udział w wykonywaniu doświadczeń na zwierzętach, prowadzeniu hodowli komórkowych, identyfikacji hodowanych komórek, opracowaniu metodologii przygotowania tkanek do dalszych badań, analizowaniu wyników, interpretacji wyników. Odpowiadałam za logistykę doświadczeń, nadzorowałam wykonanie wszystkich elementów badania, przygotowałam wstępną i zrewidowaną wersję manuskryptu i szacuję go na 75%.

5. **Burdzinska A**, Dybowski B, Zarychta-Wiśniewska W, Kulesza A, Hawryluk J, Graczyk-Jarzynka A, Kaupa P, Gajewski Z, Paczek L. Limited accuracy of transurethral and periurethral intrasphincteric injections of cellular suspension. *Neurourology & Urodynamics*. 2018;37(5):1612-1622.

IF – 3,26 MNiSW – 35

Mój udział polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, pozyskaniu finansowania do realizacji projektu, zaplanowaniu doświadczeń, współwykonywaniu doświadczeń na zwierzętach. Byłam pomysłodawczynią wykorzystania systemu do przyżyciowego obrazowania zwierząt do analizy tkanek post-mortem, nadzorowałam weryfikację przydatności tego typu analizy. Analizowałam i interpretowałam wyniki. Odpowiadałam za logistykę doświadczeń, nadzorowałam wykonanie wszystkich elementów badania, przygotowałam wstępną i zrewidowaną wersję manuskryptu i szacuję go na 60%.

6. **Burdzinska A**, Dybowski B, Zarychta-Wiśniewska W, Kulesza A, Butrym M, Zagodzón R, Graczyk-Jarzynka A, Radziszewski P, Gajewski Z, Paczek L. Intraurethral co-transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells and muscle-derived cells improves the urethral closure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018;9(1):239.

IF – 4,96 MNiSW – 35

Mój udział polegał na sformułowaniu hipotez badawczych, pozyskaniu finansowania do realizacji projektu, zaplanowaniu doświadczeń, współwykonywaniu doświadczeń na zwierzętach, przygotowaniu komórek do transplantacji, analizie wyników badań urodynamicznych, badań immunohistochemicznych, interpretacji wyników. Odpowiadałam za logistykę doświadczeń, nadzorowałam wykonanie wszystkich elementów badania, przygotowałam wstępną i zrewidowaną wersję manuskryptu i szacuję go na 60%.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Odkrycie istnienia komórek macierzystych w postnatalnych organizmach wytyczyło nowe ścieżki w naukach biomedycznych. Komórki macierzyste są zdolne do podziałów wytwarzając komórki potomne, z których część odtwarza populację o niskim poziomie zróżnicowania, a część różnicuje się i pełni określone funkcje w organizmie. Badania nad komórkami macierzystymi pozwalają lepiej zrozumieć naturalne procesy regeneracji, mechanizmy starzenia się i rozwój transformacji nowotworowych. Ze względu na swoje właściwości, komórki te są postrzegane jako potencjalne narzędzie terapeutyczne. Pozyskanie umiejętności izolowania komórek macierzystych z dorosłych organizmów i namnażania ich w warunkach pozaustrojowych spowodowało lawinę badań nad możliwością stosowania transplantacji komórkowych w terapii chorób. Lista potencjalnych aplikacji jest bardzo długa i obejmuje wszystkie dziedziny medycyny. W centrum moich zainteresowań naukowych znajdują się komórki o potencjale miogennym oraz możliwości ich wykorzystania w

leczeniu chorób ludzi i zwierząt. Włókna mięśni szkieletowych to wysoce wyspecjalizowane syncytialne struktury niezdolne do podziałów. Jednak mięśnie szkieletowe mają zdolność do regeneracji, a zjawisko miogenezy, czyli tworzenia włókien mięśniowych jest obecnie stosunkowo dobrze poznane. Kluczowym elementem w tym procesie jest pula niezróżnicowanych komórek, znajdujących się na obrzeżach włókien, nazywanych komórkami satelitowymi. Oprócz komórek satelitowych, w mięśniach obecne są też inne, mniej zróżnicowane multipotentne komórki macierzyste (MDSC, *ang. muscle-derived stem cells*), zlokalizowane głównie w przestrzeniach okołonaczyniowych. Komórki satelitowe są aktywowane pod wpływem uszkodzenia włókien mięśniowych, a mediatorami w tym procesie są cytokiny, czynniki wzrostowe i inne bioaktywne substancje. Wzbudzone komórki satelitowe zaczynają intensywnie się dzielić. Część komórek potomnych przekształca się w mioblasty, a część odnawia pulę komórek satelitowych, dlatego komórki satelitowe zaliczamy do komórek macierzystych. Mioblasty, to komórki prekursorowe, czyli jeszcze nie całkowicie wyspecjalizowane, ale już ukierunkowane na konkretny typ różnicowania. Ulegają one stopniowemu wydłużaniu, łączą się ze sobą tworząc wielojądrowe struktury (miotuby), aby ostatecznie utworzyć nowe włókna mięśniowe lub dołączyć się do już istniejących.

Historycznie, pierwszym celem terapeutycznym dla komórek miogennych były dystrofie mięśniowe, które stanowią grupę ponad 30 chorób genetycznych charakteryzujących się postępującą słabością i degeneracją mięśni szkieletowych. Do tej pory nie ma skutecznych metod leczenia tych zaburzeń. Pierwsze potwierdzenie koncepcji, że prawidłowe komórki miogenne mogą dokonać fuzji z włóknami dystroficznych mięśni i tym samym dostarczyć im brakującego białka (np. dystrofiny) zostało zaprezentowane na łamach *Nature* w 1978 r. [Partridge et al.]. Wyniki te wywołały ogromny entuzjazm i na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku rozpoczęto kilka prób klinicznych, aby ocenić skuteczność transferu prawidłowych mioblastów do pacjentów z dystrofią mięśniową typu Duchenne'a. Niestety, rezultaty tych badań były dalekie od oczekiwanych. W większości przypadków nie zaobserwowano ani zwiększenia ekspresji dystrofiny w mięśniach pacjentów, ani poprawy klinicznej. Niepowodzenie prób przeprowadzonych w latach 90. skierowało prace nad przeszczepianiem komórek miogennych z powrotem do poziomu badań podstawowych i przedklinicznych. W trakcie dalszych badań zidentyfikowano dwa główne problemy związanych z niską skutecznością transplantacji mioblastów u pacjentów z dystrofiami mięśniowymi. Były to: 1) brak lub bardzo słaba rekrutacja wstrzykniętych dożylnie komórek do tkanki mięśniowej; 2) gwałtowne i masowe umieranie przeszczepionych mioblastów po lokalnym podaniu do mięśnia. Odpowiedzią były intensywne badania nad poszukiwaniem innych typów komórek miogennych, które wykazywałyby większą zdolność do rekrutacji z krwioobiegu, a także poszukiwanie przyczyn umierania mioblastów po transplantacji i podejmowanie działań zapobiegawczych. Równolegle, rozpoczęto badania nad wykorzystaniem transplantacji komórek miogennych w innych chorobach związanych z niewydolnością mięśni, szczególnie takich, które toczą się lokalnie, a nie systemowo. Jedną z takich chorób, bardzo ważną ze względu na ogromną częstotliwość występowania, jest nietrzymanie moczu (NTM). Zaburzona kontrola mikcji jest bardzo częstym stanem, szczególnie u kobiet po 40. roku życia. Badania epidemiologiczne wskazują, że NTM dotyka 25-30% kobiet w średnim wieku [Peyrat et al. 2002]. Wysoka częstość występowania, poczucie wstydu związane z tą dolegliwością, koszty rutynowej opieki i leczenia powodują, że nietrzymanie moczu jest klasyfikowane nie tylko jako problem medyczny, ale również społeczno-ekonomiczny. Najczęstszą formą nietrzymania moczu u kobiet jest wysiłkowe nietrzymanie moczu (WNM). W patogenezie WMN można wyróżnić dwie główne składowe - zwiększoną ruchomość szyi pęcherza i cewki moczowej (komponenta anatomiczna) i osłabione działanie mięśni zwieraczy cewki moczowej (komponenta zwieraczowa).

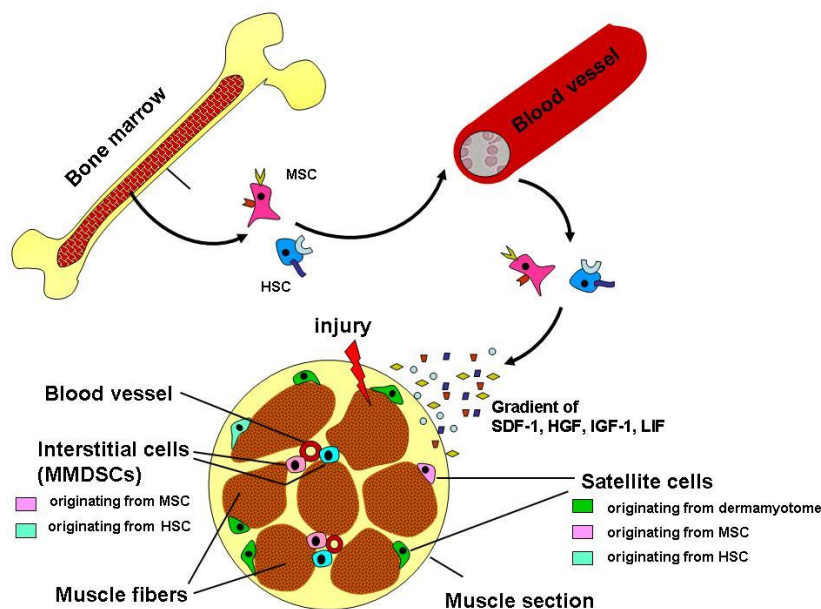
Większość najważniejszych obecnie strategii terapeutycznych koryguje podparcie szyi pęcherza, brakuje natomiast metod leczenia nakierowanych na wzmocnienie siły zwieraczy cewki moczowej. Zastosowanie iniekcji komórek miogennych bezpośrednio do mięśnia zwieracza zewnętrznego cewki moczowej (EUS, *ang. external urethral sphincter*) mogłoby wypełnić tę lukę. W założeniu, wstrzyknięte komórki mają wzmocnić siłę EUS poprzez zintegrowane z lokalną tkanką różnicowanie się we włókna mięśniowe, a także pobudzanie endogennych mechanizmów regeneracyjnych przez wydzielanie czynników wzrostowych i cytokin. Koncepcja ta została po raz pierwszy opublikowana w 2000 r. [Chancellor et al. 2000]. Od tego czasu przedstawiono wyniki ponad 30 badań wykonanych na małych modelach zwierzęcych przedstawiających ocenę czynnościową przeszczepienia komórek do eksperymentalnie uszkodzonej cewki moczowej. Co ciekawe, niezależnie od typu wstrzykniętych komórek, a także innych, licznych różnic pomiędzy protokołami doświadczeń, wszyscy autorzy notowali poprawę czynnościową po transplantacji komórek w porównaniu do grup kontrolnych i często była to zmiana istotna statystycznie. Przeprowadzone dotychczas próby kliniczne sugerują, że procedury związane z terapią komórkową w NTM są bezpieczne. Ilość aktualnie dostępnych danych nie pozwala na jednoznaczną ocenę skuteczności tej terapii, ale efekty wydają się słabsze od oczekiwanych. Dominuje pogląd, że procedura transplantacji komórkowych w NTM wymaga dalszych optymalizacji.

Badania prowadzone przeze mnie i współpracujące ze mną osoby wpisują się w zarysowany powyżej nurt. Celem nadrzędnym prowadzonych przeze mnie działań badawczych, których efekty przedstawiam jako moje główne osiągnięcie naukowe, jest próba udoskonalenia skuteczności transplantacji komórek miogennych przeprowadzanych w celu wzmocnienia zwieraczy cewki moczowej.

Miogenne komórki macierzyste (pierwsza publikacja z cyklu).

Cykl prac otwiera artykuł poglądowy traktujący o różnorodności populacji o charakterze miogennym w organizmach ssących i podejmujący próbę ustalenia zależności pomiędzy różnymi populacjami komórek macierzystych na podstawie dostępnej literatury. Publikacja porządkuje wiedzę na temat multipotencjalnych komórek macierzystych pochodzących z mięśni (MMDSC - *ang. multipotential muscle-derived stem cells*), które zajmują *in situ* głównie niszę okołonaczyniową. Komórki określane w anglojęzycznych publikacjach jako komórki macierzyste pochodzące z mięśni - MDSC (*ang. muscle-derived stem cells*) i populacja boczna izolowana z mięśni (*ang. Muscle side population (SP) cells*) były pozyskiwane przez różne grupy badawcze odmiennymi metodami. Analiza ekspresji markerów i ich potencjału różnicowania skłania jednak do wniosku, że populacje te, przynajmniej częściowo, reprezentują te same komórki. Wiele danych wskazuje na to, że komórki z grupy MMDSC pochodzą z innych części organizmu, w szczególności ze szpiku kostnego i są rekrutowane z krwioobiegu w ciągu okresu postnatalnego. Wiadomo, że mezenchymalne komórki macierzyste (zwane też mezenchymalnymi komórkami zrębu, MSC - *ang. mesenchymal stem (stromal) cells*), które w szpiku tworzą niszę dla komórek hematopoetycznych, są mobilizowane do krążenia w odpowiedzi na uszkodzenia tkanek [Ramirez et al. 2006]. Na podstawie gradientu stężeń cząsteczek, dla których posiadają receptory (np. oś CXCR4-CXCL12) są rekrutowane w różnych tkankach i narządach, również w mięśniach. Publikowane dane wskazują na to, że komórki pochodzące ze szpiku (prawdopodobnie są to zarówno komórki hematopoetyczne jak i mezenchymalne) osiadające w mięśniach z czasem zmieniają swój fenotyp podlegając działaniu lokalnej niszy. Stopniowo włączają się w nich mechanizmy odpowiedzialne za miogenny potencjał do różnicowania. Komórki wyizolowane z

mięśnia na takim etapie byłyby prawdopodobnie zaklasyfikowane jako MMDSC. Z czasem, komórki te mogą przyjmować pozycję komórek satelitowych (pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną włókna mięśniowego) i stawać się komórkami z pełni wykształconym potencjałem miogennym. Dlatego uważa się, że komórki pochodzące ze szpiku stanowią pulę rezerwową dla populacji komórek satelitowych.



