

**Ewa Jankowska-Steifer**

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii  
Centrum Biostruktury  
Warszawski Uniwersytet Medyczny

## **Autoreferat**

Warszawa, 2018

### **1. Imię i Nazwisko: Ewa Jankowska-Steifer**

### **2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- 1986** magister biologii, praca magisterska „Częstość występowania mejotycznych komórek płciowych i struktura jąder 5-dniowych mysich chimer płciowych” wykonana w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem dr Wacława Ożdżeńskiego.
- 2000** doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, tytuł rozprawy doktorskiej "Morfometryczna, ultrastrukturalna ocena komórek satelitarnych mięśnia przepony szczurów w różnych okresach ich życia ", nadany uchwałą Rady Naukowej Centrum Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie.  
Promotor przewodu doktorskiego: prof. Wanda Barańska.  
Recenzenci: prof. Ryszard Aleksandrowicz, prof. Ludwik Malendowicz.  
Praca z wyróżnieniem.

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

- 1986-2002** Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej [od 1993 Zakład Mikroskopii Elektronowej] Akademii Medycznej w Warszawie, biolog
- 2002-2018** Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, adiunkt
- 2018** Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, starszy wykładowca

### **4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):**



**a) tytuł osiągnięcia naukowego**

**Badania hematopoezy oraz tworzenia naczyń wieńcowych i chłonnych w płodowym sercu myszy.**

**b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

1. Ratajska A, **Jankowska-Steifer E (equal contribution)**, Czarnowska E, Olkowski R, Gula G, Niderla-Bielińska J, Flaht-Zabost A, Jasińska A. 2017: Vasculogenesis and its cellular therapeutic applications. *Cells Tissues Organs*, 203(3):141-152. IF: **1,275**; MNiSW: **20**
2. **Jankowska-Steifer E**, Madej M, Niderla-Bielińska J, Ruminski S, Flaht-Zabost A, Czarnowska E, Gula G, Radomska-Leśniewska DM, Ratajska A. 2015: Vasculogenic and hematopoietic cellular progenitors are scattered within the prenatal mouse heart. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(2):153-69. IF: **2,78**; MNiSW: **35**
3. **Jankowska-Steifer E**, Niderla-Bielińska J, Cizek B, Kujawa M, Bartkowiak M, Flaht-Zabost A, Klosinska D, Ratajska A. 2018: Cells with hematopoietic potential reside within mouse proepicardium. *Histochemistry and Cell Biology*, 149(6):577-591. IF: **2,164**; MNiSW: **30**
4. Ratajska A, **Jankowska-Steifer E**, Czarnowska E, Flaht A, Radomska-Leśniewska D. 2012: Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels. *Postępy Hig Med Dośw.*, 19;66:901-12. IF: **0,552**; MNiSW: **15**
5. Flaht A, **Jankowska-Steifer E**, Radomska DM, Madej M, Gula G, Kujawa M, Ratajska A. 2012: Cellular phenotypes and spatio-temporal patterns of lymphatic vessel development in embryonic mouse hearts. *Dev Dyn.*, 241(9):1473-86. IF: **2,59**; MNiSW: **35**

RAZEM IF: **9,361** MNiSW: **135**

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

Celem przedstawionych jako wspólne dzieło (osiągnięcie naukowe) publikacji jest pogłębienie wiedzy na temat wczesnych etapów tworzenia naczyń krwionośnych i powiązanej z tym procesem hematopoezy oraz formowania się naczyń chłonnych wraz z charakterystyką fenotypową utworzonych naczyń, zarówno typu krwionośnego jak i chłonnego. Oba systemy – krążenia oraz sieci naczyń chłonnych współdziałają ze sobą w utrzymaniu homeostazy



