

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Tomasz Szponder

Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin 2018

1. Imię i Nazwisko.

Tomasz Szponder

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania.

- tytuł: specjalista krajowy z Chirurgii Weterynaryjnej, Komisja ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy, 2004.

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, specjalność – Chirurgia weterynaryjna, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 18.01.2001; tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie metody Ilizarowa w ortopedii małych zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem materiałów węglowych jako elementów stabilizatora”.

Promotor: prof. dr hab. Edward Komar,

recenzenci: prof. dr hab. Wojciech Brzeski,

prof. dr hab. Andrzej Gregosiewicz

- tytuł: lekarz weterynarii (dyplom lekarza weterynarii nr 22 828 z dnia 08.06. 1993 roku wydany przez Akademię Rolniczą w Lublinie)

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

Od 01.03. 2001 roku do dnia dzisiejszego: Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza w Lublinie); adiunkt

Od 01.07. 1993 r. Katedra i Klinika Chirurgii Zwierząt Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie; asystent

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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) osiągnięciem naukowym jest jednotematyczny cykl publikacji objęty tytułem:

Wspomaganie procesu zrostu kostnego przy użyciu biomateriałów oraz wybranych autologicznych substancji biologicznie czynnych, ich wpływ na wybrane parametry immunologiczne oraz wykorzystanie w praktyce klinicznej w leczeniu chorób układu mięśniowo-szkieletowego zwierząt.

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Szponder T.**, Wessely-Szponder J., Sobczyńska-Rak A., Żylińska B., Radzki R.P., and Polkowska I. 2018. Application of Platelet- rich Plasma and Tricalcium Phosphate in the Treatment of Comminuted fractures in Animals. In Vivo, Vol 32 No 6 s 1449-1455, IF (2018): 1,116, punkty MNiSW (2018): 15.

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu badań eksperymentalnych oraz klinicznych, opracowaniu wyników oraz ich interpretacji a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny).
Mój udział szacuje na 80 %.*

2. **Szponder T.**, Mytnik E., Jaegermann Z. 2013. Use of Calcium Sulfate as a biomaterial in the treatment of bone fractures in rabbits – preliminary studies. Bull Vet Inst Pulawy, 57, 119-122. IF (2013): 0,365, punkty MNiSW (2013): 20.

*Mój udział w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu badań eksperymentalnych, opracowaniu wyników oraz ich interpretacji a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny).
Mój udział szacuję na 80%.*

3. Wessely-Szponder J., **Szponder T.** 2010. Comparison of the effects of two anaesthetic combinations in rabbits on some neutrophil functions in vitro. World Rabbit Science 18:169-177. IF (2010): 0,66, punkty MNiSW (2010): 20.

Mój udział w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części eksperymentalnej oraz pobraniu materiału, opracowaniu wyników i ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział szacuje na 70%.

4. **Szponder T.** Wessely-Szponder J., Smolira, A. 2017. Evaluation of platelet-rich plasma and neutrophil antimicrobial extract as two autologous blood-derived agents. Tissue Eng. Regen. Med., Vol. 14 No3, 287-296. IF (2017): 1,216, punkty MNiSW (2017): 15.

Mój udział w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, pobraniu materiału i wykonaniu części oznaczeń, interpretacji wyników i napisaniu manuskryptu.

Mój udział szacuje na 80%.

5. **Szponder T.,** Wessely-Szponder J. Sobczyńska-Rak A. 2018. The Neutrophil Response to Rabbit Antimicrobial Extract After Implantation of Biomaterial into a Bone/Cartilage Defect. In Vivo, Vol 32 No 6 s 1345-1351. IF (2018): 1,116, punkty MNiSW (2018): 15.

Mój udział w powstania pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części klinicznej, pobraniu materiału, wykonaniu części oznaczeń, opracowaniu wyników oraz napisaniu manuskryptu .

Mój udział szacuje na 90 %.

6. **Szponder T.,** Wessely-Szponder J. , Świeca M., Smolira A., Gruszecki T. 2017. The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. Small Rumin Res vol 156, s 50-56. IF (2017): 0,974, punkty MNiSW (2017): 30.

Mój udział w powstania pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu części klinicznej, pobraniu materiału, wykonaniu części oznaczeń, opracowaniu wyników oraz napisaniu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuje na 80%.

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **115 pkt.**

- łączny *impact factor* według listy JCR: **5,447**

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

Leczenie złamań i zaburzeń zrostu kostnego jest jednym z priorytetowych zadań medycyny z uwagi na liczbę przypadków, konsekwencje ekonomiczne i społeczne wynikające ze skali problemu. W krajach europejskich rocznie dochodzi do 300-400 przypadków złamań kości długich na 100 000 mieszkańców (46). Problem narasta wraz ze starzejącym społeczeństwem (25).

W praktyce klinicznej i w literaturze naukowej coraz częściej pojawia się określenie wspomaganie (enhancement) procesu zrostu kostnego. Terminem tym określa się możliwości aktywnego oddziaływania na przebieg leczenia złamania zarówno podczas zabiegu operacyjnego, jak i w przebiegu całego procesu gojenia kości (56, 64). Najpowszechniej stosowaną i najlepiej poznaną metodą inwazyjnego wspomagania zrostu jest wykonanie autologicznego przeszczepu kości. W weterynarii opisano przypadki powikłań po przeszczepie istoty gąbczastej kości, takie jak złamania kości w miejscu pobrania przeszczepu, przedwczesne zamknięcie chrząstki wzrostowej, krwawienie, utrzymujące się objawy bólowe, zakażenia (15, 64). Inne mniej rozpowszechnione metody wspomagania zrostu kostnego to autologiczny przeszczep szpiku kostnego, stosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych (Mesenchymal Stem Cells - MSC), demineralizowanej macierzy kostnej (Demineralized Bone Matrix -DBM) czy bezpośrednie stosowanie czynników wzrostu w postaci białek morfogenetycznych kości (Bone morphogenetic protein -BMP) (12, 56).

Proces zrostu kostnego jest procesem złożonym, uzależnionym od wielu czynników, stąd też idea terapii złożonej (POLY THERAPY), czyli uwzględnienia wybranych czynników koniecznych do uzyskania zrostu: komórek osteogennych, matrycy oraz czynników wzrostu

przy zapewnieniu odpowiednich warunków biomechanicznych w miejscu złamania (6, 12, 21). Uwzględniając dostępność, a co za tym idzie, możliwość wprowadzenia danej metody leczenia do powszechnej praktyki klinicznej rozpocząłem badania nad wykorzystaniem żelu bogatopłytkowego PRP i trójfosforanu wapnia w leczeniu złamań i zaburzeń zrostu kostnego u małych zwierząt, szczególnie w odniesieniu do złamań wieloodłamowych, w przypadkach których istnieje duże ryzyko powikłań. Dotychczasowe badania nie określiły jednoznacznie korzystnego działania jednoczesnego podawania biomateriału jako substancji osteiokondukcyjnej oraz PRP jako źródła czynników wzrostu, co w dużej mierze wynika z dowolności zarówno eksperymentalnych metod implantacji jak i braku jasno standardów co do otrzymywania i oceny żelu bogatopłytkowego.

Osocze bogatopłytkowe (Platelet rich plasma – PRP) jest definiowane jako koncentrat płytek krwi w niewielkiej objętości osocza, które po aktywacji mieszaniną trombiny i wapnia tworzy żel bogatopłytkowy (2, 9, 32, 49). Jego efekt wspomagający zrost kostny opiera się na działaniu czynników wzrostu zawartych w ziarnistościach α płytek krwi, takich jak płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF β 1, TGF β 2), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1, IGF-2), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) oraz naskórkowy czynnik wzrostu komórek (EGF). Wszystkie te cytokiny pełnią ważną rolę w proliferacji komórek, chemotaksji, różnicowaniu komórek oraz angiogenezie. Płytki krwi zawierają również w swoich ziarnistościach szereg innych substancji biologicznie czynnych takich jak serotonina, histamina, dopamina, adenozyzna oraz białka antybakteryjne (PMP – Platelet Microbicial Peptides). W połączeniu ze zwiększoną liczbą leukocytów syntetyzujących interleukiny daje to właściwości antybakteryjne osocza bogatopłytkowego, szczególnie pożądane w przypadku leczenia pozapalnych powikłań zrostu i zakażeń tkanek miękkich (2, 32, 64, 66).

Beta-trójfosforan wapnia (β -TCP) należy do biomateriałów ceramicznych, bioaktywnych, ulegających biodegradacji i tworzy rusztowanie dla nowopowstałej tkanki kostnej. Jest to materiał biozgodny, osteokondukcyjny, o odpowiedniej porowatości odpowiadającej strukturze beleczkowej kości, ułatwiającej powstawanie kostniny i rewaskularyzację po implantacji (5,38). W medycynie weterynaryjnej tego typu biomateriały nie weszły do powszechnej praktyki klinicznej. Jest to spowodowane brakiem odpowiednich

opracowań stanowiących podstawę do ich stosowania, jak również uboższego piśmiennictwa dotyczącego przypadków klinicznych leczonych przy zastosowaniu preparatów zawierających biomateriały ceramiczne (15, 27). Większość opracowań naukowych dotyczących badań na zwierzętach to prace doświadczalne wykonywane na modelach zwierzęcych pod kątem wykorzystania ich wyników w medycynie (5).

W badaniach tych obowiązują od lat określone standardy oceny wgajania biomateriałów oraz ich wpływu na procesy regeneracyjne tkanek. Nie uwzględniają one jednak reakcji immunologicznej organizmu na znieczulanie pacjenta, co ma duże znaczenie wobec różnorodności sposobów znieczulania zwierząt laboratoryjnych. Przy ocenie reakcji immunologicznej na biomateriał zwykle pomija się wczesny okres implantacji, (pierwsze 24-72 godziny) podczas gdy wczesna reakcja immunologiczna na biomateriał, zwykle w warunkach klinicznych, odpowiada fazie zapalenia w procesie zrostu kostnego i może w znaczący sposób wpływać na cały przebieg zrostu kostnego (35, 58, 60).