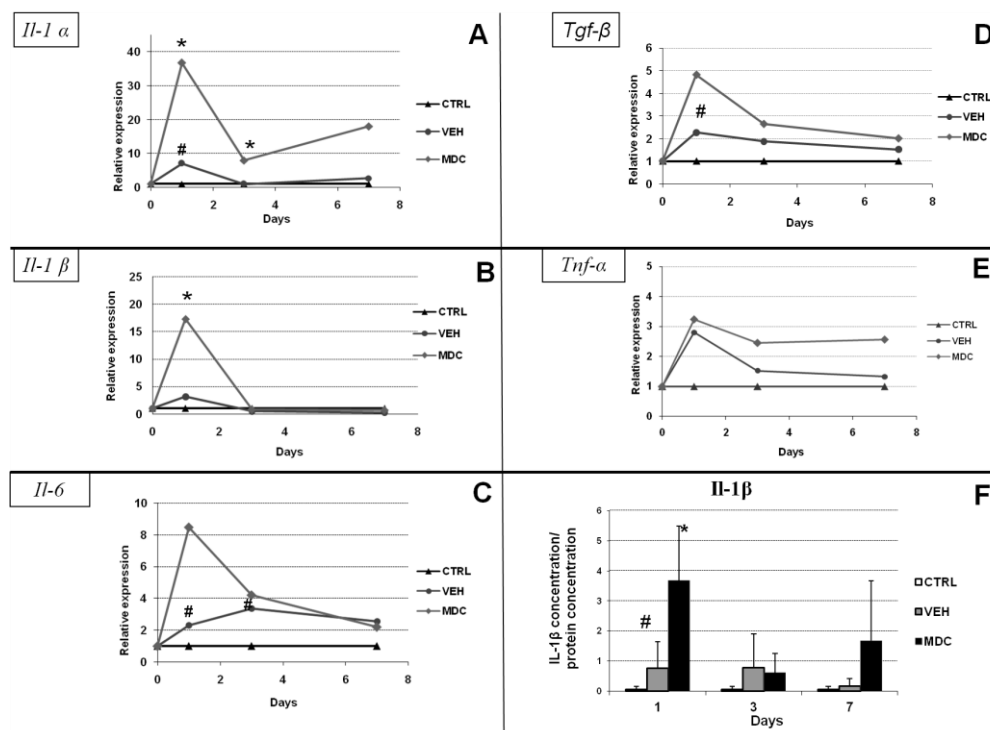
Rycina 1. Proponowane zależności pomiędzy komórkami pochodzącymi ze szpiku, multipotencjalnymi komórkami macierzystymi mięśni (MMDSC) i komórkami satelitowymi mięśni. MSC - mezenchymalne komórki macierzyste (zrębu), HSC - hematopoetyczne komórki macierzyste (rycina autorstwa Anny Burdzińskiej)

Nie wiadomo dotychczas, czy w naturalnych warunkach znaczenie tego zjawiska jest istotne czy marginalne. Niemniej, istnienie tej fizjologicznej zależności pomiędzy komórkami macierzystymi mięśni a mezenchymalnymi komórkami szpiku kostnego było jedną z podstaw do postawienia przeze mnie hipotezy, że kotransplantacja mioblastów i komórek MSC może poprawić skuteczność domięśniowych transplantacji komórkowych. Warto w tym miejscu nadmienić, że mięsień zwieracz zewnętrzny cewki moczowej (EUS, ang. external urethral sphincter) również posiada komórki satelitowe, które pełnią te same funkcje, co w mięśniach szkieletowych. Wydaje się zatem, że dozwieraczowe przeszczepienie mioblastów może być dokładną imitacją naturalnej regeneracji osłabionego zwieracza.

Dynamika procesu zapalnego w odpowiedzi na autologiczne przeszczepienie mioblastów do mięśnia szkieletowego (druga publikacja z cyklu).

Zajmując się tematyką transplantacji mioblastów nie sposób pominąć kwestii ich masowej utraty z miejsca przeszczepienia po domięśniowym wstrzyknięciu. Wykazano, że w przypadku przeszczepień allogenicznych, po 24 godzinach wykrywa się jedynie około 20-50% przeszczepionej liczby komórek. Ten odsetek spada do 5% po 5 dniach [Hodggets et al. 2001]. Co ciekawe, również mioblasty przeszczepione do mięśni szkieletowych w układzie autologicznym są eliminowane do poziomu około 10% wyjściowej liczby po 3 dniach [Holzer et al. 2005]. Jest kilka postulowanych przyczyn eliminacji

mioblastów po przeszczepieniu, z których najważniejsza to reakcja zapalna w miejscu wstrzyknięcia. Inne to niedokrwienie wewnątrz wstrzykniętej porcji, a także śmierć przez anoikis (indukowana brakiem sygnału dla receptorów integrynowych). Nasze wcześniejsze badania wykazały, że manipulacje chroniące przeszczepiane komórki przed stresem oksydacyjnym istotnie zwiększyły przeżycie mioblastów po autologicznym przeszczepieniu do mięśnia na modelu króliczym (publikacja poza cyklem, Bartoszek-Bruzzone, Burdzinska et al. 2012). Wskazywało to na znaczący wpływ stresu oksydacyjnego w procesie eliminacji komórek. Prawdopodobnym źródłem stresu oksydacyjnego jest wybuch tlenowy fagocytów w miejscu przeszczepienia. O ile reakcja zapalna po allogenicznym przeszczepieniu mioblastów była dość szczegółowo badana przez innych badaczy - to nieznanym był przebieg odpowiedzi immunologicznej na autologiczną transplantację mioblastów. W omawianej pracy autologiczne przeszczepienie mioblastów (nazywanych przez mnie komórkami izolowanymi z mięśni (MDC-ang. *muscle-derived cells*) ze względu na pewnego stopnia zanieczyszczenie uzyskiwanej populacji fibroblastami) było wykonane do mięśnia brzuchatego łydki na modelu szczurzym. Tkanki były analizowane 24 h, 3 i 7 dni po wstrzyknięciu. Wykazaliśmy, że najbardziej znaczący wzrost ekspresji cytokin (*Il-1 α* , *Il-1 β* , *Il-6*, *Tgf- β* , *Tnf- α*) w tkance otaczającej miejsce wstrzyknięcia miał miejsce 24 h po zabiegu iniekcji. Analiza tkanek z grup kontrolnych, którym podawano jedynie roztwór do zawieszania wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji *Il-1 α* , *Il-6*, *Tgf- β* grupie 24 h w stosunku do grupy nietraktowanej. Wstrzyknięcie komórek spowodowało znacząco silniejszą reakcję - ekspresja *Il-1 α* , *Il-1 β* była ponad 5-krotnie wyższa niż u zwierząt, którym wstrzyknięto płyn bez komórek (Dla *Il-1 β* $p < 0,05$). Wynik ten został dodatkowo potwierdzony dla IL-1 β na poziomie ekspresji białka. Po 7 dniach od procedury wstrzyknięcia nie wykazano żadnych różnic w ekspresji badanych genów pomiędzy grupami.



Rycina 2. Dynamika zmian ekspresji wybranych cytokin w mięśniu po autologicznym przeszczepieniu mioblastów. A-E) ekspresja genów 1, 3 i 7 dni po przeszczepieniu; CTRL - mięsień nietraktowany, VEH - mięsień po wstrzyknięciu roztworu do zawieszania komórek, MDC - mięsień po wstrzyknięciu komórek. # - $p < 0,05$ przy

porównaniu grup CTRL vs VEH (U Mann Whitney test); * - $P < 0,05$ przy porównaniu grup VEH vs MDC (U Mann Whitney test); F) ekspresja białka w tkankach, oznaczenia jak wyżej (rycina autorstwa Anny Burdzińskiej).

Analiza histochemiczna i immunohistochemiczna (IHC) pobranego materiału wykazała masywny naciek zarówno neutrofili jak i makrofagów w bezpośrednie sąsiedztwo przeszczepionych komórek. W punkcie czasowym 24 h makrofagi otaczały zgrupowania przeszczepionych komórek, natomiast po 3 dniach makrofagi wyznakowane jako komórki CD68+ pokrywały całkowicie obszar zajęty przez przeszczep. Po 7 dniach liczba przeszczepionych komórek, które byliśmy w stanie zidentyfikować w preparatach histologicznych, drastycznie zmalała. Obserwacja ta była potwierdzona przyżyciowym oznaczeniem fluorescencji pochodzącej ze znakowanych komórek (z użyciem systemu do przyżyciowego obrazowania IVIS). W badaniu IHC wokół komórek, które przeżyły 7 dni widoczne były jedynie pojedyncze leukocyty (IHC dla CD43) i makrofagi. Co więcej, zaobserwowano włókna z centralnie ułożonymi jądrami (co wskazuje na fazę regeneracji), które wykazywały fluorescencję pochodzącą z przeszczepionych komórek. Podsumowując, wyniki omawianej pracy wskazują, że:

- autologiczne domięśniowe przeszczepienie mioblastów indukuje klasyczną wczesną odpowiedź zapalną
- mioblasty wstrzyknięte do mięśnia szkieletowego w układzie autologicznym są w większości eliminowane z miejsca podania w ciągu 7 dni
- mioblasty, które przeżyły, uczestniczą w regeneracji mięśnia

Ocena efektów autologicznego przeszczepienia mioblastów z użyciem endoskopu na modelu świńskim (trzecia publikacja z cyklu).

Kolejnym krokiem w moim procesie badawczym było wykonanie docerkowej transplantacji komórkowej na dużym modelu zwierzęcym. Doświadczenia te były przeprowadzone w ramach realizacji projektu finansowanego przez MNiSW, którym kierowałam. Badania nad docerkowymi przeszczepieniami komórek na dużych modelach były wówczas bardzo nieliczne i wszyscy badacze wstrzykiwali komórki od strony błony surowiczej w trakcie laparotomii. Moim celem było przeprowadzić zabieg transplantacji w sposób jak najbardziej podobny do tego, w jaki byłby przeprowadzony u kobiet. Zaplanowaliśmy zatem wykonanie autologicznej transplantacji komórek miogennych mało inwazyjną, przezcewkową metodą z użyciem endoskopu. Wykorzystanie dużego modelu zwierzęcego pozwoliło także na bardziej wiarygodną ocenę czynnościową efektów transplantacji (badanie urodynamiczne - profilometria cewkowa). Średnia liczba wstrzykiwanych komórek wynosiła 6×10^7 , co jest porównywalne z dawką komórek stosowaną w docerkowych wstrzyknięciach u pacjentów podczas dotychczasowych prób klinicznych. Doświadczenie było przeprowadzone na samicach świni domowej w ścisłej współpracy osób z trzech jednostek: 1) Pracowni Hodowli Komórkowych Kliniki Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewn. WUM, 2) Kliniki Urologii WUM i 3) Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Przeprowadziliśmy udaną optymalizację warunków izolacji i hodowli świńskich mioblastów izolowanych z fragmentu mięśnia szkieletowego kończyny miednicznej. Komórki były przeszczepiane po 3 pasażu i 2 tygodniach hodowli (u 6 zwierząt). Przed przeszczepieniem, były znakowane czerwonym fluorochromem (PKH26), który wiąże się z błoną komórkową. Barwienie to ma wiele zalet - jest nietoksyczne, nieimmunogenne, i krótkoterminowo bardzo efektywne. Wadą jest natomiast fakt, że podczas podziałów komórkowych skupienie barwnika w błonie ulega rozrzedzeniu. Nasze wyniki doświadczeń *in vitro* pokazały, że po około 10 podziałach fluorochrom przestaje być wykrywalny. Zawiesina

