

## AUTOREFERAT

### SPIS TREŚCI:

1. Imię i nazwisko str. 3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej str. 3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych str. 3
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. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ze zm.) str. 4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych str. 26

*Aby osiągnąć coś ważnego trzeba podjąć ryzyko.*

1. **Imię i nazwisko:** Katarzyna Skórkowska-Telichowska
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

**2001r.** – uzyskanie tytułu zawodowego lekarza - Wydział Lekarski Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, studia ukończone z wyróżnieniem (lata 1995-2001);

**2006r.** – uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy pt.: „*Analiza stężenia homologu białka PAR 5 (białko 14-3-3) w kontekście nasilenia apoptozy limfocytów krwi obwodowej oraz stanu klinicznego pacjentów z miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową*” – Wydział Lekarski Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;

**2009r.** – uzyskanie tytułu specjalisty w dziedzinie Chorób Wewnętrznych – Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi;

**2014 r.** – uzyskanie tytułu specjalisty w dziedzinie Endokrynologii – Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

**2001 – 2002 r.:** Staż podyplomowy odbyty w 4. Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką we Wrocławiu oraz w Klinice Angiologii, Nadciśnienia tętniczego i Diabetologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu;

**2002 – 2006 r.:** Słuchaczka Dziennych Studiów Doktoranckich odbywanych w Katedrze i Klinice Angiologii, Nadciśnienia tętniczego i Diabetologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; prowadzenie zajęć dydaktycznych z Angiologii i Propedeutyki Interny odpowiednio dla studentów IV roku Wydziału Lekarskiego i III roku Wydziału Stomatologii Akademii Medycznej we Wrocławiu;

**2006 – 2009 r.:** Młodszy asystent w Oddziale Endokrynologii Kliniki Chorób Wewnętrznych 4. Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką we Wrocławiu;

**2009 r. – obecnie:** Starszy asystent w Oddziale Endokrynologii Kliniki Chorób Wewnętrznych 4. Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką we Wrocławiu;

**2013 r. – obecnie:** Prowadzenie zajęć dydaktycznych z przedmiotu „Nauka o żywieniu w endokrynologii”(w ramach umowy o dzieło dydaktyczne) w Klinice Chorób Wewnętrznych 4. Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką we Wrocławiu dla studentów Dietetyki Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu;

**01.03.2015 r. – obecnie:** Adiunkt w Zakładzie Angiologii Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

4. **Wskazanie osiągnięcia<sup>1</sup> 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. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego – jednotematyczny cykl publikacji:

„*Ocena efektów zastosowania opatrunków na bazie modyfikowanego genetycznie lnu w gojeniu przewlekłych owrzodzeń o różnej etiologii u ludzi*”.

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem **6 prac oryginalnych** oraz zaowocowało powstaniem **2 prac poglądowych** w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* oraz uzyskaniem **Patentu** na wytworzony produkt. **Sumaryczny IF** wynosi **20.099 (MNiSW/KBN: 211,0 pkt)**;

Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

- 1) **Skórkowska-Telichowska K.,** Bugajska- Prusak A., Pluciński P., Rybak Z., Szopa J. *Fizjologia i patologia przewlekle niegojących się owrzodzeń oraz sposoby ich miejscowego leczenia w świetle współczesnej wiedzy medycznej. The physiology and pathology of non-healing wounds and local treating methods according to current medical knowledge.* *Dermatologia Praktyczna* 2009; 5 (5): 15-29. (praca poglądowa)

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: autorstwie koncepcji pracy przez opracowanie przeglądu danych na temat rodzajów przewlekle niegojących się owrzodzeń

---

<sup>1</sup> W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie.

skórnych, ich etiopatogenezy, obrazu klinicznego i epidemiologii, fizjologii i patologii gojenia ran przewlekłych w aspekcie molekularnym i makroskopowym oraz istniejących sposobów miejscowego leczenia ze szczególnym zwróceniem uwagi na leczenie opatrunkami; dokonaniu porównawczej analizy rynkowych produktów opatrunkowych dostępnych w Polsce; współdziałanie w organizacji i przygotowaniu manuskryptu polegającym na opracowaniu i opisanie jego medycznej części; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 94%.

- 2) **Skórkowska-Telichowska K.**, Czemplik M., Kulma A., Szopa J.: *The local treatment and available dressings designed for chronic wounds*. J Am Acad Dermatol. 2013; 68 (4):117-126. (praca poglądowa); **IF 5,004; MNiSW/KBN: 45 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: autorstwie koncepcji pracy przez opracowanie przeglądu danych na temat istniejących sposobów leczenia długo trwających owrzodzeń w Polsce i na świecie, z uwzględnieniem dostępnych typów opatrunków; dokonaniu porównawczej analizy rynkowych produktów opatrunkowych; analizie odniesienia opatrunków lnianych do rynkowych produktów z branży; współdziałanie w organizacji i przygotowaniu manuskryptu polegającym na opracowaniu i opisanie jego medycznej części; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 75%.

- 3) Wróbel-Kwiatkowska M., **Skórkowska-Telichowska K.**, Dymińska L., Mączka M., Hanuza J., Szopa J. *Biochemical, Mechanical, and Spectroscopic Analyses of Genetically Engineered Flax Fibers Producing Bioplastic (Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate)*. Biotechnol. Prog. 2009; 25 (5): 1489-98. (praca oryginalna); **IF 2,398; MNiSW/KBN: 32 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez analizę zastosowań biomedycznych włókna lnianego modyfikowanego genetycznie; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie literaturowe rewitalizacji upraw lnu w kontekście zastosowań medycznych; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów, polegającym na ich zaplanowaniu i pomocy w przygotowaniu produktu roślinnego do analiz; współdziałanie w przygotowaniu manuskryptu polegającym na redakcji wstępnej wersji manuskryptu; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 25%.

- 4) Szopa J., Wróbel-Kwiatkowska M., Kulma A., Żuk M., **Skórkowska-Telichowska K.**, Dymińska L., Mączka M., Hanuza J., Żebrowski J., Preisner M. *Chemical composition and molecular structure of fibers from transgenic flax producing polyhydroxybutyrate and mechanical properties and platelet aggregation of composite materials containing these fibers*. Compos. Sci. Technol. 2009; 69 (14): 2438-2446. (praca oryginalna); **IF 2,901; MNiSW/KBN: 32 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez analizę zastosowań biomedycznych włókna lnianego modyfikowanego i materiałów kompozytowych; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie literaturowe rewitalizacji upraw lnu w kontekście zastosowań medycznych; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów polegającym na ich zaplanowaniu i pomocy w przygotowaniu produktu roślinnego do analiz komórek w hodowli; współudziale w przygotowaniu manuskryptu polegającym na redakcji wstępnej wersji manuskryptu; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 49%.

- 5) Kulma A., **Skórkowska-Telichowska K.**, Kostyn K., Szatkowski M., Skala J., Preisner M., Żuk M., Drulis-Kawa Z., Szperlik J., Wang Y., Szopa J. *New flax producing bioplastic fibers for medical purposes*. Industrial Crops and Products. 2015; 68: 80-89. (praca oryginalna); **IF 3.208; MNiSW/KBN: 40 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez analizę medycznego zastosowania produktów z lnu modyfikowanego genetycznie; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie potencjalnego działania leczniczego włókna lnianego uwalniającego 3-hydroksymaślan; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów polegającym na pomocy w ich zaplanowaniu oraz zaplanowaniu i wykonaniu pilotażowych badań z wykorzystaniem opatrunków lnianych nowej generacji; współudziale w przygotowaniu manuskryptu polegającym na opracowaniu i opisanu jego medycznej części; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 56%.

- 6) **Skórkowska-Telichowska K.**, Żuk M., Kulma A., Bugajska-Prusak A., Ratajczak K., Gąsiorowski K., Kostyn K., Szopa J.: *New dressing materials derived from transgenic flax products to treat long- lasting venous ulcers - a pilot study*. Wound Repair Regen. 2010; 18 (2): 168-179. (praca oryginalna); **IF 3,443; MNiSW/KBN: 32 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez opracowanie aspektu medycznego zastosowania opatrunków lnianych w leczeniu przewlekłych owrzodzeń skórnych; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie potencjalnego działania leczniczego surowca lnianego; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów polegającym na opracowaniu technologii leczenia ran opatrunkami lnianymi, zaplanowaniu i wykonaniu pilotażowych badań opatrunków lnianych z udziałem ludzi; współudziale w przygotowaniu manuskryptu polegającym na opracowaniu i opisanu jego medycznej części; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 60%.

- 7) **Patent nr PL 213 595** na wynalazek pt. „*Tkanina, zwłaszcza do wytwarzania opatrunków*”. Dokument patentowy został udzielony na podstawie przepisów ustawy z dnia 30.06.2000 r. – Prawo własności przemysłowej (tekst jednolity: Dz. U. z 2003 r. Nr 119, poz. 1117, z późn. zm.) od dnia 29.09.2008 r. – współtwórca wynalazku.

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji, dostarczeniu uzasadnienia literaturowego oraz klinicznego potencjalnego mechanizmu działania leczniczego surowca lnianego; współautorstwie w wykonaniu licznych eksperymentów polegającym na ich zaplanowaniu i pomocy w przygotowaniu produktu roślinnego do analiz; zaplanowaniu i wykonaniu badań klinicznych z udziałem pacjentów; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 33%.

- 8) **Skórkowska-Telichowska K.**, Hasiewicz-Derkacz K., Gębarowski T., Kulma A., Moreira H., Kostyn K., Gębczak K., Szyjka A., Wojtasik W., Gąsiorowski K. *Emulsions made of oils from seeds of GM flax protect V79 cells against oxidative stress*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015, Article ID 489417. (praca oryginalna); **IF 3.516; MNiSW/KBN: 25 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez ustalenie typu komórek do badań nad mechanizmami działania emulsji lnianej; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie literaturowe oraz kliniczne potencjalnego mechanizmu działania leczniczego surowca lnianego; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów polegającym na ich zaplanowaniu i pomocy w przygotowaniu produktu roślinnego do analiz; współudziale w przygotowaniu manuskryptu

polegającym na redakcji wstępnej wersji manuskryptu; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 45%.

- 9) **Skórkowska-Telichowska K.**, Hasiewicz- Derkacz K., Gębarowski T., Moreira H., Gębczak K., Kulma A., Gąsiorowski K.: *Prozdrowotne działania olejów z lnu. Wnioski z badań w hodowlach komórkowych*. Bromatol. Chem. Toksyk. 2015; 48 (3): 522-527. (praca oryginalna); **MNiSW/KBN: 5 pkt.**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współautorstwie koncepcji pracy przez ustalenie typu komórek do dalszych badań nad mechanizmami działania emulsji lnianej; współautorstwie wniosku grantowego finansującego pracę przez uzasadnienie literaturowe oraz kliniczne potencjalnego mechanizmu działania leczniczego surowca lnianego; współautorstwie w wykonaniu eksperymentów polegającym na ich zaplanowaniu i pomocy w przygotowaniu produktu roślinnego do analiz; współdziałale w przygotowaniu manuskryptu polegającym na redakcji wstępnej wersji manuskryptu; mój proporcjonalny udział w pracy szacuję na: 35%.