Okres zapalny musi być we właściwy sposób zakończony, aby prekursorowe komórki mezenchymalne i śródbłonkowe mogły brać udział w następnej fazie powstawania kostniny pierwotnej. Dlatego równowaga pomiędzy procesami pro- i przeciwzapalnymi ma szczególne znaczenie, z uwagi na to, że przedłużająca się bądź nadmierna reakcja zapalna zaburza proces gojenia kości (40). Neutrofile, jako pierwsza linia obrony komórkowej pojawiają najszybciej w miejscu urazu (38, 60). Komórki te fagocytują drobnoustroje i pozostałości komórkowe, tworzą zewnątrzkomórkową sieć neutrofilii (NET), uwalniają cytokiny, reaktywne formy tlenu, enzymy proteolityczne oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe. W warunkach nadmiernej reakcji zapalnej neutrofile uwalniają nadmierne ilości cytokin, enzymów i wolnych rodników, prowadząc do masywnego uszkodzenia tkanek i nieprawidłowego gojenia co opóźnia proces zrostu kostnego (35). Na tym etapie gojenia funkcja neutrofilii nie została dotychczas szczegółowo wyjaśniona. Dlatego zainteresowałem się neutrofilowymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi, jako obiecującym czynnikiem dla regulowania odpowiedzi zapalnej w kontekście wspomagania procesu gojenia kości.

Celem badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia było:

- opracowanie własnego modelu badawczego odpowiadającego gojeniu złamaniu wieloodłamowego,
- określenie przydatności zastosowania β -trójfosfranu wapnia i żelu bogatopłytkowego w leczeniu złamań wieloodłamowych u królików,
- wprowadzenie tej metody wspomaganie zrostu kostnego do praktyki klinicznej małych zwierząt,
- ocena *in vivo* na powyższym modelu nowo opracowanej postaci siarczanu wapnia (siarczan wapnia typu Hartform HF1) jako biomateriału do uzupełniania ubytków kostnych i leczenia złamań,
- określenie wpływu dwóch wybranych i stosowanych w badaniach *in vivo* u królików modeli znieczulenia infuzyjnego na aktywność wydzielniczą neutrofilii stanowiącą parametr oceny wczesnej odpowiedzi zapalnej na środki anestezjologiczne w przebiegu implantacji biomateriału,
- ocena jakościowa dwóch autologicznych preparatów krwiopochodnych: żelu bogatopłytkowego PRP i ekstraktu neutrofilowego jako potencjalnie użytecznych w praktyce klinicznej oraz ocena *in vitro* wpływu ekstraktu neutrofilowego na aktywność neutrofilii i makrofagów,
- ocena działania ekstraktu neutrofilowego na aktywności neutrofilii w przebiegu implantacji alginanu do ubytku kostnego oraz włókien węglowych do chrząstki stawowej
- ocena zastosowania nowatorskiego modelu wspomaganie procesu gojenia z użyciem żelu bogatopłytkowego i ozonu w aspekcie leczenia zakaźnej zanokcicy owiec.

*Badania eksperymentalne i kliniczne nad zastosowaniem TCP jako biomateriału i PRP-
opracowanie modelu doświadczalnego do dalszych badań*

Do badań eksperymentalnych w celu oceny użycia żelu bogatopłytkowego PRR i β -trójfosforanu wapnia w leczeniu złamań wieloodłamowych wykorzystałem króliki rasy Nowozelandzkiej Białej, co umożliwiło pozyskanie od każdego osobnika w pełni autogennego PRP. Jako biomateriał o sprawdzonych właściwościach osteokondukcyjnych użyłem granulek TCP o wielkości por od 5 do 500 μm . Stworzyłem model doświadczalny implantacji biomateriału bezpośrednio do przełomu złamania kości piszczelowej u królików, z jednoczesnym wytworzeniu ubytku kostnego w jednym z odłamów. Po osteotomii wykonałem stabilizację złamania wykorzystując 2 sposoby stabilizacji: gwoździowanie doszpikowe oraz akrylowy stabilizator zewnętrzny. Do ubytku kostnego i szczeliny złamania implantowałem β -trójfosforan wapnia (TCP) zmieszany z aktywowanym żelem bogatopłytkowym PRP. Proces wgapiania biomateriału przebiegał jednocześnie z procesem zrostu kostnego, w warunkach dokładnie odzwierciedlających proces gojenia złamania wieloodłamowego (obecność implantów metalowych, reakcja tkanek miękkich w okolicy złamania), kiedy zachodzi konieczność uzupełniania ubytków kostnych. U wszystkich zwierząt z grup badawczych po 12 tygodniach uzyskałem prawidłowy zrost kostny, potwierdzony badaniem klinicznym i radiologicznym. W badaniach histologicznych uzyskano obraz prawidłowej blizny kostnej z widocznymi pozostałościami TCP, co potwierdziło właściwy dobór biomateriału do uzupełniania ubytków kości u małych zwierząt. Analizując wyniki badań przy użyciu mikroskopu skaningowego stwierdzono ścisłą integrację kostniny z TCP, co wskazuje na pozytywny wpływ procesu resorpcji biomateriału na jakość uzyskanej blizny kostnej. Z kolei badania przy użyciu obwodowego ilościowego tomografu komputerowego wykazały zwiększenie gęstości blizny kostnej w grupach kontrolnych. Pomiar pierwotnych markerów gojenia kości nie wykazał statystycznych różnic pomiędzy grupą kontrolną i grupami badawczymi, co może świadczyć o tym że w wykorzystanym modelu badawczym zabieg osteotomii był wykonany w sposób atraumatyczny dla otaczających tkanek miękkich.

Podsumowując część eksperymentalną można stwierdzić że stosowanie żelu bogatopłytkowego PRP i β -Trójfosforanu wapnia wpływa korzystnie na proces gojenia złamań wieloodłamowych i może być wykorzystane w praktyce klinicznej.

W oparciu o powyższe wyniki wprowadziłem jako metodę wspomaganie zrostu kostnego użycie żelu bogatopłytkowego PRP i β -Trójfosforanu wapnia TCP u małych zwierząt w Klinice Chirurgii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Ogółem tym sposobem w latach 2007-2017 leczono 37 zwierząt (29 psów i 8 kotów). Zwierzęta były kwalifikowane do leczenia w oparciu o następujące kryteria: typ złamania (wieloodłamowe z ubytkiem kości), wiek, masa ciała, stopień uszkodzenia tkanek miękkich, urazy współtowarzyszące oraz inne czynniki utrudniające lub wykluczające wykorzystanie autologicznego przeszczepu kości. Jako biomateriału używałem β -Trójfosforanu wapnia (Cerasorb), osocze bogatopłytkowe (PRP) uzyskiwałem na drodze dwukrotnego wirowania krwi przy użyciu zestawu PRP kit (Curasan). W trakcie zabiegu aktywowany żel (trombina Biomed) zmieszany z granulkami Cerasorbu był implantowany do ubytku i szczeliny złamania. Przebieg leczenia monitorowałem klinicznie i radiologicznie. Ogółem w 33 przypadkach (91%) uzyskałem zrost kostny, jedynie u czterech pacjentów wynik leczenia był negatywny (brak zrostu). Nie stwierdzono podczas całego procesu leczenia żadnych komplikacji z powodu implantacji TCP i PRP, pomimo że większość złamań była rezultatem urazów wysokoenergetycznych, towarzyszył im rozległy uraz tkanek miękkich. Przeciwnie, gojenie tkanek miękkich w okolicy złamania przebiegało we wszystkich przypadkach prawidłowo, co wskazuje na korzystne działanie czynników zrostu zawartych w PRP na proces gojenia tkanek miękkich w miejscu złamania.

Porównując uzyskane wyniki leczenia, można stwierdzić że skuteczność kliniczna metody leczenia jaką jest implantacja TCP i PRP u małych zwierząt jest porównywalna z innymi sposobami wspomaganie zrostu jak użycie demineralizowanej macierzy kostnej (DBM) czy białek morfogenetycznych kości BMP (30, 59). Metoda jest bezpieczna, nie limitowana ograniczeniami, co czyni ją przydatną klinicznie alternatywą w przypadku leczenia złamań wieloodłamowych.

Należy podkreślić również, że o ile dostępna literatura naukowa zawiera szereg pozycji opisujących badania eksperymentalne poświęcone licznym metodom wspomaganie

zrostu (37, 55, 56), o tyle prace naukowe zawierające opis i rezultaty kliniczne zastosowania danej metody stanowią zdecydowana mniejszość i obejmują opisy pojedynczych przypadków lub nieliczne grupy pacjentów (15, 27). Stąd też opis moich badań stanowi cenne uzupełnienie tej części piśmiennictwa weterynaryjnego.

Wyniki powyższych badań opublikowano w artykule: **Szponder T.**, Wessely-Szponder J., Sobczyńska-Rak A., Żylińska B., Radzki R.P. and Polkowska I. 2018. Application of Platelet-rich Plasma and Tricalcium Phosphate in the Treatment of Comminuted fractures in Animals. In Vivo, Vol 32 No 6 s 1449-1455.

Badania in vivo siarczanu wapnia na stworzonym modelu doświadczalnym

Dalszy etap mojej pracy badawczej obejmował badania nad wykorzystaniem nowych biomateriałów w leczeniu złamań i uzupełnianiu ubytków kości. Opierając się na dotychczas uzyskanych wynikach i obserwacjach klinicznych (5, 38, 62) rozpocząłem badania *in vivo* siarczanu wapnia typu Hartform HF1 jako głównego składnika nowego biomateriału kompozytowego. Główne zalety tej postaci siarczanu wapnia to lepsze parametry mechaniczne, zmieniona porowatość oraz wydłużony czasu resorpcji.