komórek była u każdego zwierzęcia podawana w 3 porcjach (depotach) pod kontrolą endoskopową. Cewki analizowano po 4 tygodniach od procedury wstrzyknięcia. W celu wykazania przeszczepionych komórek, całe cewki były krojone na preparaty histologiczne (przekroje poprzeczne). Metoda ta była bardzo pracochłonna, ponieważ średnia długość cewki moczowej u świni wynosi ok. 7 cm, a grubość pojedynczego skrawka ok. 10 μm . Analiza przygotowanych preparatów wykazała, że wyznakowane komórki wciąż były obecne w ścianie cewki moczowej u 5 z 6 zwierząt. Komórki były ułożone w odgraniczone skupiska, co najprawdopodobniej odpowiadało poszczególnym wstrzyknięciom. Wynikało z tego, że migracja mioblastów po wstrzyknięciu była bardzo ograniczona. Ich zachowana fluorescencja wskazywała, że nie były szczególnie aktywne proliferacyjnie. Skupiska wstrzykniętych komórek były zlokalizowane w różnych warstwach cewki ściany cewki moczowej, a ich morfologia różniła się w zależności od lokalizacji depotu. W komórkach, które udało się zdeponować w warstwie mięśniowej (w zewnętrznym zwieraczu cewki, EUS), można było wykazać ekspresję desminy - miogenego markera, a część włókien EUS wykazywała fluorescencję charakterystyczną dla PKH26, co wskazywało na integrację części przeszczepu ze zwieraczem. Ponadto, ocena obecności receptora dla acetylocholin (AChR) za pomocą fluorescencyjnie znakowanej α -bungarotoksyny wykazała ekspresję AChR w bliskim sąsiedztwie włókien wykazujących obecność PKH26. Wynik ten sugerował unerwienie włókien zawierających wstrzyknięte komórki. Co ciekawe, przeszczepione komórki odnajdywane w warstwie podśluzówkowej lub pod błoną surowiczą nie wykazywały ekspresji miogenego markera ani innych cech charakterystycznych dla struktur mięśniowych (np. tworzenia się miotub). Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że los przeszczepionych komórek jest uzależniony od niszy, do której komórki zostaną wprowadzone. A zatem, kluczowa wydaje się celność przeszczepień. W sytuacji, gdzie celem jest wspomaganie mięśnia zwieracza, komórki miogenne powinny być wprowadzone do zwieracza. Profilometria cewkowa wykonana u zwierząt doświadczalnych w opisywanym badaniu wskazała, że przeszczepienie komórek nie doprowadziło do istotnie statystycznego wzrostu maksymalnego zamknięcia cewki moczowej w stosunku do grupy kontrolnej. Wydaje się, że najbardziej prawdopodobne przyczyny takiego wyniku są następujące: 1) liczba komórek celnie wstrzyknięta w mięsień zwieracz była niewystarczająca do wywołania efektu funkcjonalnego, 2) użycie młodych, zdrowych zwierząt do doświadczenia nie pozwoliło na uzyskanie poprawy domknięcia cewki. Podsumowując, wyniki omawianej pracy wskazują, że:

- komórki wstrzyknięte do ściany cewki moczowej w układzie autologicznym przeżywają co najmniej 4 tygodnie
- migracja przeszczepionych lokalnie mioblastów jest bardzo ograniczona
- różnicowanie się komórek miogennych po przeszczepieniu zależy od niszy do której zostaną wprowadzone
- mioblasty wprowadzone bezpośrednio do zwieracza zewnętrznego przynajmniej w części integrują się z lokalną tkanką
- mioblasty wstrzyknięte poza EUS nie tworzą w cewce moczowej ektopowych struktur mięśniowych
- **kluczowe jest celne wprowadzanie komórek w konkretną warstwę ściany cewki moczowej**
- **precyzyjna i powtarzalna aplikacja zawiesiny komórek przy użyciu standardowego endoskopu jest praktycznie niemożliwa**

Jednocześnie, przeprowadzone badanie wskazało na ograniczenia związane z użyciem modelu świńskiego do doświadczeń nad transplantacjami docewkowymi. Specyfika anatomii samiczej cewki moczowej powodowała trudności techniczne przy cewnikowaniu (obecność uchyłka podcewkowego,

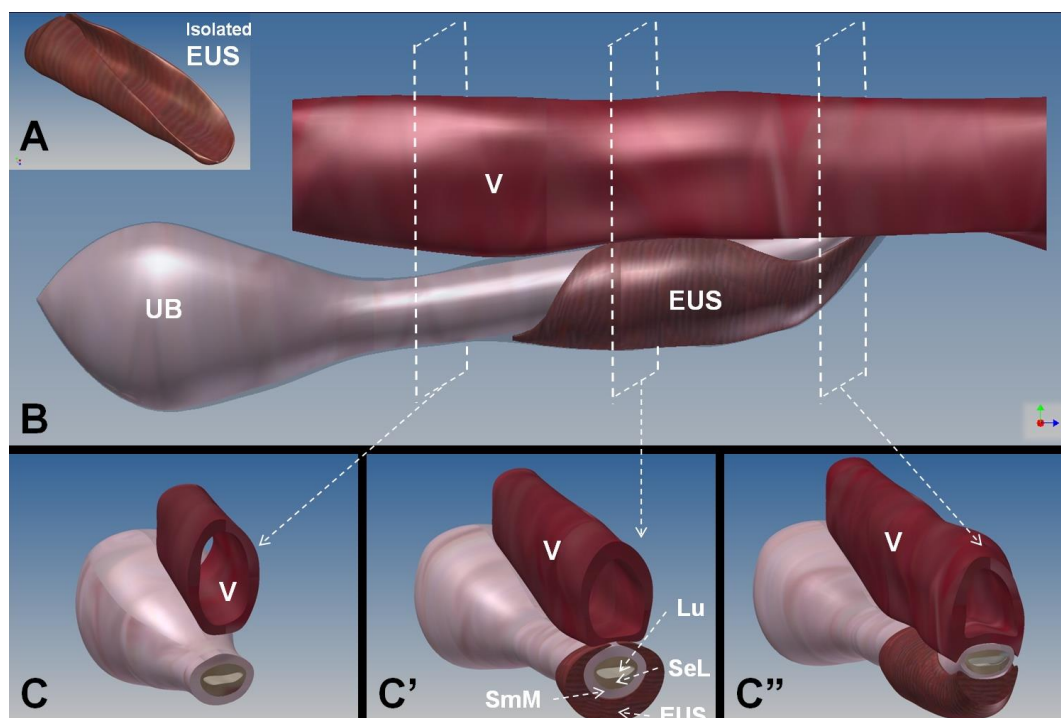
głęboki przedsiemek pochwy). Użyte w badaniu zwierzęta rosły intensywnie i były niedojrzałe płciowo, zatem nie były dobrym modelem doświadczalnym. Prowadzenie doświadczeń na dorosłych świnich powodowałoby (ze względu na masę zwierząt) poważne problemy logistyczne, techniczne i generowałyby znaczny wzrost kosztów.

Wnioski, które wyciągnęłam z badania na modelu świńskim, skłoniły mnie do napisania nowego projektu, który miał na celu udoskonalić techniki wstrzyknięć docewkowych. **Projekt pt. "Los mioblastów i mezenchymalnych komórek macierzystych po transplantacji do zwieracza cewki moczowej. Badanie porównawcze na dużym modelu zwierzęcym"** został zatwierdzony do finansowania przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu POMOST. Głównymi celami tego projektu były:

1. Poszukiwanie alternatywnego gatunku dużego zwierzęcia do testowania docewkowych wstrzyknięć komórkowych
2. Porównanie efektów przeszczepienia komórek izolowanych z mięśni (mioblastów) i mezenchymalnych komórek macierzystych (zrębu) izolowanych ze szpiku
3. Ocena efektów kotransplantacji obu wymienionych powyżej typów komórek
4. Wytworzenie prototypu urządzenia do promienistych wstrzyknięć docewkowych

Opisanie samiczej cewki moczowej kozy i kozich komórek izolowanych z mięśni i szpiku kostnego (czwarta publikacja cyklu).

Przeprowadzenie doświadczeń na dużym modelu zwierzęcym jest w wielu przypadkach kluczowym elementem badań przedklinicznych przed ewentualnym wprowadzeniem nowej metody leczenia do kliniki. Nasze wyniki z doświadczeń na świnich potwierdziły tę tezę – wykazaliśmy problem ograniczonej celności wstrzyknięć przy użyciu endoskopu – jest to trudność, która nie mogła z przyczyn obiektywnych być zdefiniowana przy testach na małych modelach zwierzęcych. Było dla mnie oczywiste, że przed ewentualnymi próbami klinicznymi należy podjąć próbę udoskonalenia techniki wstrzyknięć. Moim celem było maksymalnie zbliżyć się w postępowaniu przedklinicznym do potencjalnego protokołu klinicznego. Wymagało to użycia gatunku zwierzęcia, które miałyby podobną anatomię cewki moczowej do człowieka. Postanowiłam zbadać anatomię cewki koziej – zwierzęcia, któremu stosunkowo łatwo stworzyć dobre warunki bytowania podczas eksperymentów. Przeprowadziliśmy kompleksową analizę budowy samiczej cewki moczowej kozy – od oceny makroskopowej, poprzez analizę mikroskopową, po testy czynnościowe (profilometria cewkowa, za tę część badań odpowiedzialny był urolog, dr hab. Bartosz Dybowski). Wykazaliśmy, że średnia długość funkcjonalna cewki (na podstawie badania urodynamicznego) wynosi $3,75 \pm 0,7$ cm. Zwieracz zewnętrzny cewki moczowej na przekroju poprzecznym miał kształt podkowy i był ulokowany w środkowej i dystalnej części cewki. W środkowej części cewki miał średnią grubość 2,1 mm, co stanowiło średnio 37% grubości ściany cewki moczowej (w tę część planowaliśmy wprowadzić zawieszinę komórek). Na podstawie przeprowadzonych badań wytworzyliśmy cyfrowy model 3D koziej cewki moczowej. Średnie maksymalne ciśnienie zamknięcia cewki wynosiło $63,5 \pm 6,9$ cmH₂O.



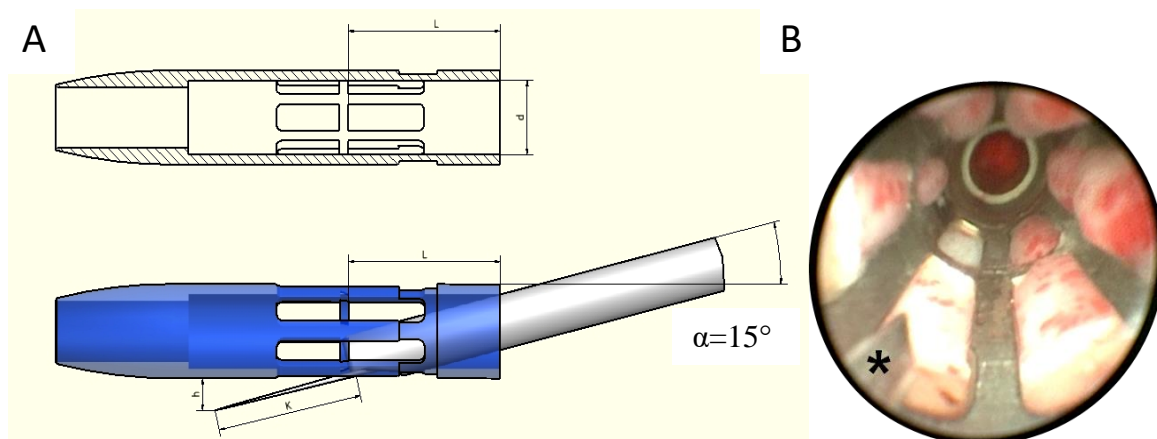
Rycina 4. Model 3D samiczej cewki moczowej kozy ze szczególnym uwzględnieniem usytuowania zwieracza zewnętrznego cewki (EUS). A). kształt EUS w rzucie izometrycznym; B) boczny widok cewki moczowej, pęcherza moczowego (UB) i fragmentu pochwy (V). C, C', C'' izometryczne rzuty cewki moczowej i pochwy odcięte na różnych poziomach (odpowiadających płaszczyznom na obrazie 4B). Lu - światło cewki moczowej; SeL - warstwa podnabłonkowa; SmM - warstwa mięśni gładkich. Rycina przygotowana przez P. Kaupę na podstawie projektu Anny Burdzińskiej w oparciu o wyniki badań zespołu kierowanego przez Annę Burdzińską.