W załączeniu przedkładam:

- kopie powyższych prac (Załącznik nr 4),
  - oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim (Załącznik nr 5),
  - potwierdzenie IF z poświadczeniem przez Bibliotekę Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (Załącznik nr 8).
- c) omówienie celu naukowego powyższych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

### **Wstęp:**

Ranami przewlekłymi, z definicji, się określane są rany nie gojące się w czasie przekraczającym osiem tygodni. Do najczęściej spotykanych w praktyce klinicznej należą owrzodzenia o etiologii żylniej, zespół stopy cukrzycowej oraz owrzodzenia troficzne (odleżyny). Przewlekle niegojące się owrzodzenia są istotnym problemem w praktyce klinicznej. Przedłużające się gojenie ran, wnikające je infekcje, wpływ długotrwałego owrzodzenia na ustrój, cierpienie chorych, wciąż niedoskonałe metody zaopatrywania ran stanowią wyzwanie dla współczesnej medycyny.



### **Fizjologiczne fazy gojenia ran:**

Gojenie ran jest procesem złożonym i dynamicznym, oraz, niezależnie od typu rany, przebiega podobnie. Zwyczajowo wyróżniono trzy nieostro odgraniczone od siebie fazy gojenia ran: **faza oczyszczania**, **faza proliferacji** oraz **faza obkurczania rany i tworzenia blizny**.

**Faza oczyszczania** charakteryzuje się powstaniem miejscowego stanu zapalnego w odpowiedzi na uraz (z typowymi objawami stanu zapalnego: nadmiernym uciepleniem, obrzękiem, zaczerwienieniem oraz bólem), w przypadku przerwania naczyń krwionośnych w momencie urazu, dochodzi również do obkurczenia tych naczyń i powstania skrzepu. Zwykle w tej fazie – szczególnie gdy czas jej trwania się przedłuża – obserwuje się cechy zakażenia bakteryjnego i/lub grzybiczego oraz obecność martwiczych, uszkodzonych komórek i fragmentów tkanek. Faza oczyszczania charakteryzuje się wzmożoną aktywnością płytek krwi, które uwalniają z ziarnistości alfa zmagazynowane w nich substancje indukujące krzepnięcie (czynnik von Willebranda (*vWF*), fibrynogen, fibronektynę i trombospondynę), co ułatwia formowanie czopu hemostatycznego, zapewniającego hemostazę i tworzącego tymczasową macierz zewnątrzkomórkową. Płytki krwi wydzielają również czynniki wzrostu (płytkowy czynnik wzrostu; *platelet-derived growth factor* – *PDGF* i transformujący czynnik wzrostu alfa i beta (*transforming growth factor alfa, beta* – *TGF-alfa, -beta*), będące aktywatorami komórek mezenchymalnych. Stymulują one chemotaksję i proliferację monocytów oraz makrofagów, później – także fibroblastów. Czynniki wzrostu wydają się być głównymi regulatorami obecności pozakomórkowej macierzy w gojących się ranach – podłoża, dzięki któremu możliwe jest współdziałanie poszczególnych elementów biorących udział w gojeniu rany.

Po płytkach krwi, do rany napływają leukocyty pod wpływem chemoatraktantów, do których należą fibrynopeptydy, produkty degradacji fibryny, czynnik aktywujący płytki (*platelet-activating factor* – *PAF*), leukotrien B<sub>4</sub>, czynnik płytkowy 4 (*platelet factor 4* – *PF4*), *PDGF* oraz ekspresja integryn CD11/CD18 na komórkach śródbłonna naczyniowego. Jako pierwsze napływają neutrofile. Poprzez uwalnianie elastazy i kolagenazy mogą penetrować w głąb macierzy, ułatwiają również wnikanie do niej drobnych naczyń krwionośnych. Neutrofile oczyszczają owrzodzenie z bakterii i martwych oraz uszkodzonych komórek i fragmentów tkanek poprzez endocytozę (mają właściwości fagocytarne) oraz uwalnianie enzymów lizosomalnych. Gdy rozpoczyna się napływ monocytów, zmniejsza się infiltracja neutrofilii. Przyleganie monocytów do białek macierzy zewnątrzkomórkowej

indukuje wydzielanie, między innymi, czynnika stymulującego kolonie (*colony stimulating factor 1 – CSF-1*). W ranie, monocyty ulegają przemianie fenotypowej w makrofagi, które kontynuują niszczenie drobnoustrojów i oczyszczanie rany. *CSF-1* pobudza makrofagi do wydzielania cytokin i proteaz, zwiększając ich zdolność do walki z czynnikami zakaźnymi (czynnika martwicy nowotworów, *tumor necrosis factor alfa – TNF-alfa*, *PDGF*, *TGF-alfa* i *beta*, interleukiny 1 (*IL-1*), insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (*insulin-like growth factor 1 – IGF-1*)).

Druga faza – **faza proliferacji** – charakteryzuje się tworzeniem ziarniny, rozpoczynającą się epitelializacją i neorewaskularyzacją. Makrofagi, poza oczyszczaniem owrzodzenia, uwalniają cytokiny przyciągające fibroblasty z otoczenia rany i stymulują ich proliferację oraz stymulują fibroblasty do produkcji kolagenu. Reepitelializacja odbywa się przez podział epidermalnych komórek macierzystych zlokalizowanych w nieuszkodzonym, sąsiadującym z raną naskórku. Powstałe keratynocyty zaczynają przemieszczać się do rany. W tym czasie zachodzi wiele zmian genotypowych w komórkach napęczającego na owrzodzenie nabłonka, które, między innymi, umożliwiają jego przemieszczanie się. Ekspresja receptorów integrynowych na jego powierzchni pozwala na interakcje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki potomne przesuują się z obwodowej części rany do jej środka. Proces ten odbywa się skokowo (tzw. zabimi skokami) co 12-18 godzin i prowadzi przy niezaburzonym gojeniu do tworzenia nowych komórek z szybkością około 2 mm tkanki na dobę. Dopiero po całkowitym pokryciu powierzchni rany pojedynczą warstwą nabłonka, keratynocyty proliferują, a następnie różnicują się w poszczególne elementy naskórka. Tempo rozrostu, intensywne w początkowym etapie epitelizacji, zmniejsza się w miarę zbliżania komórek z przeciwległych brzegów rany, i rozciąga na kolejny etap gojenia. Neorewaskularyzacja polega na powstawaniu nowych naczyń krwionośnych, które dostarczają tlen oraz składniki odżywcze niezbędne do intensywnego metabolizmu komórek biorących udział w gojeniu rany. Proces ten wydaje się bardzo złożony i w dalszym ciągu nie został do końca poznany. Jego indukcję przypisuje się: czynnikowi wzrostu śródbłonka naczyniowego (*vascular endothelial growth factor – VEGF*), *TGF-beta*, angiogeninie, angiotropinie 1 oraz trombospondynie.

Ostatnia faza w fizjologicznym gojeniu się owrzodzeń to **faza obkurczania rany oraz wytworzenia blizny**. Następuje przekształcenie żywoczerwonej ziarniny w bladą tkankę zawierającą dużą liczbę włókien kolagenowych. Fibroblasty stymulowane przez cytokiny uwalniane z makrofagów naciekają obszar rany. Fibroblasty uwalniają własne proteazy,

umożliwiająca im migrację w skrzeplinie. Produkują też duże ilości fibronektyny (FN) i kwasu hialuronowego (HA) o decydującym znaczeniu dla dalszego gojenia rany oraz kolagen typu I i III. Te składniki formują nową macierz w miejscu degradowanej macierzy fibrynowej, rekrutują i stymulują kolejne fibroblasty na drodze auto- i parakrynej. W chwili gdy obficie wyprodukowana macierz kolagenowa zostanie zdeponowana, fibroblasty przestają produkować kolagen. Nowo powstałe włókna, dotąd ułożone chaotycznie, ulegają organizacji w bardziej regularną strukturę. Włókna kolagenu typu III przekształcane są w kolagen typu I aż do chwili uzyskania równowagi charakterystycznej dla zdrowej skóry (I:III 4:1). Fibroblasty same ustawiają się w promieniowej osi owrzodzenia i łączą się ze sobą oraz z podłożem poprzez integryny i ciasne złącza (*tight junctions*). Włókna aktywne tworzą się wzdłuż długiej osi fibroblastów. Następnie fibroblasty przekształcają się w miofibroblasty – nabywają zdolność do kurczenia się – i zmniejszają obszar rany, po czym na drodze programowanej śmierci komórek pozostałe w ranie makrofagi i miofibroblasty są usuwane. Nowy naskórek jest pozbawiony mieszków włosowych, gruczołów i melanocytów, nie pełni zatem funkcji fizjologicznych. Zapewnia jednak odporność rany na rozciąganie i rozerwanie, a wytrzymałość ta zwiększa się podczas zachodzących w fazie bliznowacenia procesów modelowania i naprawy. Uznaje się, że blizna ma około 70% wytrzymałości zdrowej skóry.

### **Mechanizmy upośledzenia gojenia ran:**

Wiele teorii stara się wyjaśnić mechanizm upośledzenia gojenia ran na poziomie molekularnym. Większość z nich łączy hipoteza zaburzenia równowagi pro- i antyoksydacyjnej w owrzodzeniu, skutkującej nadmiernym i niekontrolowanym powstawaniem reaktywnych form tlenu (RFT) oraz, w konsekwencji, stresem oksydacyjnym. Wolne rodniki tlenowe reagują niespecyficznym ze składnikami komórek i tkanek, uszkadzając je i modyfikując tak, że powstają wolne rodniki substancji organicznych: białek, lipidów, kwasów nukleinowych i węglowodanów. Pierwszym celem reaktywnych form tlenu są lipidy błon komórkowych komórek owrzodzenia – peroksydacja lipidów doprowadza często do zniszczenia komórki.

W fazie oczyszczania upośledzeniu przez RFT ulegają kompleksowe, nieswoiste reakcje obronne organizmu, mające na celu usunięcie patogennych drobnoustrojów, oczyszczenie rany z zakażonych lub uszkodzonych, martwiczych tkanek i przygotowanie do procesów proliferacji. Niekontrolowany stan zapalny i infekcje, działając bezpośrednio i przez tworzenie nadmiernego wysięku, dezaktywują czynniki wzrostu, cytokiny i białka

(również enzymatyczne), inicjujące formowanie ziarniny oraz destabilizują macierz zewnątrzkomórkową.