płynów, odprowadzania zbędnych produktów przemiany materii oraz dostarczenia substancji odżywczych i tlenu do tkanek. Te dwa systemy naczyń wzajemnie się uzupełniają w pełnieniu podstawowych funkcji życiowych rozwijającego się organizmu. W przedstawionych pracach pokazałam obserwacje nowatorskie dotyczące szczegółów różnych etapów procesu hematopoezy związanej ze ścianą naczyń krwionośnych wczesnego zarodka (ze śródbłonkiem hemogennym). Układ krążenia oraz serce rozwijają się najszybciej, a serce jest pierwszym narządem, który formuje się, dojrzewa oraz w pełni funkcjonuje podczas rozwoju zarodkowego/płodowego, zatem z punktu widzenia biologii rozwoju oraz patogenezy wielu chorób jest uzasadnione dokładne poznanie wczesnych etapów tworzenia się naczyń serca. Proces ten przebiega pod postacią waskulogenezy (tworzenia naczyń *de novo* z angioblastów) oraz angiogenezy (tworzenia naczyń w wyniku rozrastania się istniejącej sieci naczyń).

Początkowo sądzono, że waskulogeneza występuje tylko podczas rozwoju zarodkowego, obecnie wiadomo, że zjawisko to występuje także po urodzeniu. Ponieważ waskulogenezie zarówno zarodkowej jak i pozazarodkowej zwykle towarzyszy pojawienie się komórek hematopoetycznych powstało przypuszczenie, że istnieje wspólna komórka progenitorowa dla linii śródbłonkowej jak i hematopoetycznej, dla której zastosowano termin hemangioblast. Szczegółowe rozważania na temat wczesnych etapów tworzenia naczyń, komórek śródbłonka oraz krwinek, istnienia hemangioblasta oraz charakterystyki śródbłonka hemogennego zostały przedstawione przeze mnie w pracy pt.: "**Vasculogenesis and its cellular therapeutic applications**" (publikacja 1).

Potencjalnym źródłem hemangioblastów miałyby być komórki mezodermy bocznej wykazujące ekspresję markera mezodermalnego Brachyury (Bry) i Flk1 (VEGFR2), podczas różnicowania tych komórek wraz ze wzrostem ekspresji Flk1 spada ekspresja Bry. W hodowlach ciałek embrionalnych wykazano obecność komórek, uznanych za ekwiwalent hemangioblastów, różnicujących się w komórki progenitorowe obu linii: śródbłonkowej i hematopoetycznej. Różnicowanie w kierunku hemogennym jest zależne od podlegającego w komórkach mezodermalnych czynnika transkrypcyjnego Etv2/Er71, pod kontrolą którego znajduje się ekspresja genów krytycznych dla linii śródbłonkowej (PECAM1 Tie2 i VE-cadheryny) oraz hemangioblastu i/lub linii hematopoetycznej (Gata1, Gata2 i Scl). Rozwój komórek mezodermalnych znajduje się pod kontrolą FGF-2 oraz czynników z rodziny TGF- $\beta$ : BMP, nodal, aktywina, których ekspresja jest potrzebna do podjęcia wyboru między samoodnową a różnicowaniem komórek pluripotentnych. Z wielu doświadczeń wynika, że komórki śródbłonka mogą rozwijać się bezpośrednio z angioblastów, z pominięciem hemangioblastu. Ponieważ w tkankach nie zaobserwowano obecności hemangioblastu jego



istnienie bywa kwestionowane. Uważa się raczej, że hemangioblast określa stan kompetencji komórek do różnicowania w komórki śródbłonka lub komórki hematopoetyczne zależnie od wpływu czynników środowiskowych. Z powodu kwestionowania istnienia hemangioblastu, oraz braku jednolitego, specyficznego markera dla hemangioblastu trudnością jest izolacja tych komórek jak i precyzyjna lokalizacja w zarodku. Podczas rozwoju zarodkowego łącznikiem pomiędzy komórkami hematopoetycznymi a komórkami śródbłonka jest śródbłonek hemogeny. Na wczesnym etapie różnicowania komórki śródbłonka i komórki hematopoetyczne wykazują ekspresję takich samych markerów. Brak uniwersalnego jednego znacznika czyni badanie komórek progenitorowych waskulogenezy/angiogenezy i hematopoezy dużym wyzwaniem. Ponadto, na izolowane śródbłonkowe komórki progenitorowe wpływ mają także oddziaływania pozaustrojowe, co może zmieniać fenotyp badanych komórek. Poglębianie wiedzy na temat waskulogenezy/hematopoezy płodowej jest istotne, gdyż zjawisko to występuje w dojrzałym organizmie, zwłaszcza w trakcie leczenia ran i podczas rozwoju nowotworów, dodatkowo, w niektórych złośliwych guzach pojawia się także hematopoeza pozaszpikowa (rak płuc, rak piersi, mięsak Kaposiego). Ponadto, w przytoczonej pracy opisałam rolę makrofagów w stymulowaniu procesu waskulogenezy. Zatem pogłębianie wiedzy teoretycznej na temat waskulogenezy i hematopoezy płodowej może być przydatne w potencjalnych celach terapeutycznych, zarówno do stymulacji jak i zahamowania tych procesów.