Badania *in vivo* wykonałem na opisanym powyżej i sprawdzonym modelu złamania wieloodłamowego u królików. Standardowe badanie *in vivo* polegające na implantacji biomateriału do ubytku kości, nie odzwierciedla w pełni warunków powstałych wskutek złamania kości i towarzyszącemu urazowi okolicznych tkanek. Jest to szczególnie istotne w przypadku biomateriałów zawierających siarczan wapnia, w przypadku których wielokrotnie w warunkach klinicznych dochodziło do poważnych powikłań po implantacji (42,53). Badany materiał implantowałem do szczeliny złamania i ubytku kostnego. Z uwagi na możliwe komplikacje w miejscu implantacji konieczna była codzienna kontrola kliniczna oraz okresowa kontrola radiologiczna. Proces resorpcji biomateriału przebiegał w warunkach maksymalnie zbliżonych do klinicznych. W grupie złamań stabilizowanych gwoździami śródszpikowymi w warunkach upośledzonego krążenia w jamie szpikowej spowodowanego obecnością implantów metalowych oraz w warunkach biomechanicznych odpowiednich do stabilizacji zewnętrznej w grupie złamań z ESF. Po 12 tygodniach u wszystkich zwierząt z grup badawczych stwierdzono zrost kostny potwierdzony badaniem radiologicznym. W

badaniu sekcyjnym nie stwierdzono widocznych zmian patologicznych w otaczających miejsce implantacji tkankach miękkich i regionalnych węzłach chłonnych. Badanie histologiczne wykazało pełną biokompatybilność biomateriału. W obrębie blizny kostnej widoczne były wrzecionowate pozostałości badanego siarczanu wapnia bez cech reakcji tkanek na ciało obce. Podsumowując wyniki badań klinicznych, radiologicznych oraz histologicznych można stwierdzić, że po upływie 12 tygodni badany materiał uległ resorpcji do kostniny, oraz zarówno podczas implantacji jak gojenia złamania nie doszło do komplikacji. Opracowany przeze mnie model badania biomateriałów pozwolił na ocenę biomateriału *in vivo* w warunkach maksymalnie zbliżonych do warunków klinicznych, przez co otrzymane wyniki są wiarygodne, a siarczan wapnia typu Hartform HF jest materiałem biozgodnym i stanowi dobrą matrycę do opracowania kompozytowych biomateriałów zawierających takie substancje jak antybiotyki czy czynniki wzrostu(5, 62).

Wyniki pracy opublikowano w: **Szponder T.**, Mytnik E., Jaegermann Z. 2013. Use of Calcium Sulfate as a biomaterial in the treatment of bone fractures in rabbits – preliminary studies. Bull Vet Inst Pulawy, 57, 119-122.

Badania nad przydatnością dwóch systemów znieczuleń do zastosowania przy implantacji biomateriału

Proces odpowiedzi immunologicznej na implantację biomateriału do tkanki kostnej jest procesem bardzo złożonym (8). W badaniach *in vivo* jest on oceniany najczęściej jako tzw. odczyn późny, na etapie przewlekłej fazy zapalenia. Tymczasem w warunkach klinicznych podczas zabiegu operacyjnego reakcji immunologicznej na implant towarzyszy odpowiedź zapalna spowodowana wieloma czynnikami jak uraz mechaniczny tkanek oraz działanie środków anestetycznych (22,23,28, 29, 31, 44). Stąd też ważne jest, aby stosować takie schematy znieczulenia, które nie zaburzają reakcji immunologicznej i w przypadku uzupełniania ubytku kostnego nie upośledzają procesu regeneracji tkanki kostnej (11, 17, 18, 19, 63). Obiektem mojego zainteresowania stały się neutrofile. Pomimo iż są one wiodącymi komórkami wczesnej reakcji zapalnej i stanowią istotny element odpowiedzi organizmu po urazie lub zabiegu operacyjnym, wiedza na temat ich odpowiedzi na

stosowane w ortopedii weterynaryjnej środki znieczulające nie jest pełna. Aby ustalić w jaki sposób dwa zastosowane schematy znieczuleń infuzyjnych u królików, to jest: ketamina/midazolam/propofol i ketamina/propofol, obejmujące najczęściej stosowane obecne preparaty znieczulające u zwierząt eksperymentalnych wpływają na funkcje neutrofilów w okresie do 24 godzin od zabiegu operacyjnego, zbadano aktywność neutrofilów *in vitro* pod względem uwalniania elastazy, MPO, ALP oraz wytwarzania tlenku azotu i anionorodnika ponadtlennego po 30 minutach od początku znieczulenia i po 24 godzinach. Zaobserwowałem, że uwalnianie elastazy w obu badanych systemach znieczuleń obniżyło się z 50.96 ± 0.71 % maksymalnego uwalniania do 26.52 ± 4.85 % w grupie ketamina/midazolam/propofol i z 51.00 ± 0.7 do 41.00 ± 5.48 % w grupie ketamina/propofol. Również uwalnianie mieloperoksydazy obniżało się istotnie ($p < 0.05$) po 30 minutach w obu badanych grupach, a następnie wzrastało po 60 minutach do poziomu zbliżonego do tego przed rozpoczęciem znieczulenia. Podobny efekt zaobserwowałem badając uwalnianie ALP. W grupie królików znieczulanych według schematu ketamina/midazolam/propofol poziom ALP obniżał się z 24.77 ± 5.9 do 15.7 ± 2.1 %, a w grupie ketamina/propofol z 23.6 ± 1.14 do 10.6 ± 0.89 %, po czym wzrastał po upływie 60 minut od rozpoczęcia znieczulenia. W zakresie uwalniania wolnych rodników zaobserwowałem istotnie statystycznie ($p < 0.01$) obniżenie wytwarzania tlenku azotu (NO) po 30 minutach znieczulenia według schematu ketamina/midazolam/propofol, w następnych pomiarach stężenie NO po 60 minutach wzrastało i po 24 godzinach i utrzymywał się na wyższym zbliżonym do wyjściowego poziomie. Również wytwarzanie anionorodnika ponadtlennego obniżało się pod wpływem zastosowanych preparatów po 30 minutach, wzrastało po 60 minutach, aby następnie wrócić do poziomu 2.52 ± 0.53 i 3.18 ± 0.35 nM/ 10^6 komórek. Jak wynika z powyższego eksperymentu oba zastosowane typy znieczuleń powodowały obniżenie odpowiedzi ze strony neutrofilów po 30 minutach od początku znieczulenia, efekt ten ustępował po 24 godzinach od zabiegu operacyjnego. Oba typy znieczuleń przejściowo obniżyły aktywność neutrofilów zapobiegając możliwemu uszkodzeniu tkanek, podczas aktywacji neutrofilów, ale nie zaburzając odpowiedzi immunologicznej w szerszym przedziale czasowym, gdyż efekty zastosowanego znieczulenia ustępowały po 24 godzinach. Ten typ znieczulenia może być rekomendowany do stosowania w zabiegach implantacji biomateriałów, gdyż jak wykazały przeprowadzone przeze mnie

badania ogranicza wczesną odpowiedź zapalną. Jest to działanie krótkotrwałe, nie zaburza reakcji immunologicznych we wczesnej fazie zapalnej.

Wyniki opublikowano w: Wessely-Szponder J. **Szponder T.** 2010. Comparison of the effects of two anaesthetic combinations in rabbits on some neutrophil functions in vitro. World Rabbit Science 18:169-177.

Ocena dwóch środków: PRP i ekstraktu neutrofilowego, jako potencjalnych substancji do wspomaganie zrostu kostnego

W kolejnym doświadczeniu opracowałem standaryzację metody otrzymywania żelu bogatopłytkowego (PRP) od królików, a także badałem ekstrakt neutrofilowy, autologiczny nowatorski preparat, z przeznaczeniem do wykorzystania jako autogeny krwiopochodny czynnik o potencjale wspomaganie procesów gojenia, szczególnie w odniesieniu do zrostu kostnego (1, 16, 33, 49, 67). Ponadto projekt obejmował ocenę aktywności neutrofilów i makrofagów po stymulacji ekstraktem neutrofilowym.

Ekstrakt neutrofilowy, jako produkt krwiopochodny zawiera peptydy antybakteryjne; katelicyny i defensyny. Czynniki te oprócz powszechnie znanej aktywności przeciwko szerokiemu spektrum bakterii G dodatnich i ujemnych wykazują też działanie immunomodulujące. Przez oddziaływanie na neutrofile, makrofagi i inne komórki zapalne sterują one rozwijającą się reakcją zapalną (50, 65). Postanowiłem sprawdzić, jak będą one wpływać na fazę zapalną procesu gojenia złamania (20, 36, 43, 47, 48). Badania rozpocząłem od eksperymentu in vitro, w którym zbadano odpowiedź neutrofilów i makrofagów na stymulację ekstraktem neutrofilowym (10, 14, 51, 52).

W badaniach nad jakościową oceną preparatów ekstraktu neutrofilowego i żelu bogatopłytkowego postanowiłem wykorzystać metodę spektrometrii mas (MALDI TOF).

W początkowej fazie badań z krwi królików doświadczalnych (NZW) wyizolowano króliczy ekstrakt neutrofilowy i oceniono zawartości w nim peptydów antybakteryjnych. W ziarnistościach neutrofilowych królików występują następujące rodzaje peptydów antybakteryjnych: białko antybakteryjne 15-kDa i katelicyna 18 kDa; oprócz tego neutrofile zawierają defensyny NP-1,2, 3a, 3b, 4 i 5. Wszystkie wymienione peptydy

uwidoczniono w uzyskanych próbkach biologicznych metodą MALDI TOF. Z kolei ocena przygotowanego żelu bogatopłytkowego wykazała obecność w nim czynników wzrostowych PDGF, IGF i VEGF. Po analizie uzyskanych preparatów oceniono ich działanie na dwie szczególnie istotne dla procesów gojenia składowe układu białokrwinkowego tj. neutrofile i makrofagi.