W fazie proliferacji w przebiegu nacieku pobudzonych komórek zapalnych dochodzi do utraty kontroli nad syntezą i wydzielaniem enzymów proteolitycznych, wolnych rodników oraz miejscowo toksycznie działających cytokin. W przewlekłych ranach zaobserwowano obniżone stężenie tkankowego inhibitora metaloproteinaz, zwiększone stężenie żelatynaz, metaloproteaz i kolagenaz, które mają zdolność niszczenia białek macierzy i dezaktywowania niezbędnych do gojenia rany czynników wzrostu. Brak fibronektyny zaobserwowany w trudno gojących się owrzodzeniach (którego przyczyną jest degradacja natywnej FN) jest spowodowany również specyficznym środowiskiem obecnym w przewlekłych owrzodzeniach (wolne rodniki, proteazy). W efekcie, dochodzi do niszczenia własnych tkanek gospodarza i powiększania się owrzodzenia, rozpadu macierzy będącej podłożem interakcji międzykomórkowych, powstawania nalotów złożonych z bogato białkowego wysięku, martwych komórek, bakterii, grzybów, elementów macierzy i włókniaka, nierzadko ropy, prowadzącego do migracji keratynocytów do wnętrza rany, co z kolei zaburza fazę zmniejszania rany i tworzenia blizny. Bez odpowiedniego leczenia, owrzodzenia utrzymują się przez wiele miesięcy, czy nawet lat.

### **Leczenie ran:**

Leczenie rany przewlekłej oznacza przywrócenie równowagi czynnikom warunkującym proces gojenia się rany. Powinno być kompleksowe i zorganizowane oraz oparte na współpracy lekarza z chorym.

Kompleksowa opieka nad chorym z niegojącym się owrzodzeniem obejmuje: diagnostykę rany, leczenie przyczynowe, ukierunkowane na chorobę zasadniczą (wyrównanie metaboliczne cukrzycy, zapobieganie skutkom przewlekłej niewydolności żyłnej), odstawienie leków utrudniających gojenie ran, jeśli stan chorego na to pozwala, oraz odpowiednie leczenie miejscowe, promujące natywne procesy gojenia i usuwające czynniki patogenne.

Leczenie miejscowe, w fazie oczyszczania owrzodzenia, obejmuje mechaniczne usunięcie martwiczych tkanek oraz warstwy zanieczyszczeń, ciał obcych i resztek uszkodzonych, nadkażonych tkanek z owrzodzenia, a często również z brzegów rany, w celu uzyskania lepszego ukrwienia. W przypadku powstania ropni – otwarcie i sączkowanie zmian. Po oczyszczeniu rany i jej brzegów ważnym elementem pozostaje zapewnienie optymalnych warunków dla przebiegu procesów biochemicznych

oraz podtrzymaniu funkcji komórek biorących udział w gojeniu rany, takich jak: umiarkowanie wilgotne środowisko, prawidłowa wymiana gazowa, właściwa temperatura i pH, aktywne wykrywanie i agresywne leczenie zakażeń oraz, co ważne, przywrócenie odpowiedniego układu red-ox, poprzez eliminację aktywnych form tlenu.

W fazie proliferacji najważniejszym elementem leczenia miejscowego owrzodzenia jest zapewnienie wzrastającej tkance odpowiedniej wilgotności, ponieważ wysychanie rany prowadzi do obumierania komórek i opóźnia proces gojenia. Jednocześnie, konieczne jest usuwanie nadmiaru wysięku, aby zapobiec maceracji brzegów rany. Nadmiar wysięku stanowi dobrą pożywkę dla drobnoustrojów: bakterii i grzybów. Wrażliwą ziarninę i nabłonek należy chronić przed urazem. Istotny na tym etapie jest odpowiedni dostęp tlenu do rany.

W fazie obkurczenia i tworzenia blizny nowa, młoda tkanka nabłonkowa, podobnie jak ziarnina, wymaga odpowiedniego wilgotnego środowiska i optymalnych warunków fizycznych (temperatura, pH, dostęp tlenu, układ red-ox), niezbędnych do migracji komórek.

W piśmiennictwie podkreśla się rolę antyoksydantów w poprawie gojenia ran, zwłaszcza w związku ze stwierdzoną wysoką zawartością wolnych rodników w przewlekłych owrzodzeniach, których obecność opóźnia wszystkie fazy gojenia ran.

Ranę należy chronić przed działaniem szkodliwych czynników zewnętrznych, zatem niezbędnym elementem w ich leczeniu jest stosowanie opatrunków bioaktywnych stanowiących nie tylko barierę fizyczną. Strategia T.I.M.E. [T (*tissue management*) – oczyszczanie rany, I (*infection* lub *inflammation*) – dekolonizacja lub hamowanie infekcji, M (*moisture imbalance*) – nawilżanie, E (*edge of the wound, Epithelium*) wspomaganie naskórkowania] opracowana przez *European Wound Management Association*, odwołująca się do wzmacniania naturalnych mechanizmów gojenia, wiąże się jednocześnie z wykluczeniem agresywnych i hamujących gojenie owrzodzeń działań terapeutycznych i pielęgnacyjnych.

### **Opatrunki bioaktywne:**

Opatrunek bioaktywny, kompatybilny z naturalnym procesem gojenia ran, powinien mieć następującą charakterystykę:

- zapewniać fizyczną ciągłość rany,
- aktywnie oczyszczać ranę,
- pochłaniać nadmiar wysięku,
- chronić przed infekcjami i czynnikami zewnętrznymi,
- zapewniać prawidłowe pH, termoregulację, wymianę gazową i wilgotne środowisko,

- być naturalny i dobrze tolerowany, tak, aby nie powodować reakcji odrzucenia (supresji ziarniny, wytwarzania włóknika),
- nie wywoływać alergii,
- być łatwy w nakładaniu i usuwaniu, a podczas tych czynności – nie uszkadzać brzegów owrzodzenia,
- posiadać prosty schemat stosowania.

Na rynku pojawiło się dotąd i pojawia nadal wiele bioaktywnych opatrunków spełniających powyższe kryteria, ale z różną efektywnością.

### **Cel:**

Moim celem było opracowanie opatrunku, który posiada cechy opatrunków bioaktywnych, dostępnych na rynku, ale wyróżniającego się innowacyjnością, polegającą na współdziałaniu z natywnymi procesami gojenia rany poprzez taką modyfikację genetyczną składu opatrunku, osiągniętą metodami inżynierii genetycznej, by miał on silne właściwości antyoksydacyjne, regenerujące błony biologiczne i indukujące proliferację komórek przyrannych realizowane *in situ*, w ranie.

### **Len:**

Uznałam, że za materiał do wytworzenia nowoczesnych opatrunków posłuży len, częściowo odwołując się do historii, z której wynika, że len towarzyszy człowiekowi od co najmniej dziesięciu wieków jako źródło surowcowe do wytwarzania tekstyliów oraz oleju, ale przede wszystkim odwołując się do współczesnej wiedzy o składzie biochemicznym surowca lnianego. W tym czasie współcześnie, szarpi lniane używano jako opasek uciskowych. Koncentrując się na lnianym wzięłam również pod uwagę korzystne warunki klimatyczne dla uprawy lnu w Polsce oraz wieloletnie tradycje związane z uprawą i przetwórstwem tej rośliny w Polsce.

Zespołowo wykonaliśmy liczne analizy fizyczne i biochemiczne włókien lnianych, które potwierdziły – poza wytrzymałością mechaniczną włókien (związaną z zawartością lignocelulozy), ich elastycznością, ich higroskopijnością (włókna mogą absorbować płyn zwiększając ponad 20% swoją wagę, lecz w dalszym ciągu pozostają suche w dotyku), przepuszczalnością dla tlenu („oddychaniem włókien”, co powoduje, że są one przewiewne) oraz niealergizowaniem – istotną dla gojenia ran aktywnością biologiczną w postaci aktywności antyoksydacyjnej, związanej z dużą zawartością fenylopropanoidów.

Obecność waniliny i kwasu wanilinowego we włóknach lnu silnie sugerowała ich działanie antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne, podobnie jak kwasy ferulowy i kumarowy, unieszkodliwiające wolne rodniki tlenowe.

Właściwości biochemiczne włókna lnianego korzystnie odróżniają go od włókna bawełnianego, którego niemal wyłączną składową jest celuloza. Obecność naturalnych antyoksydacyjnych składników we włóknie lnianym sprawia, że jest możliwe ich biotechnologiczne zwiększenie do takiego stężenia, aby włókna można było użyć do wytworzenia nie tylko tekstyliów, ale również do produkcji opatrunków, mat chirurgicznych, bielizny szpitalnej i wszędzie tam, gdzie zastosowanie przeciwutleniaczy jest korzystne.

Oprócz włókna, którego źródłem jest słoma lniana, len dostarcza również nasiona. Nasiona lnu zawierają od 40 do 45% tłuszczu o dużej wartości odżywczej, ze względu na wysoką zawartość kwasów tłuszczowych wielonienasyconych, w tym kwasu linolenowego (ALA) i linolowego (LA), obecność fitosteroli, witaminy A i E a także lignanów. Ponieważ ALA, jak i LA zawarte w siemieniu lnianym nie są syntetyzowane w organizmie ludzkim, są one bardzo ważnym elementem diety i stanowią substraty do syntezy kwasów tłuszczowych grupy  $\omega 3$  i grupy  $\omega 6$ . ALA jest substratem do syntezy istotnych składników błon plazmatycznych tj. kwasów eikozapentanowego (EPA) i dokozaheksanowego (DHA) oraz powstających z nich czynników regulatorowych (eikozanoidów), natomiast LA daje początek syntezie kwasu arachidonowego i eikozanoidom pochodzącym z metabolizmu tego kwasu. Istotnym skutkiem stosowania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest wzrost elastyczności i płynności błon plazmatycznych komórek ludzkich. Badania wykazują, iż spożywanie ALA obniża ryzyko zachorowania na niektóre nowotwory oraz zawał mięśnia sercowego. Wytłoki nasion lnu są natomiast źródłem wartościowych związków chemicznych takich jak lignany o właściwościach antynowotworowych oraz metabolity izoprenoidowe i fenylopropanoidowe o czynności przeciwzapalnej (sterole, terpeny) i przeciwbólowej (kanabidiol).

Zatem, poza włóknami lnianymi, w toku eksperymentów, postanowiłam wykorzystać również inne produkty surowcowe lnu w postaci ekstraktu z wyłoków z nasion lnu i emulsji oleju, w których stwierdzono nawet szersze niż we włóknach spektrum antyoksydantów, a przez to silniejsze działanie neutralizujące wolne rodniki tlenowe.

Uzyskane dane analityczne przede wszystkim wykazały, że len zawiera czynne szlaki biosyntezy fenylopropanoidów i izoprenoidów, a zatem zawiera w swoim genomie geny, które są aktywne, których ekspresja dostarcza enzymów produkujących metabolity o funkcji

antyoksydacyjnej. Zatem, chociaż poziom syntezy tych drugorzędowych metabolitów jest relatywnie niewielki w lnieniu, to istnienie samego szlaku sprawia, że ułatwiony jest proces wzmocnienia aktywności endogennych genów narzędziami inżynierii genetycznej.