Ocena fenotypowa i lokalizacja hematopoetycznych i waskulogennych komórek progenitorowych w sercu płodowym myszy została zawarta w opublikowanej przeze mnie pracy "**Vasculogenic and hematopoietic cellular progenitors are scattered within the prenatal mouse heart**" (publikacja 2).

Z literatury wiadomo, że pierwsze komórki krwi pojawiają się w „wyspach krwiotwórczych” rozwijających się w mezodermie pęcherzyka żółtkowego. Ta wczesna hematopoeza określana jako pierwotna prowadzi do powstania erytroblastów kwasochłonnych, megakariocytów i monocytów. Komórki te występują w grupach otoczonych pojedynczą warstwą komórek śródbłonka. Proponowane pochodzenie „wysp krwiotwórczych” jest dwojakie: od hemangioblasta lub od niezależnych komórek progenitorowych dla komórek śródbłonka oraz komórek hematopoetycznych. W trakcie rozwoju organizmu hematopoeza pierwotna szybko zastępowana jest przez hematopoezę wtórną, która przebiega w dwóch falach. Pierwsza z nich, mająca miejsce także w wyspach pęcherzyka żółtkowego prowadzi do powstania erytro-mieloidalnych komórek progenitorowych hematopoezy, które są zdolne do przejściowej kolonizacji śledziony myszy.



Podczas drugiej fali (10.5E, u człowieka w 5 tygodniu) powstają komórki macierzyste hematopoezy, zdolne do ciągłej samoodnowy, a po zasiedleniu szpiku stale produkują komórki hematopoetyczne. Wiadomo, że źródłem komórek hematopoetycznych podczas hematopoezy wtórnej jest śródbłonek hemogeny, który po raz pierwszy został odkryty w rejonie brzusznej aorty grzbietowej rejonu aorta-gonada-śródniercze. Obecność komórek śródbłonka hemogenego stwierdzono w tętnicach żółtkowej i pępkowej, w naczyniach łożyska i wyspach pęcherzyka żółtkowego. Cechami pozwalającymi na wyróżnienie określonych typów komórek progenitorowych hematopoezy jest ekspresja określonych markerów. Śródbłonek hemogeny wykazuje ekspresję markerów typowych dla komórek śródbłonka, jak glikoproteina CD31, czy Flk1 oraz markerów hematopoetycznych, jak CD41 (integryna  $\alpha 2b$ ), czy c-kit (CD117). Hematopoeza płodowa występuje także w płodowym sercu. Obecność śródbłonka o aktywności hemogennej wykazano w drodze odpływu i przedsionkach serc płodowych myszy (8.25–8.5 dpc - dzień po zapłodnieniu). Płodowe serce jest miejscem występowania struktur zwanych „wyspami krwiotwórczymi”, które przypominają wyspy hematopoetyczne pęcherzyka żółtkowego. Znajdują się one w warstwie podnasilrdziowej mezenchymy w okolicy bruzd międzykomorowych i przedsionkowo-komorowych, oraz wcięciu koniuszkowym serca. Okres ich występowania przypada u myszy na 11-14 dpc, zaś u człowieka na stadia Carnegie 14-17. Podczas dalszego rozwoju serca wyspy tworzą odgałęzienia naczyniopodobne, które zlewając się biorą udział w wytwarzaniu naczyń wieńcowych. Istniały różne hipotezy wyjaśniające pochodzenie „wysp krwiotwórczych” serca. Według pierwszych miałyby one powstawać *in situ* z komórek progenitorowych, według innych wyspy stanowią balonowatego kształtu wpuklenia śródbłonka wsierdzia.