W kolejnym etapie badań stymulacja hodowli makrofagów króliczych ekstraktem neutrofilowym ujawniła, że ma on istotne statystycznie ($p < 0.05$) działanie hamujące na wytwarzanie anionu nadtlenkowego, uwidaczniające się po 5 dniach hodowli tych komórek w warunkach 37°C , 5% CO_2 . Zmiany w morfologii makrofagów, oceniane na podstawie obrazu w mikroskopie kontrastowo-fazowym Olympus wskazują na ich częściowo prozapalny fenotyp o cechach charakterystycznych dla stymulacji katelicydynami. W neutrofilach z kolei zastosowanie ekstraktu ogranicza wybuch tlenowy i degranulację ocenianą na podstawie uwalniania enzymów: elastazy, mieloperoksydazy i zasadowej fosfatazy. Przeprowadzone badania wykazały, że w obu badanych subpopulacjach układu białokrwinkowego zmniejsza się aktywność zapobiegając nadmiernej reakcji zapalnej. Uwzględniając zawartość autologicznych peptydów antybakteryjnych w ekstrakcie neutrofilowym można stwierdzić, że w warunkach klinicznych może on korzystnie wpływać na proces gojenia kości, szczególnie w środowisku narażonym na zakażenie – jak ma to miejsce w przypadku leczenia złamań otwartych.

Podsumowując wykonane badania wykazano, że stymulacja ekstraktem neutrofilowym obniżała aktywność makrofagów *in vitro*, ograniczała też aktywność neutrofilii zmniejszając degranulację i wytwarzanie wolnych rodników. Zastosowanie powyższego preparatu może być pomocne w zmniejszeniu wczesnej odpowiedzi zapalnej, ograniczając reakcje organizmu na implantacje i ewentualne odrzucenie biomateriału. Działanie to jest krótkotrwałe, nie zaburza właściwej odpowiedzi obronnej organizmu i nie wpłynie na dalszy prawidłowy proces gojenia. Aktualnie prowadzimy dalsze badania określające bezpośrednie oddziaływania pomiędzy ekstraktem neutrofilowym i PRP w warunkach *in vitro*, dalszym etapem będzie stworzenie modelu zastosowania klinicznego obydwu autologicznych preparatów krwiopochodnych. Wyniki opublikowano w artykule:

Szponder T. Wessely-Szponder J., Smolira, A. 2017. Evaluation of platelet-rich plasma and neutrophil antimicrobial extract as two autologous blood-derived agents. *Tissue Eng. Regen. Med.*, Vol. 14 No3, 287-296.

Ocena ekstraktu neutrofilowego jako czynnika regulującego odpowiedź wydzielniczą neutrofilów w przebiegu implantacji biomateriałów

Kolejnym etapem moich badań nad czynnikami wspomagającymi gojenie była praca nad odpowiedzią neutrofilów na dwa rodzaje implantacji biomateriałów u królików z równoczesnym wspomaganie ekstraktem neutrofilowym. W tym celu przeprowadziłem badania nad wszczepianiem alginianu do ubytku kostnego w kości piszczelowej oraz włókien węglowych do ubytku w chrząstce stawowej w stawie kolanowym na modelu króliczym. Wiadomo, że neutrofile pełnią kluczową rolę we wczesnej odpowiedzi zapalnej, po aktywacji oddziałują one na otaczające tkanki przez degranulację i wytwarzanie w tzw. wybuchu tlenowym reaktywnych form tlenu. Ich nadmierna aktywność może mieć jednak szkodliwe działanie na tkanki, prowadząc w rezultacie do opóźnienia procesu gojenia i powstawania powikłań. Okazało się, że pewne składniki neutrofilowe mogą sprzyjać procesom gojenia (35). Powyższa aktywność zainteresowała mnie w szczególności w świetle pracy Lins et al., (45) którzy stwierdzili znaczący prozapalny efekt alginianu na monocyty i makrofagi. Postanowiłem sprawdzić jak implantacja tego biomateriału wpływa na neutrofile i czy ekstrakt neutrofilowy może ten efekt zmieniać. Aby bardziej precyzyjnie określić działanie ekstraktu zaproponowałem, że należy go rozdzielić go metodą chromatografii żelowej na kolumnie Sephadex G-50 na dwie frakcje. Na podstawie rozdziału chromatograficznego wyodrębniono frakcję F1 o wysokiej masie cząsteczkowej zawierającą katelicydyny i frakcję F2 o małej masie cząsteczkowej zawierającą głównie defensyny królicze (NP-1, NP-2, NP-3a, NP-4 i NP-5).

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że neutrofile królików po implantacji alginianu do ubytku w kości piszczelowej wykazują wzmożoną aktywność, która jednak pod wpływem ekstraktu oraz obu jego frakcji, ulega wygaszeniu. Badając uwalnianie z

ziarnistości neutrofilowych elastazy zaobserwowałem, że interwencja chirurgiczna (sham group) aktywuje neutrofile i powoduje wzrost uwalniania tego enzymu z wyjściowego poziomu $50.73 \pm 2.30\%$, podobny efekt daje implantacja biomateriału alginianowego. Zastosowanie preparatów ekstraktu neutrofilowego wygasza odpowiedź w grupach neutrofilii izolowanych od królików przez zabiegiem i po zabiegu chirurgicznym, ale nie tych po implantacji alginianu. W tych hodowlach odpowiedź neutrofilowa dalej pozostawała na wysokim poziomie. W przypadku mieloperoksydazy i zasadowej fosfatazy oddziaływanie różnych frakcji ekstraktu neutrofilowego hamowało uwalnianie obu tych enzymów, szczególnie po 24 godzinach hodowli w warunkach 37°C i $5\% \text{CO}_2$. Powyższe dane świadczą o tym, że uwalnianie elastazy w pierwszej fazie reakcji zapalnej nie jest znacząco hamowane. Ma to istotne znaczenie ze względu na jej rolę w procesie gojenia. Podobny efekt uzyskałem przy badaniu odpowiedzi neutrofilii izolowanych z krwi królików pobranej przez mnie podczas zabiegu implantacji włókien węglowych do ubytku chrząstki w stawie kolanowym, odpowiedź była jednak słabiej wyrażona. Wiedza uzyskana po przeprowadzeniu powyższych badań pomocna będzie w pracach nad sposobami hamowania reakcji wokół ciała obcego (FBR) na implant, w badaniach nad ewentualnym odrzuceniem przeszczepu (16). Przeprowadzone przez mnie badania stanowią kontynuację i rozszerzenie standardowych badań obejmujących ocenę reakcji in vivo na implantacje biomateriałów do tkanki chrzęstnej i kostnej (57). W odróżnieniu od standardowych metod histologicznych zaproponowana przez mnie metoda pozwala na przeżyciowe, bez konieczności eutanazji zwierzęcia, badanie wczesnej odpowiedzi zapalnej, łącznie ze sposobami modyfikowania tej reakcji.

Całość badania opisano w pracy: **Szponder T.**, Wessely-Szponder J. Sobczyńska-Rak A. 2018. The Neutrophil Response to Rabbit Antimicrobial Extract After Implantation of Biomaterial into a Bone/Cartilage Defect. In Vivo, Vol 32 No 6 s 1345-1351.

Kliniczne zastosowania PRP, jako wspomaganie leczenia chorób układu mięśniowo-szkieletowego

Kontynuacją moich badań dotyczących wykorzystania krwiopochodnych autologicznych preparatów zawierających czynniki wzrostu była ocena żelu bogatopłytkowego pozyskanego od owiec, gatunku uważanego za wzorcowy model średnich ssaków w badaniach

dotyczących chorób układu mięśniowo-szkieletowego (7). Badania prowadzone były dwutorowo: w kierunku oceny składu i właściwości pozyskanego PRP oraz w kierunku możliwych zastosowań terapeutycznych powyższego preparatu w połączeniu z terapią ozonową w leczeniu zakaźnej zanokcicy owiec. Czynniki wzrostowe zawarte w żelu bogatopłytkowym pełnią ważną rolę w procesach gojenia, ze szczególnym uwzględnieniem leczenia chorób narządu ruchu a także w leczeniu tkanek miękkich, szczególnie w odniesieniu do trudno gojących ran. (54, 61,)W aspekcie badawczym analiza jakościowa składników PRP z użyciem MALDI TOF ułatwia standaryzację metody jego otrzymywania.

Badanie uzyskanego żelu metodą spektrometrii mas wykazało obecność następujących czynników wzrostu: IGF, VEGF oraz PDGF w postaci łańcuchów A i B i dimerów AA, AB, BB. Uzupełnieniem badań czynników wzrostu w żelu była ocena stężenia PDGF w we wszystkich dostępnych frakcjach (osoczu, osoczu bogatopłytkowym oraz aktywowanym żelu bogatopłytkowym), gdzie po oznaczeniu metodą ELISA wykazano, że najwyższe, trzykrotnie przewyższające wartości wyjściowe uzyskano w żelu bogatopłytkowym po aktywacji.

Ozon uważany jest za silny czynnik przeciwutleniający i wzmagający stres oksydacyjny, stąd też jednym z elementów badania była ocena statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego z uwzględnieniem siły redukującej (RP), potencjału antyoksydacyjnego oraz stężenia aldehydu dwumalonowego w osoczu, jako wskaźnika peroksydacji lipidów (3,4). Parametry te, po zastosowaniu miejscowym ozonu, posłużyły do wyliczenia równowagi oksydacyjno/antyoksydacyjnej (AOB), jako nowego bardziej kompleksowego wskaźnika (41). Uzyskane wyniki oznaczają wzrost aktywności antyoksydacyjnej z $1.2\pm 0.08 \mu\text{molTe/ml}$ do $1.27\pm 0.08 \mu\text{molTe/ml}$, co wskazuje na aktywację układu antyoksydacyjnego w odpowiedzi na przejściowy stres oksydacyjny bezpośrednio po zastosowaniu ozonu (13).