Wszystkie te dane wskazują, że kozia samicza cewka moczowa ma parametry najbardziej podobne do kobiecych spośród dotychczas wykorzystywanych modeli (świnia, pies, małpa z rodzaju makaków). Przeprowadziliśmy optymalizację izolacji i hodowli kozich mioblastów i mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) izolowanych ze szpiku kostnego. Wykazaliśmy, że przy zastosowaniu takiej samej standardowej pożywki (DMEM + 10% bydlęcej surowicy płodowej, FBS) komórki MSC wykonują podziały istotnie częściej ($p < 0,05$) niż komórki izolowane z mięśni. Zastosowanie pożywki wzbogaconej o dodatkowe 5% surowicy końskiej do hodowli komórek z mięśni zniwelowało te różnice. Średni czas podwojenia populacji wynosił wówczas 37 godzin dla MSC i 40 godzin dla komórek z mięśni ($p > 0,05$). Opracowana metoda izolacji i hodowli pozwoliła na powtarzalny uzysk ponad 30 mln komórek każdego typu od pojedynczego zwierzęcia po 3 tygodniach hodowli (na poziomie 3 pasażu). W omawianej pracy opisaliśmy obniżanie się indeksu fuzji mioblastów w późnej fazie różnicowania. Zastosowanie przyżyciowego obrazowania komórek pozwoliło na wyjaśnienie tego zjawiska. Okazało się, że miotuby w trakcie przyłączania nowych komórek (co wiąże się ze zwiększeniem masy i potencjału kurczliwego struktury) po osiągnięciu punktu krytycznego tracą adhezję do podłoża, kurczą się tworząc kulistą strukturę i umierają. Obserwacja ta potwierdziła wcześniejsze doniesienia, że bardzo ważne jest niedopuszczanie do spontanicznej fuzji mioblastów podczas hodowli w celu przygotowania komórek do transplantacji. Wykazaliśmy, że w przypadku kozich komórek zastosowanie dodatku zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (rekomendowanego w hodowlach mioblastów izolowanych z innych gatunków) nie jest korzystne. Naszą strategią było pasażowanie komórek przed włączeniem ścieżek spontanicznego różnicowania miogenne. Podsumowując, wyniki omawianej pracy wskazują, że:

- Zarówno anatomiczne jak i czynnościowe parametry samiczej cewki moczowej kozy są bardzo podobne do kobiecej
- Kozie mioblasty i komórki MSC przy odpowiednim traktowaniu zachowują się w hodowli w sposób powtarzalny; możliwe jest pozyskanie odpowiedniej liczby komórek do autologicznej transplantacji po pobraniu biopsji, która nie upośledza funkcjonowania zwierzęcia
- Kozia wydaje się bardzo atrakcyjnym gatunkiem dużego zwierzęcia do testowania efektów docewkowych transplantacji komórkowych

Wytworzenie przewodnicy igły endoskopu. Ocena celności wstrzyknięć docewkowych na dużym modelu zwierzęcym (piąta publikacja z cyklu).

Dane literaturowe w połączeniu z wynikami własnymi uzyskanymi na modelu świńskim skierowały moją uwagę na kwestię celności docewkowych przeszczepień komórkowych. Rezultaty docewkowych transplantacji komórek na małych modelach zwierzęcych w omawianym obszarze były bardzo obiecujące, natomiast dotychczasowe wyniki prób klinicznych są słabsze od oczekiwanych. Analizując nasze wyniki doświadczeń na modelu świńskim doszłam do wniosku, że jedną z przyczyn wspomnianych rozbieżności może być słaba celność wstrzyknięć przezcewkowych (czyli wykonywanych od strony światła cewki moczowej) - techniki najczęściej stosowanej u ludzi, a niemożliwej do wykonania u szczurów. Choć nasze wcześniejsze wyniki wskazywały (trzecia publikacja cyklu), że celność iniekcji przezcewkowych jest ograniczona, to nie wykonaliśmy wówczas wiarygodnej oceny precyzji tych wstrzyknięć. W ramach projektu wykonywanego na modelu kozim postanowiłam podjąć próbę określenia celności docewkowych przeszczepień zawiesiny komórek. Dzięki zdobytemu wcześniej doświadczeniu byliśmy w stanie zdefiniować najważniejsze problemy techniczne związane z procedurą tych wstrzyknięć. Podanie komórek na określoną głębokość ściany narządu rurowego, jakim jest cewka moczowa, jest zależna od kąta nachylenia igły (w stosunku do osi długiej cewki), a także od długości wprowadzonego w tkankę fragmentu igły. Użycie standardowego cystoureteroskopu uniemożliwia podawanie zawiesiny pod zadany kąt. Dodatkowym, istotnym utrudnieniem jest giętkość cewki moczowej. W momencie wkłucia igły cewka ugina się pod naporem zadanej siły, co wpływa dodatkowo na kąt wkłucia igły. W celu ograniczenia tych problemów opracowaliśmy nowatorskie rozwiązanie (będące później przedmiotem zgłoszenia patentowego). Zaprojektowaliśmy i wykonaliśmy prototyp przewodnicy igły endoskopu do wykonywania wstrzyknięć pod określonym kątem. Przewodnica ma postać sztywnej tulei z podłużnymi otworami rozłokowanymi promieniście. Podłużne otwory przedziela poprzeczna belka (Ryc.5.). Wytworzony przez nas prototyp miał odpowiedni kształt i wielkość, aby mógł być w sposób mało inwazyjny wprowadzony do cewki moczowej dorosłej kozy. W założeniu, endoskop w momencie wstrzyknięcia ustawia się na dwóch punktach podparcia - pierwszy, przedni punkt podparcia jest na poprzecznej belce, a drugi, tylny punkt podparcia jest na tylnej krawędzi tulei.



Rycina.5. A) Schemat prototypu prowadnicy igły cystoskopu do wykonywania promienistych wstrzyknięć do cewki moczowej żeńskiej (samicy) pod zadaniem kątem (schemat wykonany przez Patryka Kaupę, współautora pracy na podstawie projektu autorstwa: Burdzińska, Kaupa, Dybowski), B) Endoskopowy widok prowadnicy igły cystoskopu umieszczonej wewnątrz cewki moczowej. * - końcówka igły przed wktuciem w śluzówkę.

Odpowiednie dobranie parametrów geometrycznych elementów składowych prowadnicy umożliwia uzyskanie danego kąta aplikacji igły. Przykładowo, jeżeli średnica wewnętrzna d tulei po stronie jej tylnego zakończenia (która stanowi tylny punkt podparcia) wynosi 6 mm, a odległość L (od tylnego zakończenia tulei od przedniego punktu podparcia endoskopu) wynosi 22 mm, uzyskuje się kąt aplikacji igły α wynoszący 15° . Wartość kąta α wylicza się z prostych zależności geometrycznych, gdzie $\text{tg}(\alpha) = d/L$. Dodatkowym elementem zestawu, który umożliwia wysuwanie się igły poza prowadnicę na daną, powtarzalną długość jest blokada igły, która umieszczona jest w obszarze przeciwnym do zakończenia aplikacyjnego igły. Łącznie z ustalonym kątem wktucia daje to możliwość wykonywania powtarzalnych wstrzyknięć na daną głębokość w głąb tkanki (patent europejski EP 16155346.6, Nr publikacji: EP 3 056 134, autorzy: Burdzińska A, Dybowski B, Kaupa P).

Celem omawianej pracy była ocena precyzji docewkowych iniekcji wykonanych pod kontrolą wzroku, z użyciem endoskopu i opisanej powyżej prowadnicy. Dodatkowo, ocenie poddano celność wstrzyknięć okołocewkowych. Technika wstrzyknięć okołocewkowych polega na wykonaniu przeskórnych iniekcji równoległe do osi cewki moczowej i jest drugą (obok przezcewkowych), akceptowalną metodą docewkowych wstrzyknięć podczas prób klinicznych u kobiet. Materiałem w tym badaniu były cewki zwierząt, u których wykonano uprzednio autologiczne przeszczepienia znakowanych komórek. Celność wstrzyknięć przezcewkowych oceniano w cewkach moczowych pobranych od 11 zwierząt. U każdego zwierzęcia wykonano 8 wstrzyknięć (wszystkie podczas jednego zabiegu) – łącznie analizowano celność 88 iniekcji przezcewkowych). Objętość i szybkość podania poszczególnych porcji komórek były ujednoczone dzięki zastosowaniu wytworzonego przez nasz zespół urządzenia do automatycznego dozowania zawiesiny komórek (zadane parametry wstrzykiwania jednej porcji: 50 μl , 11 $\mu\text{l/s}$). Wiarygodna ocena celności iniekcji jest trudnym zadaniem. Po zakończeniu eksperymentu nie wiadomo dokładnie, gdzie znajdują się podane porcje komórek, dlatego konieczna jest dokładna kontrola całego narządu. We wcześniejszych badaniach precyzję wstrzyknięć do cewki moczowej oceniano za pomocą analizy mikroskopowej kolejnych przekrojów histologicznych. Jest to metoda bardzo czasochłonna i uniemożliwiająca jednoczesną analizę ilościową/półilościową przeżycia przeszczepu. Dlatego, w niniejszym badaniu, zastosowaliśmy nowatorski, trójstopniowy protokół analizy eksplantów: 1) badanie przesiewowe całych narządów za pomocą systemu obrazowania *in vivo* (IVIS) połączone z zebraniem danych do późniejszej

półilościowej analizie przeżycia przeszczepu (opisane w szóstej pracy cyklu), 2) systematyczna analiza mikroskopowa surowych przekrojów o grubości 10 μm , 3) immunohistochemia wybranych przekrojów umożliwiająca potwierdzenie lokalizacji przeszczepu w obrębie ściany cewki moczowej. Wykorzystanie systemu do obrazowania *in vivo* do oceny obecności znakowanego fluorescencyjnie przeszczepu komórkowego w narządach pobranych od dużych zwierząt nie było wcześniej opisane w literaturze. Nasz zespół pod moim kierownictwem (ze szczególnym udziałem pani mgr Weroniki Zarychta-Wiśniewskiej i dr hab. Radosława Zagożdżona) wykazał wcześniej, że takie obrazowanie *ex vivo* jest odpowiednią metodą do określania lokalizacji skupisk komórek barwionych fluorochromami z zakresu dalekiej czerwieni (Zarychta-Wiśniewska et al. 2016, publikacja poza cyklem). W opisywanej pracy z cyklu wykazaliśmy, że większość porcji komórkowych (67%) wstrzykiwanych przezcewkowo została podana do ściany cewki moczowej. Spośród tych, które były zlokalizowane w ścianie cewki moczowej 26% znajdowało się w zwieraczu zewnętrznym cewki moczowej, czyli obszarze najbardziej pożądanym (szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 1). Tylko u jednego zwierzęcia (spośród 11) nie znaleziono żadnej porcji komórek w mięśniach EUS. Co ciekawe, procentowy odsetek porcji komórkowych wstrzykniętych do ściany cewki i do EUS był bardzo podobny przy wstrzyknięciach okołocewkowych (tabela 1). Należy jednak podkreślić, że liczba wstrzyknięć okołocewkowych wykonanych w doświadczeniu była kilkukrotnie mniejsza (analizowano celność 16 iniekcji; głównym celem doświadczenia była ocena precyzji wstrzyknięć z użyciem endoskopu i prowadnicy).

Średnia precyzja wstrzyknięć [%]	okołocewkowe (n=16)	przezcewkowe (n=88)
Liczba porcji komórek zlokalizowanych w ścianie cewki w stosunku do liczby wszystkich wstrzyknięć	68,70%	67,02%
Liczba porcji komórek zlokalizowanych w EUS w stosunku do tych odnalezionych w ścianie cewki	27,25%	26,32%
Liczba porcji komórek zlokalizowanych w EUS w stosunku do liczby wszystkich wstrzyknięć	18,75%	17,05%

Tabela 1. Średnia precyzja wstrzyknięć komórek do ściany cewki moczowej. Oceniano liczbę i lokalizację porcji przeszczepionych komórek w ścianie cewki moczowej. Okołocewkowe – wstrzyknięcia przezskórne, równoległe do cewki moczowej; przezcewkowe – wstrzyknięcia od strony światła cewki, w użyciu endoskopu i prowadnicy. EUS – zwieracz zewnętrzny cewki moczowej

Podczas opisywanych doświadczeń dokumentowaliśmy również przypadki krwawień i wycieków zawiesiny komórkowej podczas wycofywania igły z tkanki po iniekcji. Było to możliwe dzięki zastosowaniu prowadnicy, która napinała błonę śluzową cewki, a także wizualizacji procesu transplantacji na ekranie monitora. Po każdym wstrzyknięciu obserwowano, czy nie nastąpiło krwawienie lub wyciek zawiesiny. W grupie przezcewkowej zauważyliśmy jednoznaczny wyciek zawiesiny komórek w 19% iniekcji i nieznaczne samoograniczające się krwawienie w 42% nakłuć. Nieznaczne krwawienie po wycofaniu igły może wystąpić we wszystkich rodzajach iniekcji. Jego znaczenie w odniesieniu do wstrzyknięć przezcewkowych nie jest znane. W większości wcześniejszych badań odnotowano jedynie "godne uwagi" krwawienia. Jednak jest bardzo prawdopodobne, że nawet niewielki wyciek krwi powoduje wypłukiwanie części dawki komórkowej. Możliwe, że utrata zawiesiny komórek po wycofaniu igły przyczynia się do ograniczenia skuteczności docewkowych terapii komórkowych. Wydaje się, że rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie igieł o cienkich końcach aplikacyjnych (nasze doświadczenia wskazały, że nawet zastosowanie igły 27G nie było wyraźnie szkodliwe dla wstrzykiwanych komórek). Alternatywną strategią może być stosowanie