W moich badaniach skoncentrowałam się na sercach płodowych myszy z okresu rozwoju odpowiadającemu występowaniu w nich „wysp krwiotwórczych”. W badaniach zastosowałam metody immunohistochemiczne na skrawkach mrożeniowych oraz na sercach immunoznakowanych metodą "whole-mount", które oceniałam odpowiednio w mikroskopie konfokalnym lub stereoskopowym. Przeprowadziłam szczegółową analizę serc płodowych w transmisyjnym mikroskopie elektronowym obserwując „wyspy krwiotwórcze”, krwinki, oraz komórki śródbłonka. Dopelnieniem badań była analiza komórek progenitorowych oraz śródbłonkowych serca płodowego w cytometrze przepływowym w oparciu o ich markery powierzchniowe.

Barwienie całych serc („whole-mount immunostaining”, tj. z pominięciem krojenia skrawków tkankowych) z zastosowaniem przeciwciała anti-CD31 (marker śródbłonka) oraz



anty-Ter119 (marker erytroblastów) pozwoliło na ocenę przestrzennego rozmieszczenia „wysp krwiotwórczych” w płodowych sercach w następujących dniach rozwoju: 11,5; 12; 12,5; 12,75; 13; 13,5; 14. Wykazałam, że w 11,5 dniu rozwoju „wyspy krwiotwórcze” występują tylko na powierzchni grzbietowej, dopiero w 12,5 dniu pojawiają się na powierzchni brzusznej. W kolejnych dniach rozwoju (12 do 12, 75) liczniej występują w bruździe międzykomorowej i blisko koniuszka serca na powierzchni brzusznej. Oba te miejsca są punktami najbardziej oddalonymi od strumienia krwi omywającej wsierdzie w komorach, a więc od potencjalnego źródła tlenu i substancji odżywczych. W 13,5- i 14-dniowych sercach płodowych wyspy zanikają na powierzchni grzbietowej, niewiele ich pozostaje na powierzchni brzusznej. Od 12 dnia można obserwować tworzenie struktur naczyńopodobnych wzrastających od wysp w głąb miokardium. W kolejnych dniach struktury te rozgałęziają się i łączą z powstającą siecią naczyń wieńcowych.

Badania immunohistochemiczne tkanki serca pozwoliły określić fenotyp komórek śródbłonna wysp jako  $CD31^+/Np1(\text{neuropilina})^+/Flk1^+$ . Komórki te nie wykazywały ekspresji  $CD41$ ,  $Gata2$  i  $Lyve1$ . Obserwacja "wysp krwiotwórczych" w transmisyjnym mikroskopie elektronowym pozwoliła uwidocznić ich ultrastrukturę. Komórki śródbłonna zawierały liczne polirybosomy, w średnim stopniu rozwiniętą siateczkę śródplazmatyczną szorstką oraz nieliczne, małe mitochondria. Jądro wykazywało cechy aktywacji, czyli zawierało głównie euchromatynę i duże jąderko. Wewnątrz „wysp krwiotwórczych” znajdowały się głównie erytroblasty. Zróżnicowana gęstość elektronowa cytoplazmy tych komórek świadczyła o różnym stopniu ich rozwoju, co potwierdziłam w badaniach immunohistochemicznych poprzez wykazanie zróżnicowanej ekspresji markerów  $Ter119$  i  $CD71$ .  $Ter119$  jest markerem występującym na erytroblastach wczesnego etapu erytropoezy, podczas gdy  $CD71$  pojawia się w trakcie dalszego różnicowania krwinek czerwonych. W "wyspach krwiotwórczych" serca obserwowałam również dwujądrowe megakariocyty, liczne płytki krwi i pojedyncze komórki o cechach niezróżnicowanej komórki mezenchymalnej. Stosując immunohistochemiczne fenotypowanie za pomocą zestawu kilku przeciwciał wykazałam, że we wnętrzu „wysp krwiotwórczych” znajdują się komórki wykazujące ekspresję markera komórek hematopoetycznych  $CD41$ . Nieliczne z nich były także  $Gata2$ -pozytywne, czyli posiadały marker niedojrzałych komórek progenitorowych hematopoezy lub były  $Fli1$ -pozytywne, czyli wykazywały ekspresję czynnika transkrypcyjnego związanego z różnicowaniem megakariocytów. Podsumowując, w wyspach wykazałam obecność komórek o fenotypach  $GATA2^+/CD41^+$ ,  $GATA2^-/CD41^+$ ,  $GATA2^+/CD71^-$ ,  $GATA2^-/CD71^+$ ,  $Fli1^+/CD71^+$ ,  $Fli1^-/CD71^+$ . Występowanie takiego zestawu komórek o różnym panelu