Praktycznie opracowałem nowy model leczenia zakaźnej zanokcicy owiec, w którym całkowicie zrezygnowałem zarówno z podawania antybiotyków (ogólnie i miejscowo) jak i leczenia miejscowego przy pomocy kąpieeli leczniczych w drażniących lub toksycznych środkach bakteriobójczych. Jako czynnik bakteriobójczy w zaawansowanych postaciach choroby (3-4 stopień zmian w skali wg Raadsama i Egertona) wykorzystałem ozon podawany miejscowo w formie miejscowej kąpieeli ozonowej tj w roztworze 0,9% NaCl poddanym

uprzednio ozonowaniu do stężenia 70mg/ml. Po ustąpieniu ostrych objawów w grupie zwierząt, u których zmiany chorobowe po terapii ozonowej utrzymywały się w postaci trudno gojących ran w szparze międzyrącznej podawałem miejscowo żel bogatopłytkowy. Po 14 dniach od podania żelu doszło do wygojenia ran. Opracowany przeze mnie sposób leczenia pozwolił na całkowitą eliminację stosowania antybiotyków, co oznacza, że można go wykorzystywać w małych ekologicznych gospodarstwach wytwarzających produkty nie zawierające żadnych pozostałości antybiotyków. Dodatkowe oznaczenia statusu oksydacyjno-redukcyjnego wykazały że proponowany sposób leczenia nie stwarza zagrożenia zarówno dla ludzi i zwierząt podczas terapii. Prowadzimy obecnie dalsze badania nad wykorzystaniem autologicznych produktów krwiopochodnych w praktyce klinicznej dużych zwierząt. Wyniki pracy opublikowano w artykule: **Szponder T.**, Wessely-Szponder J. , Świeca M., Smolira A., Gruszecki T. 2017. The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. Small Rumin Res vol 156, s 50-56.

Wnioski na podstawie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

1. . Wykorzystując własny model badawczy, wiernie odwzorowujący warunki kliniczne gojenia złamania wieloodłamowego, opierając się na wynikach badań klinicznych, radiologicznych, histologicznych, mikroskopii skaningowej, oznaczeń przy pomocy obwodowego ilościowego tomografu komputerowego pQct oraz oznaczeniu wybranych parametrów markerów obrotu kostnego udowodniłem skuteczność implantacji żelu bogatopłytkowego i β -trójfosoranu wapnia jako metody wspomaganie zrostu kostnego. Po 12 tygodniach od implantacji u wszystkich zwierząt z grup badawczych, niezależnie od sposobu stabilizacji złamania uzyskałem prawidłowy zrost kostny. Proces wstawiania biomateriału miał korzystny wpływ na właściwości kostniny. W badaniach klinicznych w grupie 37 zwierząt leczonych tą metodą uzyskałem bardzo dobry wynik, jakim jest uzyskanie zrostu kostnego w 91% przypadkach. Cenną obserwacją podczas badań klinicznych jest fakt korzystnego

działania żelu bogatopłytkowego na proces gojenia tkanek miękkich w okolicy złamania, a także brak powikłań po implantacji żelu PRP I TCP .

2. Oceniając w badaniach eksperymentalnych na wspomnianym powyżej modelu proces implantacji i wchłaniania nowej formy siarczanu wapnia typu Hartform HF wykazałem że jest on materiałem biokompatybilnym. Po upływie 12 tygodni od złamania, niezależnie od sposobu stabilizacji u wszystkich zwierząt stwierdziłem prawidłowy zrost kości, potwierdzony badaniami radiologicznymi I histologicznymi. Dodatkowo, podczas implantacji jak i całego procesu gojenia złamania nie wystąpiły komplikacje. Potwierdziłem, że siarczan wapnia jest materiałem biozgodnym i może stanowić komponentę dla materiałów kompozytowych.
3. Udowodniłem, że zastosowanie obu schematów znieczulenia ketamina/midazolam/propofol i ketamina/propofol spowodowało przejściowe obniżenie aktywności neutrofilii, zapobiegając możliwemu podczas aktywacji tych komórek uszkodzeniu tkanek. Powyższa reakcja nie zaburza jednak odpowiedzi immunologicznej w dłuższym przedziale czasowym, gdyż efekty zastosowanego znieczulenia ustępowały w ciągu 24 godzin. Z powyższych względów ten typ znieczulenia może być rekomendowany do stosowania w zabiegach implantacji biomateriałów.
4. Analiza jakościowa dwóch autologicznych preparatów krwiopochodnych: żelu bogatopłytkowego PRP i ekstraktu neutrofilowego wykazała, że zawierają one substancje biologicznie czynne, potencjalnie użyteczne w praktyce klinicznej. Na podstawie oceny *in vitro* wpływu ekstraktu neutrofilowego na aktywność neutrofilii i makrofagów udowodniłem że powyższy preparat reguluje odpowiedź zapalną zapobiegając jej nadmiernemu nasileniu.
5. Ekstrakt neutrofilowy, jako środek zmniejszający odpowiedź wydzielniczą neutrofilii, może być rozważany jako preparat zmniejszający potencjalnie niebezpieczną

odpowieź wydzielniczą neutrofilii w przebiegu implantacji biomateriału, zarówno alginianu w ubytku kostnym, jak i włókien węglowych do chrząstki stawowej.

6. Wykazałem, że leczenie miejscowe przy pomocy ozonu i żelu bogatopłytkowego jest skuteczną metodą w leczeniu zakaźnej zanokcicy owiec, pozwalającą na eliminację stosowania antybiotyków i toksycznych środków odkażających. Analiza jakościowa żelu PRP przy użyciu metody MALDI TOF oraz badania hematologiczne i ELISA potwierdziły zawartość czynników wzrostu w stosowanym przez nas żelu bogatopłytkowym PRP

Piśmiennictwo:

1. Agier J, Efenberger M, Brzezina-Błaszczak E. 2015; Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Centr Eur J Immunol.*40:225–35.
2. Anitua E., Sanchez M., Orive G., Andia I. 2007. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, 28, (2007) 4551-4560.
3. Bocci V. 2002 *Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Evaluation* Springer Science & Business Media,).
4. Bocci V. 2004 Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.*, 13, 3-11.
5. Brydone A.S., Meek D., Maclaine S. Bone grafting orthopaedic biomaterials and the clinical need for bone engineering. *J Eng Med*, 2010, 224, 1329-1343.
6. Calori G.M., Mazza E., Colombo M., Ripamoti C., Tagliabue L. 2011. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: Indications and clinical results. *Injury, Int J care Injured*, 42 (2011) 587-590.

7. Castillo, T., Pouliot, M., Joo, K.H., Dragoo, J.,2011; Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation system. *Am. J. Sports Med.* 39: 266-270.
8. Cheng C-R. 2005. Inflammatory response to anesthesia and ways to attenuate it. *Advances in Anesthesia*, 23: 107-141.
9. Civinini R., Macera A., Nistri L., Redl B, Innocenti M. 2011. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2011, 8(1) 25-31.
10. Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C.K., Roy, S. 2015. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.* 185, 2596-2606.
11. Davidson J.A.H., Boom S.J., Pearsall F.J., Zhang P., Ramsay G.1995. Comparison of the effect of four i.v. anaesthetic agents on polymorphonuclear leucocyte function. *Brit. J. Anaesth.*, 74: 315-318.
12. Dimitriou R., Jones E., McGonagle D., Giannoudis P.V. 2011. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 2011, 9, 66.
13. Du Plessis, L.H., van der Westhuizen, F.H., Kotze, H.F. 2008. The protective effect of plasma antioxidants during ozone autohemotherapy. *Afr. Journal of Biotechnol* 7, 2472-2477.
14. Eligni, S., Crisci, M., Bono, E., Songia, P., Tremoli, E., Colombo, G.I., Coll, S. 2013. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J. Cell Physiol.* 228, 1464-1472.

15. Franch J., Diaz-Bertrana C., Lafuente P., Fontecha P., Durall I. 2006. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006, 19, 196-204.
16. Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J.C.: Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32 (2011) 6692-6709.
17. Frolich D., Rother G., Schwall B., Schmitz G., J., Taeger K. 1996. Thiopentone and propofol, but not methohexitone nor midazolam, inhibit neutrophil oxidative response to the bacterial peptide FMLP. *Eur. J. Anaesth.*, 13: 582-588.
18. Galley H., Dubbles A., Webster N. 1998. The effect of midazolam and propofol on IL-8 from human polymorphonuclear leukocytes. *Anesth. Analg.*, 86: 1289-93.
19. Galley H.F., Nelson L.R., Webster N.R. 1995. Anaesthetic agents decrease the activity of nitric oxide synthase from human polymorphonuclear leucocytes. *Brit. J. Anaesth.*, 75: 326-329.
20. Geelhaar-Karsch, A., Schinnerling, K., Conrad, K., Friebel, J., Allers, K., Schneider, T., Moos, V. 2013. Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens. *Inflamm. Res.* 62, 865-869.
21. Giannoudis P.V., Einhorn T., Marsh D. 2007. Fracture healing: The diamond concept. *Injury, Int J Care Injured*, 2007, 3854, 53-56.
22. Gonzalez-Correa J.A., Cruz-Andreaotti E., Arrebola M.M., Lopez-Villordes J.A. Jodar M., De LA Cruz JP. 2008. Effects of propofol on the leukocyte nitric oxide pathway: in vitro and ex vivo studies in surgical patients. *N-S. Arch. Pharmacol.*, 376: 331-339.
23. Grint N.J., Murison P.J. 2008. A comparison of ketamine-midazolam and ketamine-medetomidine combinations for induction of anaesthesia in rabbits. *Vet. Anaesth. Analg.*, 35: 113- 121.

24. Gunter C.I., Machens H-G. 2014. Innovations in wound medicine. *Wound medicine*, 4 (2014) 9-12.
25. Hak D.J., Fitzpatrick D., Bishop J.A., Marsh J.L., Tilp S., Schnettler R., Simpson H., Alt V. 2014. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*, 455, s 53-57.
26. Hancock, REW., Sahl, H-G. 2006. Antimicrobial and host–defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotech.* 24, 1551-1557. Hauschild G., Mereten H-A., Bader A., Uhr G., Deivick A., Meyer-Lindenberg A., Fehr M. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of β tricalciumphosphate and platelet rich plasma – A case report. *Vet Comp Orthop Traumatol* 18, 5254, 2005.
27. Helmy S.A.K., Al-Attiyah R.J. 2001. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia*. 56: 4-8.
28. Henke J., Astner S., Brill T., Eissner B., Busch R., Erhardt W. 2005. Comparative study of three intramuscular anaesthetic combinations (medetomidine/ketamine, medetomidine/fentanyl/midazolam and xylazine/ketamine) in rabbits. *Vet. Anaesth. Analg.* 32: 261-270.
29. Hoffer M.J., Griffon D.J., Schaeffer D.J., Johnson A.L., Thomas M.W. 2008. Clinical application of demineralized bone matrix: A retrospective and case-matched study of seventy five dogs. *Vet Surg* 2008, 37, 639-647.
30. Huettemann E., Jung A., van Hout N., Sakka S. 2006. Effects of propofol and methohexial on neutrophil function in cardiac surgical patients. *Annales of Cardiac Anaesthesia*, 9: 126-131.
31. Intini G., 2009. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*, 30, 4956-4966.
32. Jameson C. 2007; Autologous platelet concentrate for the production of platelet gel. *Labmedicine*. 38:39–42.