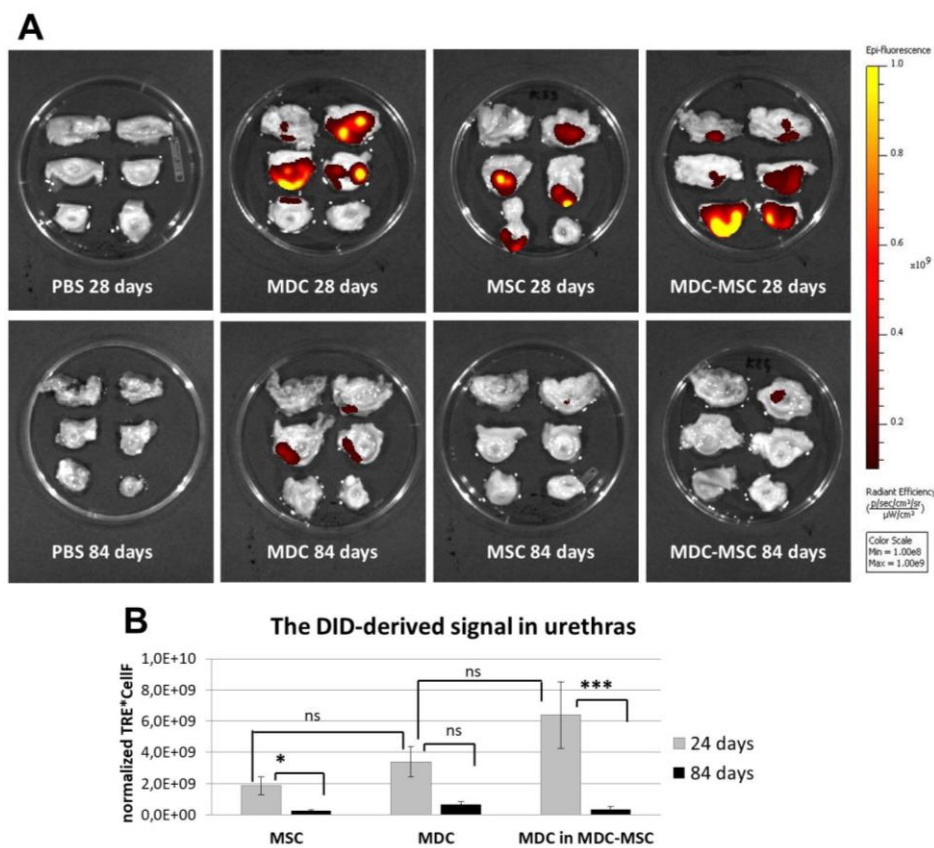
nośników komórkowych o podwyższonej lepkości. Podsumowując, najważniejsze wnioski płynące z omawianej pracy to:

- przy zastosowaniu nisko inwazyjnych technik celne wstrzyknięcia w EUS są rzadkie (poniżej 20% iniekcji)
- wykonanie 8 iniekcji w układzie stosowanym w naszym eksperymencie daje bardzo wysokie prawdopodobieństwo (ponad 90%), że przynajmniej część przeszczepu znajdzie się w mięśniu zwieracza zewnętrznym, czyli w najbardziej pożądanej lokalizacji
- ograniczona celność wstrzyknięć razem z częściową utratą zawiesiny przez wycieki po iniekcjach mogą być ważnym powodem niskiej skuteczności docewkowych przeszczepień komórek w dotychczasowych próbach klinicznych
- technikę przezcewkową i okołocewkową można traktować jako komplementarne, a użycie obu rodzajów iniekcji podczas jednej procedury może zwiększyć szansę na celne dostarczenie komórek.

Ocena efektów docewkowej ko-transplantacji komórek MSC i mioblastów (szósta publikacja z cyklu).

Jedną z moich głównych hipotez badawczych projektu finansowanego przez FNP stanowiła, że kotransplantacja mioblastów i MSC ze szpiku zwiększy skuteczność docewkowego przeszczepienia w porównaniu do efektów podania pojedynczych populacji. Komórki izolowane z mięśni i komórki MSC to dwa najczęściej proponowane typy komórek do wstrzyknięć docewkowych. Przez pierwsze 10 lat prowadzenia badań nad przeszczepieniami komórek do cewki moczowej wykorzystywano prawie wyłącznie komórki miogenne izolowane z mięśni szkieletowych. Natomiast od roku 2010 nastąpił zdecydowany zwrot zainteresowań badaczy i wszystkie publikowane wyniki badań na małych modelach zwierzęcych dotyczą wstrzyknięć komórek MSC, a nie komórek pochodzenia mięśniowego (MDC – *ang. muscle-derived cells*). Zbiegło się to z ogólnoswiatową eksplozją badań nad właściwościami MSC i ich zastosowaniem w medycynie. Potencjalny mechanizm terapeutycznego działania MSC po podaniu do niewydolnej cewki nie był jasny, ponieważ potencjał do różnicowania miogennej komórek MSC jest bardzo ograniczony. Wielu badaczy promuje obecnie pogląd, że komórki efekt działania MSC jest oparty na ich aktywności parakrynej. Uważa się, że wydzielane przez komórki MSC cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostowe mogą stymulować endogenne procesy naprawcze. Taka koncepcja mechanizmu działania MSC jest proponowana również w odniesieniu do przeszczepień docewkowych [Deng et al. 2016]. Co ciekawe, nie było żadnych bezpośrednich badań porównawczych pomiędzy tymi dwoma typami komórek, które by dotyczyły przeszczepień docewkowych. Moja koncepcja kotransplantacji opierała się na dwóch głównych założeniach: 1. Bezpośrednie sąsiedztwo mioblastów może pomóc aktywować ścieżki miogenne w komórkach MSC; 2. Obecność MSC może zwiększyć przeżycie i/lub proliferację przeszczepionych mioblastów poprzez działanie parakryne. W badaniach wstępnych, oceniliśmy wzajemne oddziaływanie komórek MSC i komórek z mięśni w bezpośredniej i pośredniej współhodowli *in vitro* (wyniki opisane w pracy poza cyklem: Kulesza, Burdzińska et al. 2016). Mimo, że część postawionych przez hipotez nie znalazła potwierdzenia w opisywanych doświadczeniach *in vitro*, to wyniki sugerowały, że domięśniowa ko-transplantacja obu typów komórek może przynieść korzystny skutek. W omawianym badaniu wykonaliśmy autologiczne przeszczepienia komórek do ściany cewki moczowej u 3 grup zwierząt (n=6 w grupie). Grupa MDC otrzymała komórki izolowane z mięśni (mioblasty), grupa MSC otrzymała komórki MSC, a grupa MDC-MSC otrzymała mieszaną populację komórek MSC i mioblastów. Grupę

kontrolną stanowiły zwierzęta, które przeszły te same procedury, ale zamiast zawiesiny komórek otrzymały PBS (n=5). Doświadczenie było tak zaplanowane, aby w jednym secie eksperymentalnym znajdowało się po 1 zwierzęciu z każdej grupy. Do doświadczenia wykorzystane zostały samice kóz ze stada o użytkowaniu mlecznym - wielokrotnie rodzące i w podeszłym wieku. Założyłam, że u tych zwierząt zwieracz cewki może być osłabiony i możliwe będzie zaobserwowanie ewentualnej poprawy. W naszych wcześniejszych badaniach zaproponowaliśmy metodę uszkodzenia zwieracza cewki moczowej u świń (publikacja poza cyklem, Burdzinska et al. 2012), jednak nasza ocena efektów uszkodzenia była przeprowadzona jedynie 1 miesiąc po zabiegu. W tym badaniu planowałam przeprowadzić obserwację również po 3 miesiącach, dlatego zdecydowałam się na opisane powyżej alternatywne podejście. Dzięki temu, zwierzęta biorące udział w doświadczeniu przechodziły tylko mało inwazyjne procedury: biopsja, badanie urodynamiczne i wstrzyknięcie zawiesiny z użyciem endoskopu. Po 1 lub 3 miesiącach od zabiegu wstrzyknięcia zwierzęta były poddawane eutanazji w celu pobrania cewek do dalszych analiz. Do oceny obecności przeszczepionych komórek wykorzystaliśmy nasz, wspomniany wcześniej, nowatorski system oceny eksplantów z użyciem systemu do przyżyciowego obrazowania (IVIS®). Opracowany przez nas protokół obrazowania wyizolowanego narządu pozwalał na ocenę lokalizacji przeszczepionych skupisk komórek znakowanych barwnikiem DID bez konieczności krojenia całych cewek na preparaty mikroskopowe. Ponadto, umożliwił półilościową analizę porównawczą siły sygnału pochodzącego z przeszczepu. Analiza cewek pobranych po 1 miesiącu wykazała obecność przeszczepionych komórek u wszystkich zwierząt, niezależnie od grupy badanej. W tym punkcie czasowym najsilniejszy sygnał zanotowano w cewkach grupy MDC-MSC, jednak nie różnił się on istotnie statystycznie od pozostałych grup doświadczalnych (Rycina 6.).



Rycina 6. Wizualizacja skupisk komórkowych znakowanych DID w cewkach moczowych kóz przy użyciu systemu obrazowania in vivo. A) Każdy obraz przedstawia jedną cewkę pociętą na fragmenty. Żółte plamy ilustrują obszary o najsilniejszej fluorescencji pochodzącej od DID. Im ciemniejszy kolor plamy, tym słabszy sygnał. Specyficzną fluorescencję

zidentyfikowano za pomocą zautomatyzowanego algorytmu rozdzielania widm. Obrazy są prezentowane po ręcznym wyrównaniu do tych samych ustalonych zakresów. Pasek skali kolorów pokazuje zakres od najsilniejszego do najsłabszego sygnału (1×10^8 - 1×10^9). Górny rząd przedstawia cewki moczowe izolowane po 28 dniach po wstrzyknięciu PBS (kontrola negatywna) lub transplantacji różnych typów komórek: MDC, MSC i MDC-MSC. Niższy rząd przedstawia cewki moczowe pobrane 84 dni po wstrzyknięciu. Do ryciny wybrano cewki z najsilniejszym sygnałem dla każdej grupy badanej. B) Natężenie fluorescencji pochodzącej od DID w cewkach moczowych z różnych grupach doświadczalnych i różnych punktach czasowych. Dane są przedstawione jako średnia (\pm SEM) całkowitej efektywności promieniowania punktu świetlnego (TRE, [fotony / s] / [μ W / cm²]) znormalizowanego do prób kontrolnych (grupa PBS). Wartości uwzględniają liczbę wstrzykniętych komórek znakowanych DID u każdego zwierzęcia. * -, $p < 0,05$; *** -, $p < 0,001$, ns - statystycznie nieistotne (Rycina przygotowana przez Annę Burdzińską przy współpracy Weroniki Zarychta-Wiśniewskiej i Radosława Zagożdżona).

Ocena cewek pobranych po 3 miesiącach nie wykryła obecności komórek tylko u jednego z badanych zwierząt (z grupy MDC-MSC, w tej grupie tylko jeden typ komórek był znakowany DID, czyli liczba znakowanych komórek było około 2-krotnie niższa w tej grupie niż w pozostałych grupach badanych). Średnia siła sygnału pochodzącego z przeszczepu była istotnie niższa po 3 miesiącach niż po 1 miesiącu w grupach MSC i MDC-MSC (odpowiednio $p=0,018$ i $p=0,0007$). W grupie MDC również zanotowano znaczący spadek sygnału po 3 miesiącach w porównaniu do cewek pobranych po 1 miesiącu, jednak nie była to różnica istotna statystycznie ($p=0,15$). Analiza profilu określającego ciśnienie panujące w świetle cewki moczowej (UPP, *ang. urethral pressure profile*) była u każdego zwierzęcia przeprowadzona w trzech punktach czasowych – podczas pobrania biopsji (UPP1), przed wykonaniem transplantacji (UPP2), i w dniu zakończenia doświadczenia (UPP3). Protokół wykonania oceny urodynamicznej był zoptymalizowany i obejmował kontrolę wielu czynników podczas przeprowadzania badania (opisane w publikacji poza cyklem – Dybowski et al. 2016). Pod ocenę brano dwa parametry zapisu – MUCP (maksymalne ciśnienie zamknięcia cewki) i FA (całkowite pole po krzywą profilu). Wykazaliśmy, że jedynie w grupie MDC-MSC nastąpił wzrost obu parametrów u każdego zwierzęcia w grupie ($p=0,02$ dla MUCP i $p=0,04$ dla FA, test Wilcoxon) po transplantacji w porównaniu do parametrów wyjściowych. W innych grupach efekty transplantacji różniły się u poszczególnych zwierząt – obserwowaliśmy wzrost, brak zmian lub spadek badanych parametrów. W grupach MDC i MSC wartości MUCP i FA po transplantacji nie były istotnie różne od pomiarów sprzed transplantacji. Ze względu na znaczącą zmienność indywidualną efektów w tych dwóch grupach badanych, analizowaliśmy dodatkowo stopnie korelacji naszych wyników czynnościowych z różnymi parametrami, jak np. liczbą wstrzykniętych komórek, liczbą zidentyfikowanych porcji komórkowych w ścianie danej cewki, a także liczbą zidentyfikowanych porcji komórkowych w obrębie EUS danej cewki. Żaden z powyższych parametrów nie wykazał istotnej korelacji z efektem funkcjonalnym. Jedynym parametrem, który okazał się znaczący, to wyjściowy poziom parametrów UPP przed wykonaniem transplantacji. Wykazaliśmy, że im niższe wyjściowe parametry UPP tym większa szansa na poprawę funkcjonalną po przeszczepieniu komórek. Może to częściowo wyjaśniać relatywnie niewielkie zmiany parametrów UPP w naszym badaniu w stosunku do innych badań, w których przeprowadzono uprzednio uszkodzenie zwieracza. Jednocześnie uważam, że zastosowanie wieloródek zamiast zwierząt z uszkodzonym zwieraczem jest dobrą opcją z co najmniej dwóch powodów: 1) wywołanie uszkodzenia zwieracza generuje lokalnie powstanie specyficznej niszy, która nie odzwierciedla warunków panujących w cewkach pacjentek cierpiących z powodu wysiłkowego nietrzymania moczu; 2) ze względów etycznych (ograniczenie cierpienia zwierząt).