Obiecujące przesłanki teoretyczne i wyniki wstępnych badań pozwoliły mi na sformułowanie hipotezy o możliwości wykorzystania naturalnych produktów do wspomagania leczenia uszkodzeń ludzkiego ciała. Przygotowałam wstępny projekt, którym zainteresowałam zespół biotechnologów i zachęciłam do podjęcia się wspólnej realizacji zadania wytworzenia roślin, których produkty surowcowe byłyby wyposażone metodami inżynierii genetycznej w szerokie spektrum antyoksydantów, które z kolei stanowiłyby podstawę stworzenia lnianego opatrunku bioaktywnego.

### **Opatrunek lniany:**

Spodziewałam się, że taki opatrunek, o wysokim potencjale antyoksydacyjnym, wyposażony w związki o czynności regenerującej błony plazmatyczne komórek i stymulujący proliferację komórek oraz aktywny w zakresie genów przeciwzapalnych, będzie promował szybsze gojenie się przewlekłych owrzodzeń, uderzając w zasadniczy problem gojenia ran na poziomie molekularnym.

Aby wzmocnić potencjał antyoksydacyjny produktów surowcowych lnienia, podjęto się modyfikacji genetycznej rośliny, w ten sposób, że wprowadzono do jej genomu dodatkowe kopie genów kontrolujących szlaki biosyntezy metabolitów drugorzędowych, a przez to zwiększono stężenie antyoksydantów.

W innym działaniu wyposażono włókno lniane w polimer hydroksymaślanu, syntetyzowany w roślinie wraz z jej wzrostem. Polimer nie występuje naturalnie w lnieniu, natomiast jego monomery są obecne zarówno w roślinach jak i w organizmie ludzkim, pełniąc funkcję indukcji proliferacji komórek.

Reasumując, źródłem surowcowym włókna lnianego stały się dwa typy roślin, z których jedne charakteryzowały się podwyższonym stężeniem antyoksydantów ze szlaku fenylopropanoidowego a drugie, obok zwiększonej zawartości antyoksydantów, syntetyzowały polimer hydroksymaślanu.

Produktem finalnym były dwa typy tkaniny i, konsekwentnie, dwa typy opatrunków, których właściwości i obszar medycznego zastosowania jest moim osiągnięciem naukowym.

W publikacjach, w których opisałam efekty tych badań, oceniłam wpływ opatrunków na poszczególne fazy gojenia ran: początkowo w badaniach *in vitro*, następnie w badaniach na zwierzętach i ostatecznie w badaniach prospektywnych z udziałem ludzi.



Wykazałam wiele korzystnych cech przydatnych w terapii przewlekłych owrzodzeń, które – ze względu na zastosowany materiał do wyrobu opatrunków – okazały się unikatowe. Moje szczególne zainteresowanie dotyczyło przełożenia właściwości biochemicznych nowo wytworzonych opatrunków na efekty kliniczne, czyli gojenie przewlekłych owrzodzeń u ludzi.

### **Jednotematyczny cykl publikacji:**

Powyższym zagadnieniom jest poświęcony prezentowany cykl publikacji stanowiących podstawę mojego osiągnięcia naukowego.

**Publikacja numer 1** (*Skórkowska-Telichowska K., et al. Fizjologia i patologia przewlekle niegojących się owrzodzeń oraz sposoby ich miejscowego leczenia w świetle współczesnej wiedzy medycznej. Dermatologia Praktyczna.*) jest pracą pogładową, której powstanie było konsekwencją szczegółowego przeglądu piśmiennictwa, dokonanego przeze mnie, na temat etiologii i patofizjologii przewlekłych owrzodzeń oraz sposobów ich leczenia, zgodnie z aktualnymi wytycznymi. Liczba publikacji naukowych poświęconych wybranemu tematowi pozostaje zazwyczaj w prostej korelacji z jego istotnością. Wyszukiwanie danych dotyczących leczenia przewlekłych ran oparłam na strategii obejmującej przeglądanie dostępnych czasopism, elektronicznych baz danych wraz z bibliografią z lat 1999-2008, doniesień z konferencji naukowych, kontaktów z firmami produkującymi opatrunki oraz pochodzących od nich niepublikowanych danych. Przyjęta strategia wyszukiwania ujawniła 17 739 artykułów, dotyczących stosowania różnych typów opatrunków, z tego 1684 spełniało kryteria włączenia do analizy (brałam pod uwagę owrzodzenia przewlekle o etiologii żylniej, cukrzycowej i owrzodzenia troficzne (odleżyny) oraz badania randomizowane, z podwójnie ślepą próbą, trwające minimum 12 tygodni i spełniające kryteria EBM, brak konfliktu interesów). Najwięcej badań dotyczyło owrzodzeń o etiologii żylniej (716) i odleżyn (732), mniej owrzodzeń w stopie cukrzycowej (133) oraz owrzodzeń na tle miażdżycy (103). W latach 2002-2008 opublikowano 4 duże metaanalizy, których celem była ocena sposobów leczenia ran przewlekłych za pomocą różnych typów opatrunków i porównanie ich efektywności. Efekt działania na rany przewlekle opatrunków bioaktywnych w stosunku do opatrunków tradycyjnych (kompres jałowy lub niejłowy z gazy bawełnianej) był dużo silniejszy (przyspieszenie gojenia ran, łatwiejsze i trwające krócej oczyszczanie ran, szybsze zmniejszenie ich powierzchni), natomiast różnice pomiędzy opatrunkami bioaktywnymi zwykle były niewielkie.

Podczas, gdy w pozycji numer 1 piśmiennictwa szeroko opisałam patofizjologię owrzodzeń najczęściej spotykanych w pracy klinicysty i dyskutowałam mechanizmy, według których przebiega prawidłowe gojenie ran, a następnie opisywałam czynniki, które zaburzają prawidłowe gojenie owrzodzeń, na poziomie komórkowym, w **publikacji numer 2** (*Skórkowska-Telichowska K., et al. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. J Am Acad Dermatol.*) skoncentrowałam się na opisie dostępnych na rynku opatrunków i sposobów leczenia owrzodzeń z ich udziałem. W pracy tej nacisk położyłam na praktyczne aspekty leczenia miejscowego ran przewlekłych, omawiając skład opatrunków, a co za tym idzie, na jaki etap gojenia ran i jakiego rodzaju ran najlepiej je zastosować, wskazania i przeciwwskazania do ich stosowania, możliwe i najczęściej spotykane działania niepożądane oraz przykłady nazw handlowych opatrunków obecnych w ofercie rynkowej.

Wnioskiem z obu prac pogładowych była potrzeba wytworzenia opatrunku posiadającego cechy dostępnych na rynku opatrunków bioaktywnych wraz ze wzbogaceniem go w unikatowe cechy, zwiększające kompatybilność z procesami zachodzącymi w ranie, promującymi jej gojenie, czyli – głównie – potęgującymi działanie antyoksydacyjne.

Postanowiłam wzbogacić len metodami inżynierii genetycznej, wzmagając natywne właściwości tak, by był bardziej efektywny w gojeniu ran. Rezultaty prac zamieściłam w **publikacji numer 3** (*Wróbel-Kwiatkowska M., Skórkowska-Telichowska K., et al. Biochemical, Mechanical, and Spectroscopic Analyses of Genetically Engineered Flax Fibers Producing Bioplastic (Poly-β-Hydroxybutyrate). Biotechnol. Prog.*), w której opisałam dokonanie analiz biochemicznej i biomechanicznej wygenerowanych poprzez metody inżynierii genetycznej zmodyfikowanych włókien lnianych, wzbogaconych w polimer polihydroksymaślanu (*poly-beta-hydroxybutyrate, PHB*) oraz porównanie ich z natywnymi roślinami.

By uzyskać takie rośliny, wprowadzono do ich genomu i doprowadzono do wzmożonej ekspresji trzy geny bakteryjne z *Ralstonia eutropha* kodujące wszystkie enzymy (beta-ketotiolazę, reduktazę aceto-acetylo-CoA i syntazę *PHB*) niezbędne do produkcji beta-polihydroksymaślanu. Krytycznym etapem w uzyskaniu roślin syntetyzujących polimer hydroksymaślanu umiejscowiony we włóknach było użycie konstrukcji genowej zawierającej promotor swoisty dla włókna i sekwencji DNA kierującej syntezę polimeru do plastydów. Użyto wcześniej sklonowanego promotora genu jednej z izoform białek 14-3-3 o silnej ekspresji w wiązkach przewodzących. Geny 14-3-3 o bardzo wysokiej homologii występują również w komórkach ludzkich. Badania nad obecnością

białka 14-3-3 w limfocytach krwi obwodowej chorych były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej.

Wybór *PHB* jako czynnika wzbogacającego właściwości biologiczne włókna lnianego był podyktowany faktem, że w kontakcie z płynami ustrojowymi człowieka ulega on rozpadowi do monomerów, silnie promujących proliferację komórek. Na poziomie molekularnym hydroksymaślan hamuje deacetylację histonów, a zatem uniemożliwia wyciszenie genów. Monomery *PHB* są obecne w organizmie ludzkim. Pomimo, że zawartość tego związku oceniono w analizie chromatografii gazowej z detekcją mas jako niską (0,43% wagi włókien), miał on duże znaczenie jeśli chodzi o biodegradowalność materiału (cecha korzystna dla środowiska) oraz bardzo dobrą adhezję do lignocelulozowych włókien lnianych, jak również zwiększenie wytrzymałości mechanicznej i elastyczności włókna modyfikowanego w stosunku do kontroli pozbawionej modyfikacji.

Ubočnym, ale korzystnym, efektem syntezy *PHB* w lnie był zwiększony poziom fenylopropanoidów, związków o silnie antyoksydacyjnym działaniu.

W związku z uzyskaniem spodziewanych, pozytywnych i obiecujących efektów zaplanowano kolejne eksperymenty.

Odnosnie do danych mniej istotnych z medycznego punktu widzenia, lecz ważnych dla produkcji opatrunków, należy wskazać, iż zaobserwowano, że wzbogacone rośliny rosły prawidłowo i ich produktywność nie zmieniła się istotnie w stosunku do kontroli. Ponadto, uzyskano większą ilość materiału z tej samej hodowli roślin transgenicznych niż zwykłych w trakcie procesu roszenia (roszenie jest to sposób pozyskiwania włókien, stosowanych w medycynie i przemyśle z roślin lnu), choć wydajność mierzona ilością włókien pozyskanych z rośliny dla roślin transgenicznych była nieco mniejsza niż dla odmian niemodyfikowanych. Wykazano, że synteza *PHB* nie wpłynęła istotnie na syntezę innych natywnych polimerów jak pektyny, ligniny i celuloza, o ważnym znaczeniu dla integralności roślin.