33. Jee C-H., Eom N-Y., Jang H-M., Choi E-S., Won J-H., Hong J-H., Kang B-T, Jeong D.W., Jung D-I. Effect of autologous platelet rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs. *J Vet Sci* 17 (1), 79-87, 2016.
34. Jhunjhunwala S, Aresta-DaSilva S, Tang K, Alvarez D, Webber MJ, Tang BC, Lavin DM, Veisheh O, Doloff JC, Bose S, Vegas A, Ma M, Sahay G, Chiu A, Bader A, Langan E, Siebert S Li J, Greiner DL, Newburger PE, von Andrian U H, Langer R, Anderson DG: Neutrophil responses to sterile implant materials. *PLOS ONE*, September 10, 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0137550.
35. Jones, J.A., McNally, A.K., Chang, D.T., Qin, L.A., Meyerson, H., Colton, E., Kwon, I.I., Matsuda, T., Anderson, J.M. 2007. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the foreign body reaction on biomaterials. *InterScience*. DOI:10.1002/jbm.a.31220.
36. Jungbluth P., Wild M., Grassmann J.P., Ar E., Sager M., Hertel M., Jäger M. Jürgen B., Windolf J., Hakimi M; Platelet rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Orthop Res* 28, 1448-1455, 2010.
37. Kaveh K., Ibrahim R., Bakar M., Ibrahim T. 2010. Bone grafting and bone graft substitutes. *J Anim Vet Adv*, 9, 1055-1067.
38. Kolar P., Schmidt-Bleek K., Schell H., Gaber T., Toben D., Schmidmaier G., Perka C., Buttgerit F., Duda G. 2010. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. *Tissue Eng Part B*, Vol 16, No 4, 427-434.
39. Kovtun A., Bergdolt S., Wiegner R., Radermacher P., Huber-Lang M., Ignatius A. 2016. The Crucial Role Of Neutrophil Granulocytes in Bone Fracture Healing. *Europ Cells and Materials* 2016, Vol 32, 152-162.

40. Laus, N.M., Soccio, M., Alfarano, M., Pasqualone, A.S., Lenucci, M., Di Miceli, G., Pastore, D. 2017. Different effectiveness of two pastas supplemented with either lipophilic or hydrophic/phenolic antioxidants in affecting serum as evaluated by the novel Antioxidant/Oxidant Balance approach. *Food Chemistry* 221, 278-288.
41. Lee G.H., Khoury J.G., bell J-E., Buckwalter J.A.; Adverse reaction to Osteoset bone graft substitute. The incidence in a consecutive series. *Iowa Orthop J*, 2002, 22, 35-38.
42. Lee, S., Choi, J., Shin, S., Im, Y-M., Song, J., Kang, SS., Nam, T-H., Webster, TJ., Kim, S-H., Khang, D. 2011. Analysis on migration and activation of the macrophages on transparent flat and nanostructured titanium. *Acta Biomateriala* 7, 2337-2344.
43. Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G. 2007. Systemic inflammation after trauma. *Injury*, 38: 1336-1345.
44. Lins KOAL, Vale MI, Ribeiro RA, Costa-Lotufo LV: Proinflammatory activity of an alginate isolated from *Sargassum vulgare*. *Carbohydr Polymers* 92: 414-420, 2013.
45. Lissenberg-Thunissen S.N., de Gater D.J., Sier C.F., Schipper J.B. 2011. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop*, Sep 35 (9), 1271-1280.
46. Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., Locati, M. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodeling. *J. Pathol.* 229, 176-185.
47. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology* 677-686.
48. Marx R. 2001 Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.*; 10:225–8.

49. McPhee, J.B., Hancock, R.E.W. 2005. Function and therapeutic potential of host defence peptides *J. Pep. Sci.*11, 677-687.
50. McWhorter F, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;10:17253–8.
51. Novak, M., Koh, T. 2013. Macrophage phenotypes during tissue repair *J. Leuk. Biol.* 93, 875-881.
52. Nystrom L., Raw R., Buckwalter J., Morcuende J.A.: Acute intraoperative reactions during the injection of calcium sulfate cement for the treatment of unicameral bone cysts; a review of four cases. *Iowa Orthop J* 2008, 28, 81-84.
53. Piccin, A., di Pierro, A.M., Canzian, L., Primerano, M., Corvetta, D., Negri, G., Mazzoleni, G., Gastl, G., Steurer, M., Gentilini, I., Eisendle, K., Fontanella, F. 2016. Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential. *Blood Transfusion* 25, 1-8.
54. Plachokova A.S., van den Dolder J., Stoelinga P.J., Jansen J.A. The bone regenerative effect of platelet rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defect. *Clin Oral Impl Res.* 27, 305-311, 2006.
55. Ragetly G.R., Griffon D.J. 2011. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010; 24, 1-8.
56. Rajzer I, Menaszek E, Bacakova L R, Blazewicz M. In vitro and in vivo studies on biocompatibility of carbon fibres *J Mater Sci: Mater Med* 21:2611–2622, 2010.
57. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgerit F, Volk H-D, Lienau J, Duda GN: Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res* 347: 567-573, 2012.

58. Schmoaekel H.G., weber F.E., Huster K., Schense J.G., Rytz U., Spreng D., Schawalter P , Hubbell J. Enhancement of bone healing using non-glycosylated rh-BMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 46, 17-21, 2005.
59. Selders SG, Fetz A E, Radic M Z, Bowlin G L: An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater* 4(1): 55–68, 2017.
60. Suthar M., Gupta S., Bukhari S., Ponemone V. (2017) Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma – a case series. *J of Biomed Sci*, 24, 17-27.
61. Thomas M.V., Puelo D.A., Calcium sulfate: properties and clinical applications. *J. Biomed Mat Res Part B Appl Biomat* 2008, 88B, 597-610.
62. Toft P., Tonnesen E. 2008. The systemic inflammatory response to anaesthesia and surgery. *Curr. Anaesth. Crit. Care*, 19: 249-353.
63. Vertenten G., Gasthuys F., Cornelissen M., Schacht E. 2010. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010, 23; 153-162.
64. Wessely-Szponder J., Majer-Dziedzic B., Smolira A. 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *Journal of Microbiological Methods* 83, 8-12.
65. Wróblewski A.P., Hector B.S., Mejia A, Wright V.J. 2010. Application of platelet rich-plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop* 20, 98-105, 2010.

66. Zughailer SM, Shafer WM, Stephens DS. 2005 Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol.*;7:1251–62.

1. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A) Aktywność naukowa

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład głównego osiągnięcia naukowego obejmuje 28 publikacji, w tym 18 oryginalnych prac znajdujących się w bazie JCR. Jestem również autorem i współautorem 29 doniesień zjazdowych prezentowanych na kongresach i konferencjach krajowych i zagranicznych.

A) 1. Aktywność naukowa przed doktoratem

Pierwszy okres mojej pracy naukowo-badawczej w Katedrze i Klinice Chirurgii Zwierząt początkowo obejmował zapoznanie się z metodami diagnostycznymi i leczenia chorób chirurgicznych zwierząt. Pracując w Klinice Chirurgii Zwierząt rozpocząłem badania nad chirurgicznym leczeniem złamań u małych zwierząt. W okresie przed uzyskaniem stopnia doktora odbyłem szkolenia we Francji i Włoszech, poświęcone wykorzystaniu metody Ilizarowa w traumatologii małych zwierząt, co pozwoliło mi na rozpoczęcie badań dotyczących leczenia złamań i powikłań zrostu kostnego przy pomocy stabilizatorów zewnętrznych. Jednocześnie dzięki współpracy nawiązanej z Katedrą Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie rozpocząłem badania nad wykorzystaniem elementów kompozytowych w konstrukcji stabilizatorów okrężnych. Wyniki tych badań przedstawiłem w pracy doktorskiej.

Efektom prowadzonych badań są poniższe publikacje i komunikaty zjazdowe, przedstawione w porządku chronologicznym:

1. Balicki I., Komar E., Silmanowicz P., Polkowska I., **Szponder T.** 1995. Leczenie operacyjne oddzielenie nasady dolnej kości udowej i złamań nadkłykciowych przy użyciu grotowkrętów Schanza. Materiały III Kongresu PSLWMZ, Olsztyn 2-3.09. 61-67.
2. Balicki I., Komar E., Silmanowicz P., Grela A., Polkowska I., **Szponder T.** 1996. Leczenie operacyjne złamań dalszego końca kości udowej i ramiennej przy użyciu grotowkrętów Schanza u psów. *Mag Wet*, vol 5 (3) 199-201.
3. Komar E., **Szponder T.** 1998. Wstępne wyniki leczenia złamań metodą Ilizarowa u małych zwierząt. XI u małych zwierząt. XI Konferencja Naukowa poświęcona 10-leciu Stosowania Metody Ilizarowa w Polsce. Polanica Zdrój, 18-20.06. s 82.
4. Komar E., **Szponder T.**, Silmanowicz P. 1998. Zastosowanie stabilizatora Ilizarowa u małych zwierząt. *Życie Wet*, 73 (8) s 307-310.
5. **Szponder T.**, Silmanowicz P. 1999. Przypadek chondrosarcoma w odcinku szyjnym kręgosłupa u psa. Choroby nowotworowe u zwierząt- stan obecny i perspektywy. II Międzynarodowa Konferencja, Lublin 19-20.09. s. 36-39.
6. Komar E., **Szponder T.**, 1999. Initial results of treatment of long bone fractures in small animals with the use of the Ilizarov method. *Vet Comp Orthop Traumatol* vol 12(1) A1, Third Veterinary ASAMI Scientific Session. 7.11. Cremona, Italy .
7. **Szponder T.** 2000. Zastosowanie pierścieni węglowych w konstrukcji stabilizatora zewnętrznego Ilizarowa do leczenia złamań u małych zwierząt. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, DD Medicina Veterinaria*, vol 55/A s 198, XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk weterynaryjnych – Lublin, 21-23 09.2000.