Fragmety cewek, w których stwierdzono przeszczepione komórki były poddane szczegółowej analizie mikroskopowej. Barwienia immunocytochemiczne wykazały, że zarówno komórki MDC jak i MSC były zdolne do integracji z włóknami mięśni poprzecznie prążkowanych, jednak w przypadku komórek MSC to zjawisko było marginalne. Nawet w porcjach wstrzykniętych bezpośrednio do mięśnia EUS, większość komórek MSC i znaczna część komórek MDC pozostawała w

niezróżnicowanej postaci pomiędzy włóknami. W przypadku ulokowania porcji komórkowej poza mięśniem EUS ciekawą obserwacją zanotowaliśmy w grupie MDC-MS. W jednej cewce stwierdziliśmy obecność wydłużonych struktur wykazujących ekspresję desminy i jednocześnie barwnika DID o centralnie ulokowanych jądrach komórkowych. Był to obraz typowy dla młodych włókien mięśniowych, mimo, że ta porcja komórek była zlokalizowana poza warstwą mięśni prążkowanych (choć w pobliżu pęczka mięśni gładkich). Obraz ten sugeruje, że w tym konkretnym przypadku nastąpiło miogenne różnicowanie *de novo*, czyli wytworzenie nowego włókna, a nie jedynie dołączenie komórek do włókien już istniejących. Nie zaobserwowaliśmy podobnych struktur ani w grupie MDC ani MSC. Moja hipoteza o zwiększeniu przeżycia komórek MDC przy jednoczesnym przeszczepieniu komórek MSC była tylko częściowo pozytywnie zweryfikowana. Po 1 miesiącu rzeczywiście zanotowano silniejszy sygnał pochodzący z przeszczepionych mioblastów w grupie MDC-MS niż w grupie MDC (średnio 1,88 razy silniejszy sygnał, $p > 0,05$, wartości po uwzględnieniu różnic w liczbie przeszczepionych komórek). Ponadto, średnia zmiana parametrów UPP po transplantacji w tym punkcie czasowym również była wyższa w grupie MDC-MS niż w grupie MDC. Jednakże, ta tendencja zanikła w punkcie czasowym 3 miesiące. Należy jednak podkreślić, że w grupie ko-transplantacji wyniki badań czynnościowych były najbardziej spójne i tylko w tej grupie wykazaliśmy statystycznie istotną poprawę obu badanych parametrów UPP. Podsumowując, wyniki omawianej pracy wskazują, że:

- Zarówno MDC jak i MSC mogą integrować się z istniejącymi włóknami zwieracza w przypadku celnego wstrzyknięcia w EUS, jednak zasięg integracji w przypadku MSC jest marginalny
- łączne przeszczepienie mioblastów i MSC zwiększa szansę na pozytywny czynnościowy efekt po transplantacji niż przeszczepienie tylko jednego typu komórek
- W przypadku dużych gatunków zwierząt - dojrzałe samice po wielokrotnych porodach (bez eksperymentalnego uszkodzenia zwieracza) mogą być z powodzeniem używane do badań efektów docerkowych transplantacji komórkowych

Wszystkie procedury wykonywane na zwierzętach (szczury, świnie, kozy) zostały wcześniej zatwierdzone jako dopuszczalne przez odpowiednią Lokalną Komisję Etyczną.

Podsumowanie cyklu ze wskazaniem najważniejszych elementów o znaczeniu praktycznym

Nietrzymanie moczu jest bardzo powszechnym problemem medycznym. Wydłużająca się średnia długość życia będzie powodowała wzrost częstości zachorowań. W nurcie rozwoju terapii komórkowych pojawiła się koncepcja wykorzystania przeszczepień komórek w celu zwiększenia napięcia mięśnia zwieracza cewki moczowej, które w założeniu ma leczyć lub wspomagać leczenie wysiłkowego nietrzymania moczu. Cykl publikacji prezentowany jako moje główne osiągnięcie naukowe jest związany z próbami udoskonalania technik docerkowych transplantacji komórkowych. Rezultaty badań prowadzonych przez mnie i współpracujące ze mną osoby stanowią oryginalny wkład w omawiany obszar badań. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie kluczowego znaczenia lokalnej niszy na zachowanie się komórek po przeszczepieniu (dotyczy narządów zawierających obszary o różnym utkaniu tkankowym jak np. cewka moczowa). Ponadto, wykazały ograniczoną migrację przeszczepionych komórek w ścianie cewki moczowej. Obydwa powyższe aspekty pozwoliły zdefiniować celność wstrzyknięć docerkowych jako jeden z kluczowych problemów związanych z tą procedurą. Dalsze badania pozwoliły na zaproponowanie nowego gatunku dużego zwierzęcia (kozy)

jako bardzo atrakcyjnej opcji do testowania efektów docewkowych transplantacji. Praca kierowanego przeze mnie zespołu skutkowała opracowaniem nowatorskiego protokołu oceny efektu transplantacji komórkowych u dużych zwierząt (uważam, że wypracowany przez nas protokół może być wykorzystywany również w innych typach przeszczepień komórkowych - nie tylko docewkowych). Przeprowadzone analizy pozwoliły na ocenę stopnia precyzji mało inwazyjnych wstrzyknięć docewkowych. W celu zwiększenia celności iniekcji do zwieracza cewki moczowej wytworzyliśmy prototyp przewodnicy igły endoskopu, elementu prostego i potencjalnie taniego w produkcji. Wreszcie, nasz zespół pod moim kierownictwem jako pierwszy testował efekty współtransplantacji dwóch typów komórek (mioblastów i komórek MSC) jako metody wzmocnienia napięcia cewki moczowej. Wykazaliśmy, że połączenie dwóch tych dwóch typów komórek zwiększa ciśnienie wewnątrz cewki moczowej zwierząt doświadczalnych. Dodatkowym, ważnym dla mnie, aspektem moich badań jest fakt, że wykazaliśmy zasadność użycia starszych, wielokrotnie rodzących samic kóz jako alternatywy dla zwierząt z eksperymentalnie uszkodzonym zwieraczem cewki. Stosowanie zaproponowanego przez rozwiązanie jest bliższe warunkom klinicznym, a także ogranicza cierpienie zwierząt doświadczalnych. Uzyskane przez nas wyniki i wypracowane rozwiązania mogą mieć realne znaczenie dla ustalania optymalnych protokołów klinicznych.

Cytowana literatura:

Chancellor, M. B., Yokoyama, T., Tirney, S., Mattes, C. E., Ozawa, H., Yoshimura, N., de Groat, W. C., Huard, J., 2000. Preliminary results of myoblast injection into the urethra and bladder wall: a possible method for the treatment of stress urinary incontinence and impaired detrusor contractility. *Neurourol Urodyn.* 19, 279-87.

Deng, K., Lin, D. L., Hanzlicek, B., Balog, B., Penn, M. S., Kiedrowski, M. J., Hu, Z., Ye, Z., Zhu, H., Damaser, M. S., 2015. Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary incontinence model. *Am J Physiol Renal Physiol.* 308, F92-F100.

Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, Grounds MD. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant.* 2000 Jul-Aug;9(4):489-502.

Holzer N, Hogendoorn S, Zurcher L, Garavaglia G, Yang S, König S, Laumonier T, Menetrey J: Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2005, 15:237-244.

Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature.* 1978 May 25;273(5660):306-8.

Peyrat L, Haillet O, Bruyere F, Boutin JM, Bertrand P, Lanson Y: Prevalence and risk factors of urinary incontinence in young and middle-aged women. *BJU Int* 2002, 89(1):61-66.

Ramírez M, Lucia A, Gómez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Pérez-Martínez A, Foster C, Andreu AL, Martín MA, Madero L, Arenas J, García-Castro J. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med.* 2006 Aug;40(8):719-22.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

Cała moja dotychczasowa aktywność naukowa skupiała się wokół badania właściwości komórek macierzystych, progenitorowych i możliwości ich wykorzystania w leczeniu chorób ludzi i zwierząt. Po obronieniu pracy doktorskiej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej zostałam zatrudniona w Klinice Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu

Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Moim zadaniem było stworzenie pracowni kultur komórkowych i zapoczątkowanie działalności naukowej w tym zakresie (wcześniej Klinika prowadziła badania na izolację i przeszczepianiem wysp trzustkowych, jednak nie prowadziła badań w zakresie biologii komórki i transplantacji komórek macierzystych i progenitorowych). Moje działania, przy wsparciu Kierownika Kliniki - Profesora Leszka Pączka, zaowocowały powstaniem pracowni hodowli komórkowych. Pozytywnie rozpatrywane wnioski grantowe pozwoliły na doposażenie pracowni i rozwój jej potencjału badawczego i dydaktycznego. Przez cały okres działania pracowni (od roku 2007 do chwili obecnej) jestem osobą odpowiedzialną za funkcjonowanie pracowni w zakresie organizacyjnym i merytorycznym. W tym okresie byłam kierowniczką lub wykonawczynią projektów finansowanych z MNiSW, NCN, NCBiR i FNP. Prowadzona przez mnie pracownia jest miejscem pracy doktorantów, magistrantów i studentów studiów inżynierskich. Ponadto, mamy aktywne współprace z wieloma ośrodkami: Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej SGGW, Zakładem Medycyny Regeneracyjnej Centrum Onkologii, Instytutem Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Grupą Biomateriałową Politechniki Warszawskiej, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Katedrą Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemii PW, a także kilkoma jednostkami wewnątrz WUM. Daje to możliwość prowadzenia ciekawych projektów przy użyciu szerokiego panelu metod badawczych. Oprócz mojego głównego wątku badawczego, opisanego jako główne osiągnięcie, można w mojej działalności wyodrębnić jeszcze kilka kierunków badań. Przedstawiam je poniżej jako małe cykle prac.

5.1. Porównanie wybranych cech komórek MSC pochodzących z różnych źródeł

- 5.1.1. Gala K, **Burdzinska A**, Idziak M, Makula J, Paczek L. Characterization of bone marrow derived rat mesenchymal stem cells depending on donor age. *Cell Biol Int.* 2011; 35: 1055-62. IF - 1,5
- 5.1.2. Dabrowski FA, **Burdzinska A***, Kulesza A, Chlebus M, Kaleta B, Borysowski J, Zolocińska A, Paczek L, Wielgos M. Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane and Umbilical Cord Can Diminish Immunological Response in an in vitro Allograft Model. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(3):267-275. IF - 1,18 (* - autorka korespondencyjna)
- 5.1.3. Dabrowski FA, **Burdzinska A***, Kulesza A, Śladowska A, Zolocińska A, Gala K, Paczek L, Wielgos M. Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue. *J Obstet Gynaecol Res.* Nov;43(11):1758-1768. IF- 1,09 (* - autorka korespondencyjna)
- 5.1.4. Zarychta-Wiśniewska W, **Burdzińska A***, Zielniok K, Kobłowska M, Gala K, Pędzisz P, Iwanicka- Nowicka R, Fogtman A, Aksamit A, Kulesza A, Zołocińska A, Pączek L. The influence of cell source and donor age on the tenogenic potential and chemokines secretion of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cells International*, accepted for publication, IF - 3,96 (* autorka korespondencyjna)

Omówienie

Komórki MSC (mezenchymalne komórki macierzyste lub mezenchymalne komórki zrębu) są przedmiotem bardzo intensywnych badań w ostatnich latach. Poglądy na temat właściwości tej populacji, jej terapeutycznego potencjału, a także obowiązującej nomenklatury zmieniają się dynamicznie. Od kilku lat, rekomendowane jest używanie określenia "mezenchymalne komórki zrębu". Dlatego, kierowany przez mnie zespół zmienił stosowaną nazwę i obecnie zarówno we wnioskach grantowych jak i w publikacjach używamy określenia mezenchymalne komórki zrębu (Zarychta-Wiśniewska et al. 2019). Kwestia nazewnictwa nie jest kluczowa, jednak odzwierciedla