Obok bezpośredniego zastosowania włókna lnianego z *PHB* do produkcji tekstyliów lub w formie tkaniny do zastosowania medycznego (opatrunki lniane) intensywnie rozwijany jest również obszar zastosowania włókna jako biodegradowalnego komponentu biokompozytów. W tym zakresie wraz z zespołem przeprowadziliśmy eksperymenty, polegające na tworzeniu kompozytów ropopochodnych polimerów (polipropylen, polistyren) z włóknami naturalnymi i ich zastosowaniu w wielu dziedzinach, z medycyną włącznie. Szczególne znaczenie miały prace dotyczące tworzenia kompozytów w celu ich zastosowania w inżynierii tkankowej (jako rusztowanie do wzrostu komórek), uzupełniania ubytków

tkankowych (w ortopedii) oraz jako implantów. We wszystkich wzmiankowanych przypadkach ważnym jest kompatybilność naturalnego włókna hydrofilowego z hydrofobową osnową polimerową, której brak skutkuje osłabieniem materiału na granicy faz włókno naturalne – włókno syntetyczne. Korzystnym zatem było wytworzenie włókna kompozytowego (bioplastikowego), który stanowi naturalnie syntetyzowany polimer celulozy połączony wiązaniami chemicznymi (wodorowe i estrowe) z polimerem takim, jak polihydroksymaślan (*PHB*). Obecność polihydroksymaślanu we włóknach bioplastikowych gwarantuje dobrą i sprawdzoną ich adhezję z hydrofobowymi polimerami syntetycznymi oraz biodegradowalność. W badaniach ustalono, że zastąpienie 20% polipropylenu w produktach przez włókna lniane bioplastikowe nie zmienia ich właściwości mechanicznych w porównaniu z czystym polipropylenem.

W publikacji numer 4 (Szopa J., Wróbel-Kwiatkowska M., Kulma A., Żuk M., Skórkowska-Telichowska K., et al. *Chemical composition and molecular structure of fibers from transgenic flax producing polyhydroxybutyrate and mechanical properties and platelet aggregation of composite materials containing these fibers. Compos. Sci. Technol.*) opisałam zatem dalsze eksperymenty, oceniające właściwości biochemiczne i biofizyczne pozyskanych włókien z *PHB* (włókna bioplastikowe) oraz agregację płytek krwi na wytworzonym materiale biokompozytowym, zawierającym włókno bioplastikowe, zatopione w syntetycznym polimerze, w szerokim rozumieniu co do możliwych zastosowań wytworzonego materiału – nie tylko jako opatrunek do leczenia ran, ale również jako materiał do produkcji, przykładowo – implantów. W owrzodzeniach korzystnym jest, by nie dochodziło do agregacji płytek na materiale opatrunkowym, z powodu „wciągania go” w głąb owrzodzenia, co może powodować uszkodzenie czopu hemostatycznego tworzącego macierz zewnątrzkomórkową (będącą podłożem, dzięki któremu możliwe jest współdziałanie komórek, biorących udział w gojeniu ran) oraz naczyń świeżo tworzącej się ziarniny, za każdym razem, gdy opatrunek będzie zmieniany. Wykazaliśmy, że zarówno polipropylen (PP) czysty, jak i w kompozycie z włóknami niemodyfikowanymi jak i modyfikowanymi, wzbogaconymi w egzogeny, bakteryjny *PHB* powodował agregację płytek krwi, czego nieoczekiwanie nie powodował kompozyt PP z włóknami transgenicznymi (z *PHB*).

W badaniach *in vitro* ustaliliśmy również, że włókna lniane plastikowe posiadają działanie bakteriostatyczne. Stąd, włókno lniane z *PHB*, jak również jego kompozyty z syntetycznymi polimerami, wydały się być najkorzystniejsze do wykorzystania odpowiednio w opatrunkach i potencjalnie w implantach do wszczepień kostnych.

Zatem, włókna bioplastikowe i biokompozyty z użyciem włókna bioplastikowego otwierają nową, dotychczas nieznaną, drogę ich zastosowania jako materiału opatrunkowego oraz implantów w inżynierii tkankowej. W pracach innego zespołu, wymienione kompozyty były z sukcesem zastosowane w inżynierii tkankowej.

Następnie, przeprowadziliśmy szereg eksperymentów, które opisałam w **publikacji numer 5** (*Kulma A., Skórkowska-Telichowska K., et al. New flax producing bioplastic fibers for medical purposes. Industrial Crops and Products*), nad wpływem badanego materiału wzbogaconego w PHB (dzięki temu osiągając pożądane właściwości biofizyczne opatrunku) oraz w fenole (o udowodnionym działaniu antyoksydacyjnym) na skórne fibroblasty. Wykazaliśmy stymulację proliferacji fibroblastów skórnych mysich i ludzkich oraz keratynocytów, nie wykazując działania szkodliwego (nekrozy badanych komórek). Wykazaliśmy również silne działanie przeciwbakteryjne badanego materiału w porównaniu z jałową gazą w stosunku do szczepów bakterii patogennych, najczęściej zanieczyszczających owrzodzenia (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*). Przejawiało się ono zahamowaniem wzrostu szczepów bakteryjnych. Wykazano również aktywność przeciwgrzybiczą badanego materiału w stosunku do 6 gatunków grzybów: *Candida krusei* 153 i 264, *Cryptococcus neoformans* 2110, *Trichosporon cutaneum* 662, *Candida tropicalis* 252 i *Candida albicans* 10231.

W publikacji tej opisałam także wstępne wyniki działania opatrunków w zaplanowanych przeze mnie pilotażowych badaniach z udziałem 22 pacjentów cierpiących z powodu wieloletnich, źle gojących się owrzodzeń, biorąc pod uwagę pojedynczy, najbardziej wymierny parametr w gojeniu owrzodzeń, a mianowicie wielkość owrzodzenia. Po 4 tygodniach leczenia uzyskałam istotną statystycznie ( $p < 0.001$ ) redukcję wielkości owrzodzeń w badanej grupie: średnio o 28%, pomimo krótkiego czasu stosowania leczenia w stosunku do długości trwania owrzodzeń (średnio 12 miesięcy).

Następnie, prześledziłam właściwości i działanie opatrunków lnianych wytworzonych z włókna lnianego pochodzącego z roślin z nadprodukcją pochodnych fenolowych. Z użyciem tych opatrunków opracowałam zoptymalizowaną technologię wspomagania leczenia ran i ran przewlekłych. Nowy len transgeniczny uzyskaliśmy przez wzbogacenie zwykłego lnu w kolejne trzy geny ze szlaku flawonoidowego. Wprowadziliśmy do genomu lnu równocześnie gen kodujący syntazę chalkonu, gen izomerazy chalkonu i gen reduktazy dihydroflawonolu, co pozwoliło nam uzyskać nowy typ lnu, którego włókna charakteryzowały się wysoką zawartością związków o czynności antyoksydacyjnej (kwasy fenolowe, flawonoidy, lignany) i posiadających luźniejszą strukturę polimerów celulozowych.

Pozyskane nowe rośliny, posłużyły nie tylko do izolacji włókien lnianych, ale również do pozyskania oleju o zwiększonej stabilności wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, jak również wyciągów nasiennych o zwiększonej zawartości antyoksydantów i szczególnego czynnika przeciwzapalnego i przeciwbólowego, jakim jest kanabidiol (*CBD*). Kanabidiol należy do nie psychotropowych terpenofenoli o funkcji aktywacji receptora CB2 w tkankach ludzkich, promuje on syntezę czynników przeciwzapalnych i hamuje syntezę cytokin prozapalnych.

Higroskopijność materiału lnianego, pozwalająca usunąć z owrzodzenia nadmiar wysięku bogatego w cytokiny prozapalne, a z drugiej strony – na utrzymanie wilgotności w ranie powodujące wymywanie do rany aktywnych substancji z opatrunku, to czynniki silnie promujące gojenie owrzodzenia. Luźne sploty materiału (i luźne ułożenie elementarnych włókien) z jednej strony nie ograniczały dostępu tlenu, z drugiej jednak chroniły ranę przed zanieczyszczeniami i urazami. Opatrunek był łatwy w użyciu (zmiana opatrunku następowała co 24h), dopasowywał się kształtem do rany.

Opierając się na wykonanych badaniach postawiłam hipotezę, że synergistyczne stosowanie nowej tkaniny lnianej, emulsji oleju lnianego oraz wyciągu z wyciągów nasion lnu stworzy optymalne warunki promujące leczenie trudno gojących się owrzodzeń.

W oparciu o wyszczególnione cechy tkaniny lnianej, oleju lnianego i wyciągów nasiennych oraz zgromadzone dane o braku działania alergizującego i drażniącego opatrunku na skórę zwierząt (szczurów) i ludzką uzyskałam zgodę właściwej Komisji Bioetycznej do przeprowadzenia badań z udziałem ludzi.

Prospektywne badanie kliniczne, w którym potwierdziłam przełożenie pozytywnych cech biochemicznych i biofizycznych opatrunków na bazie zmodyfikowanego lnu na gojenie wieloletnich owrzodzeń u ludzi opisałam w **publikacji numer 6** (*Skórkowska-Telichowska K., et al. New dressing materials derived from transgenic flax products to treat long-lasting venous ulcers - a pilot study. Wound Repair Regen*). Było to pierwsze badanie z użyciem opatrunków lnianych tego typu.