A) Główne kierunki badań

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk weterynaryjnych wyniki badań opisanych w pracy doktorskiej przedstawiłem w następujących publikacjach:

1. **Szponder T.**, Silmanowicz P., Chłopek J., Wajler C. 2003. Zastosowanie pierścieni kompozytowych w budowie aparatu Ilizarowa u małych zwierząt. *Med Wet* 9 (2), 150-153.

2. **Szponder T.**, Balicki I., Polkowska I., Brodzki A., Róžańska D., Orzelski M. 2004. Zastosowanie stabilizatora Ilizarowa w leczeniu złamań kości długich u małych zwierząt. *Med. Wet* 60 (5), 500-503.

Główne kierunki badań realizowanych przeze mnie w Katedrze Chirurgii Zwierząt obejmują zagadnienia związane z następującymi tematami:

1. Diagnostyka i patomechanizm chorób nowotworowych małych zwierząt.

W ramach badań nad diagnostyką i patomechanizmem chorób nowotworowych u małych zwierząt współuczestniczyłem w pracach nad określeniem współzależności pomiędzy zawartością wolnych aminokwasów i magnezu u małych zwierząt a nowotworami skóry oraz gruczołu sutkowego. Ponadto jestem współautorem pracy dotyczącej zależności pomiędzy ekspresją czynnika VEGF w surowicy u psów a rakiem płaskonabłonkowym u tego gatunku. Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w pracach:

1. Brodzki A., Pasternak K., Balicki I., Brodzki P., **Szponder T.**, Tatar M. 2004. Wolne aminokwasy w nowotworach gruczołu sutkowego u psów. *Medycyna Weterynaryjna*, 60 (9), 937-941.
2. Brodzki A., **Szponder T.**, Pasternak K., Stanke M. 2004. Magnesium in tumors in the dogs skin. *Bull Vet Inst. Pul* 48 (3), 317-320.
3. Brodzki A., Pasternak K., Sztanke M., Brodzki P., **Szponder T.** 2004. Magnesium concentrations in mammary tumours in dogs. *Magnesium Res* 17 (2), 79-84.
4. Brodzki A., Tatar M.R., Pasternak K., Róžańska D., **Szponder T.** 2005. Free amino acids in skin neoplastic and serum in dogs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 49 (2), 231-235.
5. Sobczyńska-Rak A., Polkowska I., Gołyńska M., **Szponder T.**, Żylińska B., Łopuszyński W. 2017. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in dogs suffering from squamous cell carcinoma. *Med. Weter.* 73 (5) 289-294.

2. Choroby przyzębia u małych zwierząt.

Brałem udział w badaniach związanych z opracowaniem nowych markerów diagnostycznych chorób przyzębia i jamy ustnej u małych zwierząt. Wyniki tych badań przedstawiono w następujących pracach:

1. Polkowska I., Gołyńska M., Sobczyńska Rak A., Dudek A., **Szponder T.**, Matuszewski Ł. 2018. Haptoglobin as a treatment monitoring factor in feline plasmacytic gingivostomatitis. *Pol J Vet Sci*, Vol 21 nr 1, s. 167-174.
2. Polkowska I., Sobczyńska-Rak A., **Szponder T.**, Żylińska B., Orzędą-Koszel U., Capik I., Matuszewski Ł. 2018. The Impact of Periodontal Disease on the Heart and Kidneys in Dogs. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* Vol 24 (5), s 633-638.
3. Sobczyńska-Rak A., Żylińska B., Polkowska I., **Szponder T.** 2018. Elevated EGF Levels in the Blood Serum of Dogs with Periodontal Diseases and Oral Tumours. *In Vivo*, Vol 32 (3), s 507-515.

3. Badania dotyczące zastosowania biomateriałów w medycynie i weterynarii.

Dzięki nawiązaniu współpracy z Katedrą Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie oraz Katedrą Chemii Biomateriałów i Kosmetyków Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu uczestniczę w badaniach dotyczących oceny *in vivo* nowo opracowanych biomateriałów do uzupełniania ubytków tkanek u ludzi i zwierząt.

1. Kłodowski K., Kamiński J., Nowicka K., Tarasiuk J., Wroński S., Świętek M., Figiel H., **Szponder T.** Turek K. 2014. Micro-imaging of implanted scaffolds using combined MRI and micro-CT. *Comput Med Imaging Graph.* 38 (6), 458-468.
2. Żylińska B., Stodolak-Zych E., Sobczyńska-Rak A., **Szponder T.**, Silmanowicz P., Łańcut M., Jarosz Ł., Różański P. 2017. Osteochondral repair using porous three-dimensional nanocomposite scaffolds in a rabbit model. *In Vivo*, 31 (5), 895-903.

3. Kaczmarek B., Sionkowska A., Gołyńska M., Polkowska I., **Szponder T.**, Nehrbass D., Osyczka A.M. 2018. In Vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite. *Int J. Biol Macromol*, 2018, Vol 118, c 938-944.
4. Polkowska I., Ślósarczyk A., Sobczyńska-Rak A., Gołyńska M., **Szponder T.**, Żylińska B. 2018. Use of microporous hydroxyapatite material in regenerative treatment of periodontal tissues in dogs: a clinical study. *Med Weter* , IN PRESS, DOI: 1021521/mw.5985
5. Stodolak-Zych E., Pałka K., **Szponder T.**, Nowicka K., Błazewicz S. 2014. Comparison of durability of resorbable polymer pins *in vitro* and *in vivo* conditions. Preliminary study. *Inż. Biomater*, vol 14, nr 128-129, s 87-89.
6. Szaraniec B. Gryń K., **Szponder T.**, Żylińska B. 2015. Biowchłaniaalne płytki zespalające dla weterynarii=Biodegradable fixation plates for veterinary medicine. 2014. *Inż Biomater* vol 17 nr 125, s 30-36.

Po nawiązaniu współpracy z Zakładem Patofizjologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie brałem udział w pracach zespołu badawczego zajmującego się analizą odpowiedzi zapalnej organizmu na implantację siarczanu wapnia poprzez ocenę efektu, jaki wywiera on na neutrofile pobrane w różnych odstępach czasu od zabiegu implantacji. Dodatkowo oceniano w warunkach *in vitro* stymulację katelicydynami neutrofilii izolowanych z krwi królików. W kolejnych badaniach, będących kontynuacją i rozszerzeniem poprzednich, celem była analiza udziału izolowanych katelicydyn oraz niskocząsteczkowego ekstraktu neutrofilowego, pozyskanego z krwi świń, w komórkowej odpowiedzi zapalnej u królików w przebiegu implantacji biomateriału do ubytku kostnego. Przeprowadzone badania naświetlają znaczenie immunologicznych reakcji komórkowych podczas stosowania peptydów antybakteryjnych w procesie wgajania implantów kostnych (siarczanu wapnia).

Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

1. Wessely-Szponder J., Bobowiec R., Szponder T. 2012. The influence of porcine prophenin on neutrophils isolated from rabbit blood during implantation of calcium sulphate graft material into bone tissue *World Rabbit Science* 20, No 3, 163-172.

2. Wessely-Szponder J., Szponder T., Bobowiec R., Smolira A. 2013. The influence of porcine cathelicidins on neutrophils isolated from rabbits in the course of bone graft implantation. *World Rabbit Science* 21, 175-183.

W obrębie tego samego zespołu badawczego byłem współautorem i wykonawcą części eksperymentalnej *in vivo* w badaniach dotyczących oddziaływania implantu tytanowego na monocyty krwi z uwzględnieniem ich przyszłej modyfikacji do makrofagów.

Badania wykonano na makrofagach z monocytów izolowanych z krwi królików przed i po zabiegu implantacji wszczepów tytanowych. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono, że ekstrakt neutrofilowy działa wielokierunkowo we wspomaganiu procesu gojenia, równocześnie posiadając cechy stymulatora pro i przeciwzapalnego działania makrofagów. Wykazano również, że po implantacji tytanowych implantów nie dochodzi do aktywacji monocytów, która istotnie wpływałaby na populację powstałych makrofagów.

Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy:

Wessely-Szponder J., **Szponder T.** Bobowiec R., 2017. Different activation of monocyte-derived macrophages by antimicrobial peptides at a titanium tibial implantation in rabbits. *Res in Vet Sci* 115, 201-210.

4. Zaburzenia parametrów krzepnięcia krwi i reakcji zapalnej w wybranych chorobach ortopedycznych małych zwierząt.

Wykorzystując swoje doświadczenia jako chirurga rozpocząłem badania nad patogenezą chorób ortopedycznych małych zwierząt Legg--Calve-Perthesa (LCP) i osteochondrozy (OC), u podstawy których leżą zaburzenia czynników krzepnięcia krwi. Są to jednostki chorobowe, w których dochodzi do patologicznych zmian w stawach i poważnych zaburzeń w poruszaniu się u wielu ras psów. W obu powyższych chorobach osoczowe stężenia białka C i fibrynogenu uznałem za potencjalne markery diagnostyczne. W

wyniku przeprowadzonych badań ustaliłem, że poziom białka C, jako czynnika przeciwkrzepliwego i fibrynolitycznego, był niższy w obu badanych grupach chorych psów w porównaniu do osobników zdrowych. Natomiast poziom fibrynogenu był znacząco wyższy u psów z osteochondrozą. Wykonane badania pozwalają uznać zmiany stężenia białka C i fibrynogenu w osoczu badanych psów za potencjalne markery chorób rozwojowych układu kostnego u tego gatunku. W przyszłości pozwolą na stworzenie palety oznaczeń hematologicznych w prognozowaniu zaburzeń ortopedyczno-rozwojowych u szczególnie u ras psów predysponowanych do powyższych chorób. Wyniki zostały opublikowane w pracy:

Szponder T., Wessely-Szponder J. 2010. Plasma level of Protein C, fibrinogen concentration and platelet number in dogs with Legg-Calve-Perthes disease and osteochondrosis. Preliminary studies. *J Bull Vet Inst Pulawy* 54, 433-436.