niejasności i kontrowersje powstające wokół populacji MSC. W 2006 roku opublikowano wytyczne dotyczące identyfikacji populacji MSC. Należą do nich 3 ogólne kryteria: 1) zdolność adhezji do plastiku i do tworzenia kolonii; 2) zdolność do różnicowania w osteocyty, adipocyty i chondrocyty; 3) fenotyp: obecność antygenów CD90, CD73, CD105 i brak antygenów CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR. Kryteria te są spełniane przez fibroblastopodobne komórki izolowane z różnych tkanek i narządów organizmów dorosłych i tkanek płodu. Najważniejsze źródła tej populacji to szpik kostny, tkanka tłuszczowa i galareta Whartona, ale komórki o charakterystyce MSC są też izolowane między innymi z więzadeł okołozębowych, błony maziowej, błony owodniowej, skóry. Izolowane komórki spełniające rekomendowane wymagania były i są przez wielu badaczy traktowane równorzędnie niezależnie od źródła, z którego pochodzą. Jednak w ostatnich latach wiele prac wykazało, że bardziej szczegółowa ocena fenotypu, zdolności sekrecyjnych i potencjału różnicowania ujawnia różnice pomiędzy komórkami MSC pochodzącymi w różnych źródła. W ten nurt wpisują się również badania naszego zespołu. Trzy z prac wymienionych w omawianym cyklu miały na celu porównanie ludzkich komórek MSC z różnych źródeł. Testy czynnościowe badające zdolność MSC do hamowania proliferacji limfocytów nie wykazały znaczących różnic pomiędzy komórkami izolowanymi z tkanki tłuszczowej, galarety Whartona i błony owodniowej. Jednak badanie aktywności sekrecyjnej wykazało istotne różnice w wydzielaniu niektórych czynników przez różne typy MSC np. MSC izolowane z galarety Whartona (GW-MS) wydzielają istotnie mniej śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) i jednocześnie istotnie więcej transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β) niż komórki izolowane z tłuszczu (ASC) i z błony owodniowej (AM-MS). Obydwa wymienione czynniki mają kluczowe znaczenie w procesach naprawczych i, zależnie od sytuacji, mogą niwelować bądź nasilać patologiczne procesy. Wykazaliśmy ponadto, że komórki izolowane ze szpiku (BM-MS) wydzielają istotnie więcej chemokiny CXCL12 niż ASC. Chemokina ta bierze udział w rekrutacji komórek macierzystych i progenitorowych, zatem można się spodziewać, że zwiększone wydzielanie może mieć znaczenie terapeutyczne. Ponadto, wyniki naszego zespołu wykazały, że BM-MS wykazują większą ekspresję czynników związanych ze ścięgotworzeniem (tenogenezą) niż ASC, co sugeruje, że komórki ze szpiku mogą łatwiej ulegać indukcji do różnicowania tenogenego niż ASC. Wszystkie te informacje mogą mieć znaczenie praktyczne. Oczywiście zarówno nasze wyniki jak i rezultaty uzyskane przez innych badaczy wymagają jeszcze potwierdzenia, jednak wydaje się, że zasadne jest dopasowywanie rodzaju MSC (zależnie od ich pierwotnej niszy) to poszczególnych aplikacji klinicznych, zwłaszcza, gdy rozważane są przeszczepienia allogeniczne. Innym aspektem poruszonym w naszych badaniach jest wpływ wieku dawcy na własności komórek MSC. W tym obszarze prowadziliśmy badania na komórkach izolowanych ze szpiku od szczurów i ludzi. Wykazały one, że chociaż wiek wpływa na niektóre cechy MSC, to w większości badanych parametrów komórki izolowane od starszych i młodszych dawców nie różniły się między sobą istotnie. Wyniki te sugerują, że starsze osoby mogą być dawcami komórek o potencjale terapeutycznym nie gorszym niż tych izolowanych od osób młodych. Ma to znaczenie przeprowadzaniu transplantacji autologicznych.

5.2. Modyfikacje właściwości przeszczepianych komórek

5.2.1. Burdzińska A, Bartoszek U, Orzechowski A. Preincubation with bFGF but not sodium ascorbate improves efficiency of autologous transplantation of muscle-derived cells into urethral wall. *Urology*. 2009, 73: 736-42. IF - 2,36

- 5.2.2. Bartoszek-Bruzzone U[#], **Burdzińska A[#]**, Orzechowski A, Kłos Z. Protective effect of sodium ascorbate on efficacy of intramuscular transplantation of autologous muscle-derived cells, *Muscle&Nerve*, 2012; 45: 32-8, IF - 2,3 ([#] - **równorzędne pierwsze współautorstwo**)
- 5.2.3. Zarychta-Wiśniewska W, **Burdzińska A***, Kulesza A, Gala K, Kaleta B, Zielniok K, Siennicka K, Sabat M, Paczek L. Bmp-12 activates tenogenic pathway in human adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties. *BMC Cell Biol.* 2017 Feb 18;18(1):13. doi: 10.1186/s12860-017-0129-9. IF-2,8 (*autorka korespondencyjna)
- 5.2.4. Kulesza A[#], **Burdzińska A*[#]**, Szczepanska I, Zarychta-Wisniewska W, Pajak B, Bojarczuk K, Dybowski B, Paczek L. The Mutual Interactions between Mesenchymal Stem Cells and Myoblasts in an Autologous Co-Culture Model. *PLoS One.* 2016 Aug 23;11(8):e0161693. doi: 10.1371/journal.pone.0161693. - IF-2,8 ([#] - **równorzędne pierwsze współautorstwo**, *- **autorka korespondencyjna**)

Omówienie

Chociaż z transplantacjami komórkowymi wiąże się ogromne nadzieje, to obecnie wiadomo, że procedury te w większości przypadków nie są tak skuteczne jak oczekiwano. Zdefiniowano liczne problemy związane z stosowaniem przeszczepień komórkowych jako środka potencjalnie leczniczego. Należą do nich: słaba przeżywalność przeszczepu, ograniczona dystrybucja komórek po podaniu dożylnym, ograniczony zakres pożądanego różnicowania, potencjalne występowanie niepożądanego różnicowania (np. tłuszczenie, kostnienie), indukowanie odpowiedzi zapalnej przez niektóre typy komórek, potencjalne wspomaganie współistniejących transformacji nowotworowych, czy wreszcie duża zmienność osobnicza izolowanych komórek. Dlatego, podejmowane są liczne próby modyfikacji pozaustrojowej wyizolowanych komórek, aby wzmocnić korzystne z terapeutycznego punktu widzenia cechy. W ten nurt wpisuje się część badań prowadzonych przeze mnie i nasz zespół. W badaniach na modelu szczurzym wykazałam, że preinkubacja komórek izolowanych z mięśni (MDC - *ang. muscle derived cells*) z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF) zwiększa istotnie przeżycie przeszczepu po 2 tygodniach od wstrzyknięcia do ściany cewki moczowej. Czynnikiem bFGF jest bardzo silnym mitogenem, ale też ma też działanie antyoksydacyjne i proangiogenne. W drugiej pracy, badaliśmy wpływ preinkubacji z askorbianem sodu na przeżycie MDC po przeszczepieniu do mięśnia szkieletowego na modelu króliczym. Wykazaliśmy, że takie traktowanie istotnie zwiększa przeżycie przeszczepu, choć analogiczne traktowanie tego samego typu komórek przeszczepionych do ściany cewki moczowej nie wykazało takiego efektu. Obydwa badania były przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt, niemniej jednak te niespójne dane wskazują, że zachowanie się komórek po przeszczepieniu bardzo zależy od niszy, do której się je wprowadzi. Potwierdziły to zresztą moje późniejsze badania na dużych modelach zwierzęcych i te wyniki nakierowały mnie na próby polepszenia celności wstrzyknięć komórkowych. Nasze najnowsze badania w omawianym obszarze wskazały na inną istotną kwestię. Podejmowaliśmy próby indukcji ludzkich komórek MSC izolowanych z tłuszczu do różnicowania w kierunku tenocytów (potencjalne wykorzystanie przy terapii chorób ścięgien). Wykazaliśmy, że czynnik BMP12 powoduje aktywację ścieżki tennogenej w badanych komórkach, ale jednocześnie wpływa na kilka innych ważnych właściwości tej populacji, takich jak aktywność sekrecyjna czy potencjał immunomodulacyjny (praca 5.2.3.). Z jednej strony wielokierunkowe działanie pluripotencjalnej cząsteczki, jaką jest białko BMP, nie jest zaskakujące. Z drugiej strony jednak, potrzeba kompleksowej oceny komórek po modyfikacjach *in vitro* nie jest uwypuklana w dostępnej literaturze. Nasze wyniki wskazują, że modyfikując korzystnie jedną cechę, może jednocześnie dochodzić do niekorzystnych zmian w innych obszarach funkcjonowania komórki. Wynika z tego, że szczegółowa ocena poszczególnych populacji MSC (o czym mowa w punkcie 5.1)

może być korzystną ścieżką rozwoju. Wydaje się, że wybór odpowiedniej populacji (z określonego źródła) może pozwolić na ograniczenie potrzeby pozakomórkowego modyfikowania komórek, które wiążą się z nie do końca poznanymi konsekwencjami. Ostatnia praca wymieniona w niniejszej serii (praca 5.2.4.) prezentuje odmienne podejście do kwestii modyfikacji potencjału przeszczepianych komórek. Wyniki tej pracy stanowią wstępną weryfikację mojej hipotezy mówiącej, że kotransplantacja mioblastów i komórek MSC może zwiększyć skuteczność procedury w stosunku do przeszczepiania pojedynczych typów komórek. Koncepcja ta opiera się na tezie, że wymienione populacje mogą wzajemnie na siebie wpływać (a zatem się wzajemnie modyfikować). Wykazaliśmy, że MSC mogą współtworzyć miotuby z mioblastami, ale obecność czynników wydzielanych przez mioblasty (komórki przedzielone półprzepuszczalną błoną) nie powoduje różnicowania się MSC w miotuby ani nie indukuje ekspresji desminy w użytym przez nas protokole doświadczalnym. Nasze wyniki wykazały, że MSC są istotnie mniej wrażliwe na stres oksydacyjny niż mioblasty (porównanie komórek od tych samych dawców). Niestety, nie udało się wykazać, żeby obecność MSC wpływała na wrażliwość na stres oksydacyjny komórek izolowanych z mięśni. Ciekawe wyniki uzyskaliśmy z analiz proliferacji. Nadsącz znad MSC stymulował tempo podziałów mioblastów. Jednocześnie, nadsącz znad mioblastów hamował aktywność proliferacyjną MSC. Hamowanie podziałów MSC w obecności mioblastów może być związane ze stopniowym wchodzeniem MSC na ścieżkę różnicowania. Jednak, jeżeli MSC rzeczywiście mogą osiągnąć miogenny fenotyp, to albo potrzebują więcej czasu, albo bardziej kompleksowej stymulacji pochodzącej również z innych komórek rezydujących w tkance mięśniowej. Podsumowując, wykazaliśmy siatkę różnorodnych interakcji pomiędzy mioblastami a MSC, które mogą stanowić wskazówki w rozumieniu fizjologicznych procesów związanych z regeneracją mięśni szkieletowych (a także mięśnia EUS), szczególnie w odniesieniu do udziału komórek pochodzących ze szpiku kostnego w tych zjawiskach. Ponadto, otrzymane wyniki wskazują, że współprzeszczepianie dwóch typów komórek może być ciekawą alternatywą dla bardziej tradycyjnych metod pozaustrojowej modyfikacji komórek przeznaczonych do transplantacji.

5.3. Badania metodologiczne na dużych modelach zwierzęcych

- 5.3.1. **Burdzińska A**, Crayton R, Dybowski B, Koperski Ł, Idziak M, Fabisiak M, Pączek L, Radziszewski P. Urethra distension as a novel method to induce sphincter insufficiency in the porcine animal model. *Int J Urol.* 2012; 19: 676-82 IF - 1,73
- 5.3.2. Weronika Zarychta-Wiśniewska, **Anna Burdzinska***, Radosław Zagózdzon, Bartosz Dybowski, Marta Butrym, Zdzisław Gajewski, Leszek Paczek. *In vivo* imaging system for explants analysis - a new approach for assessment of cell transplantation effects in large animal models. *Plos One* 2017 Sep 20;12(9):e0184588. doi: 10.1371/journal.pone.0184588 IF – 2,8 (*autorka korespondencyjna)
- 5.3.3. Dybowski B, **Burdzińska A***, Siewruk K, Dąbrowski M, Pączek L, Radziszewski P. Optimum anesthesia for reliable urethral pressure profilometry in female dogs and goats. *Int J Urol.* 2016 Aug;23(8):701-5. doi: 10.1111/iju.13114. - IF - 1,84 (*autorka korespondencyjna)

Omówienie

Prace wymienione w tej części są bardzo zbliżone tematycznie do cyklu, który przedstawiam jako główne osiągnięcie. Są to prace, które można określić jako metodologiczne. Praca doświadczalna z użyciem dużych gatunków zwierząt jest bardzo wymagająca. Liczba zwierząt, które używa się do doświadczeń jest relatywnie mała ze względów etycznych, logistycznych, finansowych. Z drugiej strony, etap badań na dużych zwierzętach jest często ostatnim etapem poprzedzającym rozpoczęcie ewentualnych prób klinicznych. Dlatego, protokoły doświadczalne powinny być maksymalnie

dopracowane. Nasz zespół pod moim kierownictwem poświęcił dużo wysiłków na określenie optymalnych protokołów i przedstawione prace są tego efektem. Pierwsza przedstawia nową metodę eksperymentalnego uszkodzenia zwieracza cewki moczowej na modelu świńskim. Opracowany przez nas model uszkodzenia zwieracza cewki poprzez odśrodkowe rozciąganie jest rozwiązaniem, które zostało później opisane w kilku pracach, a nawet zastosowane przez badaczy w Tybingi. Jednak, ze względu na fakt, że chciałam używać protokołów minimalnie inwazyjnych, nie zdecydowałam się na wykorzystanie naszego modelu w realizacji kolejnego projektu. Druga praca przedstawia proces walidacji protokołu zaproponowanego przez nas do testowania obecności przeszczepionych komórek w eksplantach z użyciem systemu do przyżyciowego obrazowania. Zaproponowany przez nas system oceny wyizolowanych organów pozwala na ograniczenie liczby zwierząt użytych w doświadczeniach (umożliwia wykonanie dwóch typów analiz z jednej próbki, podczas gdy według wcześniej używanych metod potrzebne byłyby dwie próbki, czyli użycie dwóch zwierząt). Trzecia praca opisuje wyniki procesu optymalizacji przeprowadzania profilometrii cewkowej (UPP) u dużych zwierząt. Prowadzone przez nas prace wykazały ograniczenia stosowania pomiarów UPP u zwierząt, które podczas tej procedury muszą pozostawać w stanie znieczulenia. Nasze starania doprowadziły do opracowania optymalnych warunków przeprowadzania tego badania (zarówno w odniesieniu do schematu znieczulania jak i warunków technicznych, jak tempo wysuwania i perfuzji cewnika podczas badania), ale jasno wskazujemy w naszej publikacji, że do interpretacji wyników należy podchodzić z ostrożnością. Wydaje się, że określenie przez nas przedziałów ufności dla danych typów pomiarów może stanowić przydatne wytyczne dla przyszłych badań tego typu.