Całość zaplanowanego przeze mnie trzyetapowego leczenia opatrunkami lnianymi trwała 12 tygodni. Etap pierwszy polegał na 4-tygodniowym traktowaniu owrzodzeń sterylną tkaniną lnianą nasączoną solą fizjologiczną. Na warstwę tkaniny lnianej przykładalam 3-4 warstwy gazy bawełnianej (zależnie od ilości wysięku). Zasadniczym celem tego etapu było usunięcie nadmiaru wysięku i oczyszczenie rany z fragmentów obumarłych tkanek – co wspomagać miało fazę oczyszczania owrzodzenia. Spodziewałam się, że różnica w higroskopijności pomiędzy gazą (bardziej higroskopijna na skutek procesu bielenia) i tkaniną

lnianą oraz mniejsze upakowanie polimerów celulozowych we włóknach lnianych spowoduje przesunięcie martwiczych tkanek i nadmiaru wysięku ponad tkaninę lnianą. Dodatkowo, obecność wodo-rozpuszczalnych fenylopropanoidów we włóknie lnianym miała spowodować złagodzenie stanu zapalnego, upośledzającego natywne fazy oczyszczania i proliferacji w gojeniu owrzodzeń. W kolejnych 4 tygodniach na ranę przykładałam opatrunek lniany nasączony emulsją oleju lnianego (etap drugi). Zadaniem tego etapu było wzmocnienie komórek przyrannych przez dostarczenie substratów do syntez lipidów błonowych (kwasu linolenowego) i wraz z lipidami, dostarczenie antyoksydantów (sterole, karotenoidy) oraz, jak w pierwszym etapie, dostarczenie czynników przeciwzapalnych wraz z tkaniną. Powstrzymanie stanu zapalnego i wzmocnienie błon plazmatycznych fibroblastów i keratynocytów z obrzeża owrzodzenia ma istotne znaczenie dla procesu leczenia (poprzez wspomaganie fazy proliferacji i fazy tworzenia blizny w gojeniu owrzodzeń), bowiem te właśnie komórki na skutek proliferacji pokrywają ranę w procesie jej gojenia. W etapie trzecim, trwającym również 4 tygodnie, na owrzodzenia przykładałam opatrunek lniany nasączony wyciągiem z wyłoków z nasion lnu. Obecność silnych przeciwutleniaczy we włóknie oraz wyciągu miało za zadanie przywrócenie równowagi pro- i antyoksydacyjnej, dodatkowo obecność lignanów miała za zadanie stymulację keratynocytów do proliferacji i porostania rany (wzmocnienie fazy tworzenia blizny i obkurczania rany w natywnym procesie gojenia owrzodzeń). Niezwykle ważnym było dostarczenie do rany kanabidiolu wraz z tkaniną i wyciągiem z wyłoków, którego zadaniem było promowanie syntezы czynników przeciwzapalnych i powstrzymanie syntezы cytokin prozapalnych.

Na tym etapie badań sformułowałam sugestię o możliwym synergistycznym zastosowaniu produktów z lnu o wymienionej charakterystyce w medycynie, a w szczególności do wspomagania leczenia uszkodzeń ciała człowieka.

Dwunastotygodniowa obserwacja chorych potwierdziła przypuszczenia i pozwoliła mi na sformułowanie wniosków, że opatrunki lniane oraz emulsja i ekstrakt z wyłoków lnianych są dobrze tolerowane przez pacjentów, nie powodując alergizacji, podrażnień ani innych miejscowych działań niepożądanych podczas trwania leczenia. Prosty schemat stosowania opatrunków odpowiadał chorym. Prawie wszyscy chorzy (90,9%) podali zmniejszenie dolegliwości bólowych, związanych z owrzodzeniem. Zmniejszenie ilości wysięku („osuszanie owrzodzeń”) zgłosiło 54% pacjentów, a oczyszczanie owrzodzenia i pojawienie się ziarniny stwierdzono u 81,8% badanych. Co najważniejsze, redukcję wielkości owrzodzeń stwierdzono u 81,8% obserwowanych chorych, wyleczenie drobnych zmian widoczne było już po 6 tygodniach, w pojedynczych przypadkach.

Wszystkie wymienione powyżej rozważania teoretyczne, wiedza zgromadzona podczas przeglądu piśmiennictwa tematycznego, zaprojektowanie, a następnie uzyskanie opatrunków na bazie genetycznie zmodyfikowanego lnu oraz przeprowadzone niezliczone badania zarówno *in vitro* jak i *in vivo* – z udziałem pacjentów, udokumentowane w powyższych publikacjach, zaowocowały stworzeniem patentu, którego jestem współtwórcą. Uzyskanie patentu zostało potwierdzone dokumentem patentowym (opis patentowy, **pozycja numer 7**, twórcy wynalazku: *Jan Szopa – Skórkowski, Magdalena Żuk, Katarzyna Skórkowska-Telichowska*).

Przedmiotem wynalazku została objęta tkanina uzyskana z genetycznie zmodyfikowanego lnu, pozyskiwana z transgenicznych roślin emulsja oleju lnianego oraz ekstrakt z wyłoków nasion, wzmacniające efekt antyoksydacyjny tkaniny opatrunku, jak również sposób wytwarzania opatrunków.

W opisie wynalazku znalazła się informacja o mechanizmach, dzięki którym opatrunki lniane przyczyniają się do gojenia przewlekłych owrzodzeń u ludzi. Zostało wymienione działanie antyoksydacyjne opatrunków, neutralizujące reaktywne formy tlenu w uszkodzonych przewlekłym zapaleniem tkankach, poprzez uwalnianie w wilgotnym środowisku owrzodzenia lignanów, pochodnych kumarowych, flawonoidów, proantycyjanów i innych związków fenylopropanoidowych.

Dwie kolejne publikacje to opisy wykonanych na poziomie komórkowym badań, analizujących mechanizm działania emulsji lnianej w gojeniu przewlekłych owrzodzeń. W **publikacji numer 8** (*Skórkowska-Telichowska K., et al. Emulsions made of oils from seeds of GM flax protect V79 cells against oxidative stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*) opisałam wpływ emulsji lnianej bogatej w antyoksydanty na stres oksydacyjny w zwierzęcych fibroblastach. Wykonaliśmy eksperymenty, do których użyliśmy emulsji pochodzącej z trzech linii transgenicznych roślin (W86 i W92 o dużej zawartości antyoksydantów – większej o odpowiednio 23% i 20% w stosunku do natywnej, niemodyfikowanej rośliny i GT o niższej zawartości antyoksydantów o 15% w stosunku do niemodyfikowanej rośliny), w trzech różnych stężeniach (0.5%, 1% i 5%) na fibroblasty płucne chomika chińskiego (V79), w których wymuszono stres oksydacyjny inkubacją w wodzie utlenionej (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Fibroblasty chomika wybrano, ponieważ są uznanym materiałem służącym jako materiał modelowy do eksperymentów, są łatwo dostępne na rynku, niewymagające w hodowli, tanie oraz mają wspólne cechy z ludzkimi komórkami fibroblastów skórnych, dużo trudniejszymi do uzyskania i w hodowli.



Stwierdziliśmy, że emulsja lniana chroni komórki przed negatywnym działaniem  $H_2O_2$ , a efekt ten zależy od stężenia. Dodatek emulsji lnianej do hodowli komórkowej redukuje wewnątrzkomórkowe stężenie RFT (reaktywnych form tlenu), tym sposobem chroniąc genomowy DNA przed uszkodzeniem w mechanizmie stresu oksydacyjnego. Stopień proliferacji komórek był wysoki w niskim stężeniu emulsji, podczas gdy dodatek bardziej stężonego roztworu powodował istotne zmniejszenie proliferacji fibroblastów i zwiększoną ich skłonność do apoptozy. Szczegółowa analiza wyselekcjonowanych genów wykazała zwiększoną ekspresję acetylazy histonowej (MYST) i deacetylaz, interpretowane jako wpływ podanej emulsji. Acetylacja/deacetylacja jest jedną z kluczowych modyfikacji histonów. Istnieje korelacja pomiędzy zwiększonym poziomem acetylacji histonów a wzmożoną ekspresją genów. Dzieje się to poprzez wywoływanie (poprzez neutralizację oddziaływań jonowych) zmian konformacyjnych nukleosomu, co przyczynia się do rozluźnienia chromatyny, przez co DNA staje się bardziej dostępny dla czynników transkrypcyjnych. Ekspresja genów zaangażowanych w proces apoptozy (rodzina *BCL2*, kaspaza-9, *DFP: DNA Fragmentation Factor* lub *Caspase-activated DNase*), genów o działaniu zapalnym (Interleukiny 6) i przeciwwzapalnym (*ICAM, Intercellular Adhesion Molecule 1*) była również sprawdzana i zmieniała się pozytywnie po zastosowaniu emulsji.

Wnioskiem z pracy było, że badana emulsja lniana (głównie z dwóch typów roślin - W86 i W 92) wykazuje silny efekt ochronny w stosunku do komórek, a w szczególności chroni komórkowy materiał genetyczny przed uszkodzeniem pod wpływem stresu oksydacyjnego.

Opis ciągu dalszego doświadczeń na podobnym materiale komórkowym zawarłam w **publikacji numer 9** (*Skórkowska-Telichowska K., et al. Prozdrowotne działania olejów z lnu. Wnioski z badań w hodowlach komórkowych. Bromatol. Chem. Toksyk.*). Celem ich było prześledzenie reakcji komórek testowych (fibroblastów płucnych chomika chińskiego i linii ludzkich komórek monocytoidalnych) na preparat emulsji lnianej oraz porównanie efektów działania na te komórki emulsji lnianej pozyskanej z nasion lnu modyfikowanego i niemodyfikowanego genetycznie. Praca miała służyć ocenie mechanizmów działania emulsji lnianej na komórki, występujące w owrzodzeniu i odgrywające ważną rolę w jego gojeniu. W serii eksperymentów wykazałam, że inkubacja komórek z badaną emulsją nasilała *in vitro* proliferację fibroblastów zwierzęcych, natomiast hamowała (w wyższych stężeniach) proliferację ludzkich komórek monocytoidalnych oraz wywierała efekt modulujący generowanie rodników szeregu tlenowego w komórkach monocytoidalnych: nasilała produkcję rodników tlenowych w komórkach pozostających w spoczynku, a obniżała poziom

wolnych rodników w komórkach stymulowanych do ich wytwarzania. Uzyskane wyniki wskazują, że emulsja lniana ma działanie stymulujące regenerację tkanek oraz modulującą funkcję monocytów w odczynie zapalnym.

### **Podsumowanie:**

Podsumowując, przedstawiony cykl publikacji jest próbą odtworzenia zaplanowanych przeze mnie i przeprowadzonych na przestrzeni kilku ostatnich lat licznych eksperymentów *in vitro*, uzupełnionych badaniami na zwierzętach i potwierdzonych w badaniach klinicznych z udziałem ludzi, na temat stworzenia opatrunku bioaktywnego, kompatybilnego z naturalnym procesem gojenia przewlekłych owrzodzeń u ludzi, oceną jego aktywności i bezpieczeństwa.

Moim najważniejszym osiągnięciem naukowym jest opracowanie koncepcji leczenia ran opatrunkami lnianymi o niespotykanych w innych materiałach opatrunkowych właściwościach przywracających równowagę oksydo-redukcyjną w owrzodzeniu (co wycisza stan zapalny w owrzodzeniu), oraz promujących gojenie przez wpływ na natywne komórki przyczyniające się do gojenia owrzodzenia (fibroblasty, keratynocyty) poprzez stabilizację ich błon komórkowych oraz promocję ich proliferacji.

Ważnym aspektem leczenia opatrunkami jest również uśmierzanie bólu, związanego zwykle z występowaniem przewlekłego owrzodzenia.

Wymienione właściwości zostały przeze mnie zaplanowane i wprowadzone do materiału roślinnego metodami inżynierii genetycznej.

Wykonane przeze mnie badania z udziałem ludzi w pełni potwierdziły słuszność opracowanej koncepcji.

### **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:**

Poza powyższym cyklem ośmiu artykułów oraz patentem, będących podstawą do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy obejmuje publikacje, których tematyka odzwierciedla moje wieloletnie zainteresowania zagadnieniami z kręgu angiologii i endokrynologii.