4. Badania nad znieczuleniem zwierząt w aspekcie klinicznym i eksperymentalnym

Uczestniczyłem w badaniach nad opracowaniem nowych modeli znieczuleń u małych zwierząt. Wyniki zostały opublikowane w pracy:

Balicki I., Różańska D., Ćwiek A., Silmanowicz P., **Szponder T.** Brodzki A. 2007. Krótkotrwałe znieczulenie psów o przy użyciu midazolamu i ksylazyny. *Met Wet.* Vol 63 (1) s. 72-74.

Ponadto we współpracy z Kliniką Anestezjologii i Intensywnej Terapii SPSK 4 w Lublinie oraz Politechniką Wrocławską współuczestniczyłem w badaniach modelu znieczulenia na świniach z zastosowaniem zewnętrznych ciśnień subatmosferycznych w rekrutacji płuc. Badania obejmowały ocenę biomechaniki płuc, hemodynamiki i wymiany gazowej. W powyższym zespole badawczym, w skład którego wchodził naukowcy z Politechniki Wrocławskiej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz Kliniki Chirurgii

Zwierząt UP byłem odpowiedzialny za procedury chirurgiczne oraz monitoring znieczulenia i pobieranie materiału do badań oraz opracowanie części badań. Efektem tych badań jest przyjęta do druku praca w Polish Journal of Veterinary Science na temat sekrecyjnej odpowiedzi neutrofilów w przebiegu znieczulenia wziewnego, doświadczalnych uszkodzeń płuc oraz podczas tzw. manewrów rekrutacyjnych zmierzających do przywrócenia zdolności wentylacyjnych zapadniętych pęcherzyków płucnych. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność metody w aspekcie odpowiedzi neutrofilowej i stanowią część większego projektu, gdzie badane będą też inne aspekty powyższego znieczulenia. Badania przeprowadzono w obrębie tematu *Metody i algorytmy obserwacji struktur płuc i ich patofizjologii w modelu rekrutacji ostrej niewydolności oddechowej*. Projektu nr 2013/11/B/ST7/01173 finansowanego przez NCN.

5. Badania nad chorobami ortopedycznymi występującymi u ludzi i zwierząt.

Dzięki nawiązaniu współpracy z Kliniką Ortopedii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie uczestniczyłem w badaniach nad chorobami narządu ruchu występującymi zarówno u ludzi jak i zwierząt.

Projekt obejmował badania kliniczne zjawisk bioelektrycznych, występujących podczas stosowania stabilizatora Ilizarowa, oceny dokonano na podstawie niezależnych pomiarów u ludzi i zwierząt. Współuczestniczyłem również w badaniach nad chorobą Perthesa, w szczególności dotyczących zmian patologicznych w preparatach uzyskanych śródoperacyjnie od chorych zwierząt. Oprócz tego uczestniczyłem w opracowaniu modeli badawczych z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych, gdzie wykonywałem część eksperymentalną i brałem udział w ocenie osiągniętych wyników. Wyniki badań opublikowano w poniższych publikacjach i komunikatach naukowych:

1. Raganowicz T., Latański M., Gregosiewicz A., **Szponder T.**, Silmanowicz P., Kisiel J. 2002. Testing the differences in bioelectrical potentials occurring in distractive osteogenesis. Human and animal clinical research. Ortop Traumat Rehabil Vol 4 nr 3 s. 299-301.

2. Kandzierski G., Czerny K., Łaćcut M., Visconti J., Madej J., **Szponder T.** 2003. Zaburzenia rośnięcia głowy kości udowej w etiologii choroby Perthesa u dzieci. Wyniki badań histologicznych głów kości udowych psów z chorobą Perthesa. Kwart. Ortop. 3, s 155-161.
3. Karski J., **Szponder T.** 2012. Role of iliotibial band on knee axis. Experimental study of elongation or shortening of the ilio-tibial band in sheep. J Child Orthop Vol 6, Suppl 1, s3-4, EPOS 31st Annual Meeting, Helsinki, 18-21 April, 2012, Abstr.
4. Latański M., **Szponder T.**, Fatyga M., Danielewicz_Bromberek A., Starobrat G. 2016. Zmiany w obrebie chrząstki wzrostowej trzonów kręgów po korekcji skoliozy w modelu zwierzęcym. VI Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chirurgii Kręgosłupa, Zakopane, 13-15 października 2016.
5. Latański M., **Szponder T.**, Fatyga M., Danielewicz-Bromberek A. 2016. The behavior of the vertebral growth plate after surgical correction of scoliosis in an animal model. J. Child Orthop, 2016, Vol 10 Suppl 1S. 13, EPOS 35th Congress Meeting Rome, 6-9 April, 2016, Abstr.

A) 3. Podsumowanie dorobku badawczego

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact factor*	Punkty*
Prace oryginalne	32	19,716	472
Prace przeglądowe	2	1,313	30
Doniesienia zjazdowe	29	-	-
Łącznie		21,029	502
(w tym prace wchodzące w skład osiągnięcia)	(6)	(5,447)	(115)

* - sumaryczny IF i liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem publikacji (dla prac z 2016 i 2017 r. z 2015r.)

B) Działalność dydaktyczna

Od początku zatrudnienia w Katedrze I Klinice Chirurgii Zwierząt uczestniczę w działalności dydaktycznej, prowadzę zajęcia dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej z następujących przedmiotów:

- Choroby koni
- Choroby zwierząt gospodarskich
- Choroby psów i kotów
- Biomateriały

Jestem również osobą odpowiedzialną za prowadzenie fakultetu: Neurologia kliniczna i neurochirurgia. Dla potrzeb tego przedmiotu opracowałem autorski program nauczania i jest on obecnie realizowany.

W trakcie działalności klinicznej jestem opiekunem studentów weterynarii V i VI roku podczas staży klinicznych oraz lekarzy weterynarii przebywających na stażach specjalizacyjnych w Klinice Chirurgii Zwierząt UP.

W ramach projektu ERASMUS w latach 2011-2014 prowadziłem zajęcia dla studentów anglojęzycznych z zakresu Chirurgii weterynaryjnej.

Prowadziłem również zajęcia z zakresu chirurgii weterynaryjnej i eksperymentalnej w innych jednostkach Dydaktycznych:

- Międzywydziałowej Szkoła Inżynierii Biomedycznej działającej przy AGH w Krakowie
- Studium Specjalizacji z Chirurgii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu
- Studium Specjalizacji z Małych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

W 2004 roku w ramach Centrum Kształcenia Ustawicznego UP w Lublinie w oparciu o własny autorski program przygotowałem i przeprowadziłem trzy edycje szkolenia z zakresu wykorzystywania stabilizacji zewnętrznej w leczeniu z złamań u małych zwierząt, w których łącznie uczestniczyło ponad 60 lekarzy weterynarii. Dla potrzeb tego szkolenia opracowałem autorski program kursu oraz przy pomocy firm wytwarzających wszczepy kostne dokonałem adaptacji stabilizatorów zewnętrznych dla małych zwierząt. Nabyte doświadczenia podczas kursu wykorzystuję podczas zajęć praktycznych dla studentów weterynarii z zakresu ortopedii małych zwierząt.

W celu podnoszenia swoich kwalifikacji wielokrotnie uczestniczyłem w kursach i szkoleniach;

1997 – European College of Veterinary Surgeons (ESVOT)– Paryż- szkolenie z zakresu stosowania metody Ilizarowa u Małych zwierząt

1998 – Italian Companion Animal Veterinary Association (SCIVAC) – Cremona – zaawansowane szkolenie na temat wykorzystania metody Ilizarowa w ortopedii małych zwierząt

2002 – Continuing Professional Development Days at the University of Liverpool- Course of Small Animal Arthroscopy, Liverpool

2006 – Fundacja AO/ASIF, Katedra i Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu AM w Warszawie – “AO Basic Course of Principles of Fracture Care”, Warszawa

2015- Szkolenie: Zabiegi laparoskopowe u zwierząt towarzyszących – Lublin

Uczestniczę też regularnie w konferencjach ortopedycznych organizowanych przez Polskie Towarzystwo Ortopedyczne i Traumatologiczne, co pozawala mi na zapoznanie się z najnowszymi metodami leczenia w ortopedii (zał. 4).

W ramach udostępniania podręczników chirurgii weterynaryjnej dla studentów i lekarzy weterynarii brałem udział jako konsultant merytoryczny w opracowaniu polskojęzycznej wersji następujących pozycji:

Horzinek M. Schmidt V., Lutz H.: Praktyka kliniczna – koty, Wydawnictwo Galaktyka 2004.

Schabitz H., Brass W.: Techniki operacyjne u psów i kotów. Wydawnictwo Galaktyka 2004.

Dzięki współpracy z Katedrą Biomateriałów AGH w Krakowie byłem recenzentem prac magisterskich:

Monika Żmuda: Ocena ex-vivo nanokompozytowych implantów kostnych na bazie alginianu, AGH Kraków 2012

Łukasz Sas: Funkcjonalizacja resorbowalnych membran czynnikami aktywnymi o charakterze organicznym i nieorganicznym, AGH Kraków 2016.

C. Inna działalność

W ramach współpracy z organizacjami zrzeszającymi lekarzy weterynarii takich jak Śląską Polikliniką Weterynaryjną i Polskiego Stowarzyszenia Lekarzy Weterynarii Małych Zwierząt występowałem jako wykładowca z zakresu chirurgii weterynaryjnej zarówno podczas dorocznych konferencji jak i szkoleń organizowanych przez sekcję chirurgiczną PSLMZ. Uczestniczyłem też jako wykładowca podczas Konferencji Ukraińskiego Stowarzyszenia Lekarzy Weterynarii Małych Zwierząt (USAVA Lwów 2015), gdzie otrzymałem nagrodę USAVA za prezentacje i wkład naukowy w rozwój nauk weterynaryjnych w Ukrainie.

Tomasz Szpanda

29.10.2018