5.4. Aktualne kierunki badawcze

Moje aktualne zainteresowania badawcze obejmują dodatkowo dwa kierunki: wpływ leków na komórki MSC i wpływ komórek MSC na rozwój zmian nowotworowych. W jednym z badań, w których uczestniczyłam (Idziak et al. 2014, publikacja 5.5.3.) wykazaliśmy, że toksyny mocznicowe wpływają istotnie na niektóre parametry ludzkich MSC, w tym ich aktywność sekrecyjną. Można się spodziewać, że również stosowanie wielu leków wpływa znacząco na funkcjonowanie komórek MSC i tym samym może mieć znaczenie dla ich terapeutycznego potencjału. Nadzoruję merytorycznie mini granty studenckie, w ramach których prowadzimy badania nad wpływem statyn na MSC w warunkach hipoksji i normoksji. Ponadto, nadzoruję merytorycznie wykonanie projektu pt. "Wpływ ibuprofenu na potencjał immunomodulacyjny i regeneracyjny ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu szpiku kostnego realizowanego w ramach programu PRELUDIUM, finansowanego przez NCN. Odrębnym zagadaniem jest wpływ komórek MSC na proces nowotworzenia. Od kilku lat pojawiają się doniesienia dotyczące ryzyka wspomagania współistniejących procesów nowotworowych przez komórki MSC. Uczestniczę w realizacji projektu prowadzonego przez badaczy z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, którego celem jest identyfikacja czynników rekrutujących MSC przez komórki raka jasnokomórkowego nerki. Efektem tego procesu jest stymulacja rozwoju raka, a celem projektu jest wykrycie nowych potencjalnych celów terapeutycznych w leczeniu tego typu nowotworów. Jestem też współautorką publikacji (Fidy et al. 2019), w której zaproponowano system tioredoksyny jako nowy cel terapeutyczny w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej z limfocytów B (BCP-ALL). Komórki BM-MSC wpływały korzystnie na przeżycie komórek BCP-ALL i zwiększały we współhodowli oporność komórek BCP-ALL na testowane inhibitory tioredoksyny.

Fidy K, Pastorczak A, Goral A, Szczygiel K, Fendler W, Muchowicz A, Bartłomiejczyk MA, Madzio J, Cyran J, Graczyk-Jarzynka A, Jansen E, Patkowska E, Lech-Maranda E, Pal D, Blair H, **Burdzinska A**, Pedzisz P, Iodkowska-Mrowka E, Demkow U, Gawle-Krawczyk K, Matysiak M, Winiarska M, Juszczyński P, Młynarski W, Heidenreich O, Golab J, Firczuk M. Targeting thioredoxin system as a novel strategy against B cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Oncol*. 2019 Mar 12. doi: 10.1002/1878-0261.12476. [Epub ahead of print]. IF – 5.26

5.5. Pozostałe publikacje oryginalne

- 5.5.1. Dąbrowski FA, **Burdzinska A**, Kulesza A, Kaleta B, Pączek L, Wielgoś M. *Premature fetal tissues are 4 possible source of valuable mesenchymal stem cells.* Ginekol Pol. 2017;88(4):191-197. doi: 10.5603/GP.a2017.0037. IF-0,6 (autorka korespondencyjna)
- 5.5.2. Korowash SI, **Burdzinska A**, Pędzisz P, Dąbrowski D, Mostafa AA-M, Abdel-Razik A, Mahgoub A, Ibrahim DM. *Selenium-Substituted Hydroxyapatite Nanoparticles and their in Vitro Interaction on Human Bone Marrow-and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells.* Interceram-International Ceramic Review 66 (6), 244-252
- 5.5.3. Idziak M, Pędzisz P, **Burdzińska A**, Gala K, Pączek L. *Uremic toxins impair human bone marrow-derived mesenchymal stem cells functionality in vitro.* Exp Toxicol Pathol. 2014; 66: 187-94 IF - 1,8
- 5.5.4. Gala K, **Burdzińska A**, Idziak M, Wilczek E, Pączek L. *Transplantation of mesenchymal stem cells into the skeletal muscle induces cytokine generation.* Cytokine. 2013; 64: 243-50. IF - 2,87
- 5.5.5. **Burdzińska A**, Bartoszek-Bruzzone U, Godlewski MM, Orzechowski A. *Sodium ascorbate and basic fibroblast growth factor protect muscle-derived cells from H2O2-induced oxidative stress.* Comp Med. 2006 Dec;56(6):493-501. IF – 0,993

5.6. Wybrane artykuły poglądowe

- 5.6.1. **Burdzińska A**, Berwid S, Orzechowski A. [Muscle cell transplantations: the ups and downs]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2005;59:299-308. Review. Polish.
- 5.6.2. Gala K, **Burdzińska A**, Pączek L. *Bone marrow derived mesenchymal stem cells and aging.* Postepy Biol Kom. 2010; 37: 89-106. Polish
- 5.6.3. **Burdzińska A**, Paczek L. *Myogenic stem cells--the new material for periurethral injections in the treatment of urinary incontinence.* Przegl Lek. 2008; 65: 362-6. Polish.
- 5.6.4. **Burdzińska A**. *Przeszczepienia wysp trzustkowych w leczeniu cukrzycy u psów – realna perspektywa czy ślepa uliczka?* Mag Wet. 2018; 12: 5-7.
- 5.6.5. **Burdzińska A**, **Idziak M**. *Komórki macierzyste w weterynarii – potencjał wymagający potwierdzenia.* Mag Wet. 2014; 9: 857-861.
- 5.6.6. **Burdzińska A**, **Idziak M**. *Komórki macierzyste w weterynarii – fakty i mity.* Mag Wet. 2013; 7: 695-704.

5.7. Rozdziały w książkach

Burdzińska A. "Transplantacje komórkowe w leczeniu nietrzymania moczu" w Barcz E. "Uroginekologia. Schorzenia dna miednicy." **Gdańsk, Via Medica, 2017**, str. 132-134. ISBN 978-83-65672-81-0

Burdzinska A. Stem and progenitor cells in muscle regeneration and potential treatment. In "Stem cell, regenerative medicine and cancer" edited by Shree Ram Singh, Nova Publishers, 2011, 311-348

6. ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA DOROBKU (STAN NA DZIEŃ 15.03.2019)

Poniżej przedstawiam tabelaryczne zestawienie mojego dorobku naukowego z podziałem na prace opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

	PRZED DOKTOREM			PO DOKTORACIE		
	liczba	IF	MNiSW	liczba	IF	MNiSW
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	1	0,993	20	20	45,94	497
Prace poglądowe	3	-	15	14	1,29	54
RAZEM	4	0,993	35	34	47,94	551

Sumaryczny impact factor według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania: 48,223

Spośród 21 pełnotekstowych, oryginalnych prac naukowych, w 16 jestem **pierwszą bądź korespondencyjną autorką** (wszystkie prace z czasopism posiadających IF). Publikacje te mają **sumaryczny IF = 35,45**

Dodatkowo, jestem współautorką (jako autorka korespondencyjna) publikacji zaakceptowanej do druku w czasopiśmie o IF=3,96

Indeks Hirsha - 8

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (bez autocytowań) z dnia 15.03.2019 - 101

7. KIEROWANIE ORAZ UCZESTNICTWO W PROJEKTACH BADAWCZYCH

7.1) Kierowanie projektami

- 7.1.1. 2013-2015 - "Los mioblastów i mezenchymalnych komórek macierzystych po transplantacji do zwieracza cewki moczowej. Badanie porównawcze na dużym modelu zwierzęcym" - projekt finansowany przez **Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach programu POMOST**, umowa nr POMOST/2012-6/2
- 7.1.2. 2008-2012 - „Ocena przeżywalności i unerwienia autologicznych przeszczepów komórek pochodzących z mięśni do zwieracza cewki moczowej świni oraz próba opracowania zwierzęcego modelu wysiłkowego nietrzymania moczu.” - projekt Nr N N403 091635 finansowany przez **Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego**

7.2) Udział w projektach

- 7.2.1. od 01.2018 – „Ocena wpływu czynnika indukowanego hipoksją 1 na immunomodulacyjne właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu”, projekt nr 2017/25/B/NZ6/01380 finansowany przez **Narodowe Centrum Badań** w ramach programu OPUS, pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Leszka Pączka. Udział jako **wykonawczynie, zastępczyni kierownika**
- 7.2.1. 2014 do 2018 - „Nowatorskie metody inżynierii tkankowej wspomagające gojenie i regenerację ścięgien i więzadeł” finansowanego przez **Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Strategmed** – Kierownik zadania 1.4. - prof. dr hab. n. med. Leszek Pączek. udział jako **wykonawczynie, zastępczyni kierownika zadania**
- 7.2.3. 2016-2018 Wpływ przedimplantacyjnego podania komórek macierzystych na leczenie niepłodności, projekt nr 1W51/PM11D/14/14, Kierownik - Prof. dr hab. n. med. Mirosław Wielgoś. Funkcja – opieka merytoryczna nad głównym wykonawcą projektu - Filipem Dąbrowskim (promotorka pomocnicza)
- 7.2.4. od 01.2019 Cząsteczki rekrutujące mezenchymalne komórki macierzyste do komórek raka nerki - zintegrowana analiza na poziomie transkryptomu, proteomu i metabolomu. projekt nr 2018/29/B/NZ5/01211 finansowany przez **Narodowe Centrum Badań** w ramach programu OPUS, pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Leszka Pączka dr hab. Agnieszki Witkowskiej-Piekietko. Udział jako **wykonawczynie**

8. PATENTY

Udzielony patent europejski: „Prowadnica igły endoskopu do wykonywania kątowych wstrzyknięć do ściany narządów rurowych na zadaną głębokość oraz zestaw do wykonywania kątowych wstrzyknięć”

Autorzy: Anna Burdzińska, Bartosz Dybowski, Patryk Kaupa.

W roku 2018 patent uzyskał ochronę w 4 państwach (Polsce, Francji, Wielkiej Brytanii i Niemczech).

Mój wkład w powstanie patentu polegał na udziale w projektowaniu opatentowanego elementu, brałam udział w pracach związanych z testowaniem prototypu, a także je nadzorowałam, jako kierowniczka projektu w ramach którego wynalazek został wytworzony. Współtworzyłam i zatwierdzałam treść zgłoszenia patentowego. Byłam odpowiedzialna za merytoryczną część korespondencji z urzędem patentowym (za pośrednictwem Rzeczników Patentowych). Swój udział oceniam jako 40%.

Nr zgłoszenia: EP 16155346.6

Nr publikacji: EP 3 056 134

Uprawniony: Warszawski Uniwersytet Medyczny

9. AKTYWNY UDZIAŁ W MIĘDZYNARODOWYCH I KRAJOWYCH KONFERENCJACH NAUKOWYCH

Jestem autorką i współautorką ponad 30 prezentacji konferencyjnych. Wystąpienia miały formę zaproszonych wykładów, prezentacji ustnych bądź plakatowych. Wybrane wystąpienia konferencyjne:

Anna Burdzińska, Robert Crayton, Bartosz Dybowski, Łukasz Koperski, Marta Idziak, Kamila Gala, Piotr Radziszewski, Leszek Pączek. Porcine muscle-derived cells enhance urethral closure pressure after autologous transplantation into uninjured urethral sphincter. Joint Congress of Cell Transplant Society and International Xenotransplantation Society, Miami, USA, 23-26.10.2011, referat

Anna Burdzińska, Kamila Gala, Aleksandra Wyczałkowska-Tomasik, Marta Idziak, Cezary Kowalewski, Leszek Pączek. Local cytokine profile after autologous transplantation of muscle derived cells into the skeletal muscle. world conference on regenerative medicine – Leipzig, Niemcy, 2-4.11.2011, referat

Burdzinska Anna, Dybowski Bartosz, Bojarczuk Kamil, Godlewski Michał, Gajewski Zdzisław, Pączek Leszek. "Transurethral cell delivery as treatment of stress urinary incontinence - clues from large animal model studies." BIT' 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2014, 13-16.11.2014 Haikou, China, referat na zaproszenie

Zarychta-Wiśniewska W, Burdzińska A, Gala K, Aksamit A, Siennicka K, Pączek L. The modulations of MSC features in vitro before transplantation - the potential benefits and risks. Bone marrow transplantation – much more than haematopoietic tissue reconstitution. Wrocław 18-20.12.2017, referat, Burdzińska - autorka prezentująca

Anna Burdzińska. Cell-based therapy for urinary incontinence - what can we learn from large animal studies? – wykład na zaproszenie podczas Międzynarodowej Konferencji Studenckiej „Symbioza”, 11-13.05. 2018