Wykazane prace różnią się wykorzystaniem modeli badawczych, zarówno w eksperymentach przeprowadzanych *in vitro*, jak i *in vivo*. Szeroki wachlarz zainteresowań pozwolił mi na zdobycie umiejętności swobodnego posługiwania się dostępnymi narzędziami badawczymi. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych.

Ze względu na tematykę poruszanych zagadnień można je pogrupować następująco:

## 1) Cykl publikacji uzupełniających poświęcony leczeniu przewlekłych owrzodzeń u ludzi.

Wszystkie analizy i badania opisane w pierwszej części wniosku oraz wiedza i doświadczenie zdobyte podczas przeprowadzania badań przyczyniły się do mojego współautorstwa w kolejnych rozprawach naukowych.

W rozdziale książki pt. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies* podsumowano takie zagadnienia, jak metody pozyskiwania lnu modyfikowanego w kierunku szerokiego zastosowania medycznego, w szczególności wykorzystania produktu surowcowego z tych roślin do wytworzenia opatrunków, służących do leczenia miejscowego owrzodzeń - rozdział 17 w książce: *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies* (ed. Małgorzata Anna Komorowska, Sylwia Olsztyńska-Janus; Rijeka) pt. *Flax Engineering for Biomedical Application* (Czemplik M, Boba A, Kostyn K., Kulma A., Mituła A., Sztajnert M., Wróbel-Kwiatkowska M., Żuk M., Szopa J. and Skórkowska-Telichowska K. InTech, 2011; s.407-434 ISBN 978-953-307-514-3; **KBN/MNiSW: 7 pkt.**

W kolejnych badaniach podjęłam zagadnienie stworzenia opatrunku dedykowanego grupom pacjentów o zdefiniowanym typie owrzodzenia pod względem jego etiologii, to jest wspomagającego gojenie ran o etiologii żylniej, owrzodzeniom w przebiegu stopy cukrzycowej oraz odleżynom. Materiałem wyjściowym do stworzenia opatrunków były rośliny z akumulacją antyoksydantów oraz polimeru hydroksymaślanu. Czynnikiem optymalizującym opatrunki były zróżnicowany skład i stężenie antyoksydantów w aktywatorach opatrunku. Aktywatorami opatrunku nazwano emulsję oleju lnianego oraz wyciąg z wytlóków lnianych. Zmieniając procentowy udział oleju w emulsji oraz procentowy udział związków tzw. wolnych (ekstrahowanych wodnym roztworem etanolu) i związanych (ekstrahowanych wodnym roztworem etanolu po wcześniejszej hydrolizie alkalicznej ścian komórkowych roślin) uzyskiwano zmienny skład i stężenie antyoksydantów w aktywatorach opatrunku.

Zatem, opracowałam skład biochemiczny opatrunku optymalny dla określonej grupy pacjentów. Zaznaczam jednak, że przedstawione w publikacjach zagadnienia dotyczą pojedynczych pacjentów i stąd wymagają dalszych badań. W ten sposób powstała seria trzech publikacji, będących opisami przypadków, w których postanowiłam zwrócić uwagę na zastosowanie lnianych opatrunków w leczeniu przewlekłych owrzodzeń o różnej etiologii: przewlekłej odleżyny, przewlekłego owrzodzenia na stopie powstałego w przebiegu cukrzycy, przewlekłych owrzodzeń na kończynach dolnych, spowodowanych niewydolnością żylną.

W każdej z tych publikacji omówiłam etiologię owrzodzenia, przebieg gojenia owrzodzenia pod wpływem zastosowania opatrunków lnianych oraz przedyskutowałam mechanizmy, dzięki którym to gojenie przebiegało.

W pierwszej pracy, dotyczącej leczenia występujących od ponad dwóch lat odleżyn w obrębie pośladków (pacjent po uszkodzeniu rdzenia kręgowego po wypadku samochodowym, z trwałym niedowładem kończyn dolnych, poruszający się na wózku inwalidzkim), opisałam kompletne wygojenie ran po 12 tygodniach zaplanowanej przeze mnie terapii (Skórkowska-Telichowska K., Kulma A., Żuk M., Czuj T., Szopa J. *The Effects of Newly Developed Linen Dressings on Decubitus Ulcers* Journal of Palliative Medicine. 2012; 15 (2): 146-148); **IF 1,891; MNiSW/KBN: 30 pkt.**

W drugiej pracy opisałam znaczne zmniejszenie powierzchni trwającego od trzech lat i dotychczas stale powiększającego się owrzodzenia na stopie, powstałego w przebiegu trwającej ponad 16 lat cukrzycy u chorego, ze wszystkimi możliwymi powikłaniami makro- i mikroangiopatycznymi, polineuropatią, w trakcie dializoterapii. Pomimo źle kontrolowanej cukrzycy zaobserwowałam po raz pierwszy podczas dwunastotygodniowego leczenia opatrunkami lnianymi, emulsją i ekstraktem z wytlóków zastosowanymi w schemacie opisanym w publikacji numer 6 – istotne zmniejszenie wielkości owrzodzenia (Skórkowska-Telichowska K., Kulma A., Szopa J. *The response of diabetic foot to a new kind of dressing.* International Archives of Medicine. 2012;5:33-36).

W pracy trzeciej opisałam pełne wygojenie licznych owrzodzeń o czasie trwania około 5 lat, powstałych jako wyraz niewydolności żylnych żył kończyn dolnych u pacjenta, również w trakcie dwunastotygodniowego leczenia (Skórkowska-Telichowska K., Kulma A., Żuk M., Szopa J. *The Effect of a New Type of Dressing for Chronic Venous Wounds.* British Journal of Medicine & Medical Research. 2014; 4(12):2463-2469.); **MNiSW/KBN: 8 pkt.**

## **2) Publikacje poświęcone rehabilitacji ruchowej u pacjentów z chromaniem przestankowym.**

Są to prace pogładowe i oryginalne, związane z przeprowadzeniem badań, dotyczących zastosowania różnych modeli rehabilitacji ruchowej u pacjentów z miażdżycą zarostową, z chromaniem przestankowym. Różne formy długotrwałej, nadzorowanej rehabilitacji ruchowej są sprawdzonym postępowaniem o udowodnionej skuteczności w grupie chorych z chromaniem przestankowym, wydłużającym istotnie dystans chromania, redukującym ryzyko sercowo-naczyniowe oraz zmniejszającym śmiertelność w tej grupie chorych. Wybór metody rehabilitacji w tej grupie pacjentów w świetle współczesnej wiedzy medycznej nie

jest jednoznaczny. W projekcie ocenione były parametry siłowo-prędkościowe pacjentów z chromaniem przestankowym w stosunku do osób zdrowych oraz zmiany tych parametrów w odpowiedzi na trening. Porównywane były trzy uznane metody rehabilitacji ruchowej: trening marszowy na bieżni ruchomej, Nordic walking oraz trening łączony: izokinetyczny z użyciem aparatu Biodex 4 połączony z treningiem Nordic walking. Średnie wartości parametrów siłowo-prędkościowych (szczytowy moment siły, średnia moc, praca całkowita, współczynnik agonistów do antagonistów) okazały się być istotnie niższe w grupie osób z przewlekłą niewydolnością tętniczą kończyn dolnych w porównaniu do grupy w tym samym wieku bez problemów naczyniowych. Program rehabilitacji ruchowej pacjentów z przewlekłą niewydolnością tętniczą kończyn dolnych powinien więc uwzględniać ćwiczenia siłowe, wytrzymałościowe i wydolnościowe. Kolejny nasz wniosek jest taki, że Nordic walking jest równie skuteczny jak standardowy trening na bieżni (prowadzony zgodnie z zaleceniami TASC II). Niższe koszty, większa dostępność tej formy usprawniania to dodatkowe korzyści, które powinny być brane pod uwagę przez towarzystwa naczyniowe włączając Nordic walking do programów rehabilitacji pacjentów z chromaniem przestankowym. Tematyka cyklu jest związana z moim zainteresowaniem etiopatogenezą miażdżycy zarostowej.

- Bulińska K., Kropielnicka K., Jasiński T., Dąbrowska G., Jasiński R., Skórkowska-Telichowska K., Pilch U., Szuba A. *Kompleksowa rehabilitacja pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych z chromaniem przestankowym. The Comprehensive Rehabilitation of Patients with Chronic Lower Limb Ischemia with Intermittent Claudication*. Fizjoterapia. 2012; 20 (4): DOI: 10.2478./v10109-012-0030-1; **Pkt. MNiSW/KBN: 5 pkt.**
- Dziubek W., Bulińska K., Stefańska M., Woźniewski M., Kropielnicka K., Jasiński T., Jasiński R., Pilch U., Dąbrowska G., Skórkowska-Telichowska K., Wojcieszczyk-Latos J., Kałka D., Janus A., Zywar K., Paszkowski R., Szuba A. *Peripheral Arterial Disease Decreases Muscle Torque and Functional Walking Capacity in Elderly*. Maturitas. 2015; 81 (4): 480–486; **IF 2.942, MNiSW/KBN: 35 pkt.**
- Skórkowska-Telichowska K., Pilch U., Szuba A. *Analiza aktualnej literatury na temat wpływu rehabilitacji ruchowej na tradycyjne i nowe parametry biochemiczne u pacjentów z miażdżycą zarostową. Review. Analysis of up-to-date studies investigating effects of physical rehabilitation on traditional and novel biochemical parameters in PAD patients with intermittent claudication. Review*. Acta Angiol 2015;121(2):66-74. Doi: 10.5603/AA.2015.0013; **MNiSW/KBN 7 pkt.**

- Bulińska K., Kropielnicka K., Jasiński T., Wojcieszczyk- Latos J., Pilch U., Dąbrowska G., Skórkowska-Telichowska K., Kałka D., Zywar K., Paszkowski R., Woźniewski M., Szuba A., Jasiński R. *Nordic pole walking improves walking capacity in claudicants. Randomized controlled.* Disability and Rehabilitation, 2015; DOI:10.3109/09638288.2015.1077398; **IF 1,985; MNiSW/KBN: 30 pkt.**

Moje zainteresowania dotyczące miażdżycy, począwszy od okresu studiów zaowocowały powstaniem pracy pogładowej, w której dyskutowałam jej etiologię zakaźną – patogeny zaangażowane w powstawanie blaszki miażdżycowej oraz mechanizmy, które się do rozwoju miażdżycy przyczyniają. Koncepcja pracy wiązała się z rozumieniem procesu miażdżycowego jako ogólnoustrojowej choroby zapalnej (Skórkowska K. *Inne niż Chlamydia pneumoniae czynniki zakaźne a miażdżycy tętnic.* Kardiologia Polska, 2001; 54: 57-61.); **MNiSW/KBN: 4 pkt.**

**3) Opisy przypadków, artykuły poświęcone kontrowersjom w leczeniu, napotkanym trudnościom diagnostycznym i terapeutycznym na przykładzie konkretnych pacjentów, spotkanych w trakcie pracy klinicysty.**

- Balawejder M., Skórkowska-Telichowska K., Kuniej T., Tuchendler R. *Insulinoma located in the head of the pancreas: Is there an alternative to surgery?* International Journal of Case Reports and Images 2014;5(4):285–294.
- Tabin M., Tuchendler R., Skórkowska-Telichowska K.: *Rabdomioliza w przebiegu stosowania skojarzonej terapii statyną z fibratem u pacjenta z poamiodoranową niedoczynnością tarczycy.* Kardioprofil 2012;10(3):217-221.
- Skórkowska-Telichowska K., Szymczak R., Lisiewicz- Jakubaszko J., Gawryś G., Tuchendler R. *„Holiday” insulinoma- case report.* The Endocrinologist 2009;19(2),64-65; **IF: 0.102. MNiSW/KBN: 13 pkt.**
- Zdrojowy K., Zdrojowy R., Skórkowska- Telichowska K.: *Zapalenie naczyń w przebiegu raka nerki - opis przypadku.* Adv. Clin. Exp. Med. 2005;14(2):391-396. **MNiSW/KBN: 5 pkt.**

**4) Wpływ radiojodu zawartego w środkach kontrastowych, powszechnie stosowanych w kardiologii interwencyjnej na budowę i funkcję tarczycy u dorosłych pacjentów, mieszkańców Dolnego Śląska.**

Zaplanowane przeze mnie prospektywne badanie kliniczne, polegające na ocenie wpływu jednorazowo podanego środka kontrastowego stosowanego standardowo podczas

planowych zabiegów kardiologii interwencyjnej (koronarografia, PTCA), zawierających jod organiczny na budowę i funkcję gruczołu tarczowego w dorosłej populacji mieszkańców Dolnego Śląska.

Wszystkie środki kontrastowe stosowane rutynowo w radiologii oraz kardiologii i radiologii interwencyjnej w Polsce zawierają duże dawki jodu, wielokrotnie przekraczające dobowe zapotrzebowanie dorosłego człowieka na ten pierwiastek. Moje badanie odpowiedziało pozytywnie na pytanie, czy dostarczenie dużej ilości jodu przekłada się na zmiany w budowie gruczołu tarczowego i jego funkcji u pacjentów obciążonych chorobą niedokrwinną serca, zakwalifikowanych do planowych zabiegów koronarografii i PTCA, z ujemnym wywiadem własnym i rodzinnym w stosunku do chorób tarczycy (Skórkowska-Telichowska K., Kosińska J., Szymczak R., Tuchendler D., Tuchendler R., Telichowski A., Szajn G., Bolanowski M. *Comparison and assessment of thyroid morphology and function in inhabitants of Lower Silesia before and after administration of a single dose of iodine-containing contrast agent during cardiac intervention procedure.* Endokrynol. Pol. 2012;63(4):294-299.); **IF: 1.070. MNiSW/KBN: 10 pkt.**

#### **5) Opracowanie algorytmów postępowania z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.**

Praca w Klinice Angiologii oraz doświadczenia zdobyte w trakcie badań naukowych, jak również pracy klinicysty zaowocowały propozycją opracowania algorytmów postępowania w żylną chorobą zakrzepowo-zatorową, opartych na aktualnym przeglądzie piśmiennictwa i własnych doświadczeniach oraz doświadczeniach Ośrodka (Skórkowska-Telichowska K., Szuba A. *Żylna choroba zakrzepowo-zatorowa (ŻChZZ) w wybranych sytuacjach klinicznych* Med. Dypl. 2011 z. eduk. nr 3(38): *Algorytmy postępowania w chorobach wewnętrznych* - wykłady z VI Kongresu Akademii po Dyplomie – Interna. 2011; s.34-40.).

#### **6) Prospektywne prace populacyjne poświęcone chorobom cywilizacyjnym: zespołowi metabolicznemu i cukrzycy, oraz niewydolności serca.**

Aktywne poszukiwanie chorych z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej stanowi najlepszą metodę zapobiegania późnym powikłaniom cukrzycy. Celem jednej z prospektywnych prac, w której brałam udział, było badanie populacyjne mieszkańców Wrocławia zaprojektowane pod kątem określenia czynników ryzyka i częstości występowania cukrzycy typu 2 – zarówno zdiagnozowanej, jak i wcześniej nie wykrytej w reprezentatywnej grupie mieszkańców Wrocławia. Celem była ocena rzeczywistego rozprzestrzenienia

zjawiska w Polsce (Adamiec R., Zdrojowy K., Sutkowska E., Skórkowska-Telichowska K., Rabczyński M., Zdrojowy M., Wojciechowski. A. *WET-Diab - badanie populacyjne mieszkańców Wrocławia w kontekście chorobowości z powodu cukrzycy - doniesienie wstępne*. Diabetol. Prakt. 2004;5(4):189-194.); **MNiSW/KBN: 3 pkt.**

Praca dotycząca niewydolności krążenia była próbą opracowania charakterystyki populacji chorych z niewydolnością serca, hospitalizowanych w dużym wrocławskim specjalistycznym ośrodku kardiologicznym, analizowano w niej rutynowe sposoby leczenia pacjentów (Szachniewicz J., Skórkowska K., Petruk- Kowalczyk J., Jankowska E., Ponikowska B., Zymliński R., Witkowski T., Sebzda T., Reczuch K., Borodulin-Nadzieja L., Hańczycowa H., Banasiak W., Ponikowski P. *Niewydolność serca w populacji chorych leczonych w specjalistycznym ośrodku kardiologicznym*. Adv. Clin. Exp. Med. 2004;13(2):235-243.); **MNiSW/KBN: 5 pkt.**

**7) Cykl publikacji poświęcony badaniu mechanizmów apoptozy zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, z udziałem pacjentów z miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową.**

Badania nad procesem apoptozy (programowanej śmierci komórki) jako metody eliminacji uszkodzonych limfocytów, pozwoliły mi na zaznajomienie się z preparatyką laboratoryjną jako narzędziem pracy badawczej oraz projektowaniem prac wykonywanych *in vitro*. Kontynuacja badań nad procesem apoptozy ludzkich limfocytów krwi obwodowej zaowocowała powstaniem kolejnych prac, dotyczących dzieci urodzonych z niską masą urodzeniową. Wykazano, że dzieci po porodzie ważące poniżej 2500 g wolniej się rozwijają oraz wykazują większe tendencje do zachorowań i do śmierci, co może wiązać się z eliminacją limfocytów w procesie apoptozy. Badania nad poziomem apoptozy i nekrozy w koloniach limfocytów krwi obwodowej pozyskanych od dzieci z niską i prawidłową masą urodzeniową wykazały, że złe odżywienie dzieci w okresie ciąży, skutkujące niedowagą przy urodzeniu wiąże się z nasiloną eliminacją badanych komórek, zarówno w procesie apoptozy jak i nekrozy, w stosunku do dzieci z prawidłową masą ciała przy urodzeniu. Nasilona eliminacja limfocytów skutkuje większą podatnością na infekcje, głównie górnych dróg oddechowych.

W badaniach dotyczących apoptozy, przeprowadzanych z udziałem dorosłych pacjentów z miażdżycą zarostową wykazaliśmy większą skłonność do programowanej śmierci komórek pozyskanych od osób chorych z objawową miażdżycą zarostową (z chromaniem przestankowym) porównując z grupą kontrolną, co wpisuje się w koncepcję miażdżycy jako uogólnionej choroby zapalnej.



- (Gąsiorowski K., Brokos B., Kulma A., Ogorzałek A., Skórkowska K. *Impact of four antimutagens on apoptosis in genotoxically damaged lymphocytes in vitro*. Cell. Mol. Biol. Lett. 2001;6 (3):649-675; **IF: 0.857. MNiSW/KBN: 8 pkt.**
- Gąsiorowski K., Brokos B., Kulma A., Ogorzałek A., Skórkowska K. *A comparison of the methods applied to detect apoptosis in genotoxically- damaged lymphocytes cultured in the presence of four antimutagens*. Cell. Mol. Biol. Lett. 2001;6(2):141-159; **IF: 0.857. MNiSW/KBN: 8 pkt.**
- Barg E., Gąsiorowski K., Brokos B., Świądrych A., Skórkowska K. *A high frequency of apoptosis was found in cultures of lymphocytes isolated from the venous blood of children born with a low birth weight* Cell. Mol. Biol. Lett. 2004;9(1):135-143; **IF: 0.495. MNiSW/KBN: 8 pkt.**
- Skórkowska-Telichowska K., Adamiec R., Tuchendler D., Gąsiorowski K. *Susceptibility to apoptosis of lymphocytes from patients with peripheral arterial disease* Clin. Invest. Med. 2009;32(5):345-351; **IF: 1.149. MNiSW/KBN: 20 pkt.**

#### **8) Publikacje poświęcone receptorom PAR (protease- activated receptors) oraz ich ekspresji u pacjentów z miażdżycą zarostową.**

Receptory PAR są „starymi” filogenetycznie białkami, szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym i zwierzęcym. Występują również u człowieka. Przegląd piśmiennictwa dokonanego przeze mnie zaowocował powstaniem dwóch prac poglądowych, przedstawiających aktualną wiedzę na temat roli receptorów PAR.

Przesłanki teoretyczne skutkowały podjęciem przeze mnie badań na temat ekspresji PAR u pacjentów z miażdżycą zarostową i makroangiopatią cukrzycową w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami – które zostały opisane w mojej rozprawie doktorskiej.

- Skórkowska K., Adamiec R. *Współczesne spojrzenie na biologiczną rolę receptorów PAR*. Pol. Arch. Med. Wewn. 2003;110,6(12):1485-1490; **MNiSW/KBN: 5 pkt.**
- Skórkowska K., Adamiec R. *The biological role of protease-activated receptors in angiology*. Int. Angiol. 2005;24(3):215-220; **IF: 0.808. MNiSW/KBN: 8 pkt.**

Podsumowując, mój łączny dorobek naukowy obejmuje **31 publikacji pełnotekstowych** o łącznym wskaźniku oddziaływania **IF 32,255, MNiSW/KBN 423,0 pkt.** W tym, w skład jednotematycznego cyklu publikacji wchodzi **6 prac oryginalnych** oraz **2 prace poglądowe** w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie *Journal Citation*

*Reports (JCR)* oraz **patent**. **Sumaryczny IF** wynosi **20,099** wynosi (**MNiSW/KBN: 211 pkt**). W 20 publikacjach jestem pierwszym lub drugim autorem.

W oparciu o listę *Journal Citation Reports* liczba cytowań moich publikacji według bazy *Web of Science* wynosi 93. Indeks Hirscha według bazy *Web of Science* wynosi 5.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. S.' with a horizontal line extending from the end.

Wrocław, 02.11.2015