markerów wskazuje na obecność procesu hematopoezy, różnicowania się i dojrzewania krwinek we wnętrzu „wysp krwiotwórczych” serca.

Ponadto, oceniając serca w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, zaobserwowałam płytki krwi w różnych lokalizacjach, poza wyspami, w mezenchymie, jakby w trakcie przemieszczania się do mezenchymy otaczającej "wyspy krwiotwórcze", oraz erytroblasty kontaktujące się wypustkami cytoplazmatycznymi z komórkami śródbłonka jak i uchwycone w trakcie przechodzenia przez komórki śródbłonka naczyń. Prawdopodobnie pojedyncze, rozproszone erytroblasty występujące podnasierdziowo, nie połączone anatomicznie z "wyspami krwiotwórczymi" lub tworzącymi się naczyniami, dostawały się tam z "wysp krwiotwórczych". Wydaje się, że na wczesnym etapie rozwoju serca, kiedy nie ma jeszcze w pełni wykształconej sieci naczyń wieńcowych, a zapotrzebowanie w tlen rozwijających się komórek wzrasta, część erytroblastów przemieszcza się podnasierdziowo poza granice wysp, dostarczając sąsiadującym komórkom tlenu. Obserwowałam również makrofagi zlokalizowane podnasierdziowo, które fagocytowały erytroblasty. Makrofagi w barwieniu immunohistochemicznym wykazywały ekspresję markerów Lyve-1, CD45 i/lub CD68. Część z komórek CD45-pozytywnych wykazywała współekspresję czynnika transkrypcyjnego Fli1, którego aktywność jest konieczna dla różnicowania monocytów i makrofagów.

Wykazałam, że obszar podnasierdzia zawiera rozproszone, zlokalizowane poza wyspami komórki wykazujące ekspresję czynników transkrypcyjnych istotnych podczas hematopoezy. Niektóre z komórek występujących w sąsiedztwie wysp wykazywały ekspresję czynnika transkrypcyjnego Gata2, zaś inne, licznie obserwowane w obszarze bruzdy przedsionkowo-komorowej były Fli1-pozytywne i wykazywały współekspresję z CD31, Tie2 lub Flk1. Fli1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, którego ekspresja pojawia się nie tylko podczas hematopoezy (monocyty i megakariocyty), ale także podczas różnicowania komórek śródbłonka.

Niezwykle istotnym odkryciem było stwierdzenie obecności w sercu płodowym komórek o fenotypach uznanych za potencjalnie hemogenne. W warstwie podnasierdziowej występowały nieliczne, nie związane z wyspami komórki CD41<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>, czyli komórki wykazujące jednoczesną ekspresję markera hematopoetycznego (CD41) jak i śródbłonkowego (Flk1). W powiązaniu ze śródbłonkiem poduszeczek wsierdziowych 12,0-dniowych serc płodowych obserwowałam także liczne komórki CD41<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>, zaś w śródbłonku przedsionków znalazłam komórki o fenotypie CD41<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, czyli także charakteryzujące się współwystępowaniem markerów hematopoetycznego i śródbłonkowego.



W tym wypadku komórki te wykazywały także współekspresję czynnika transkrypcyjnego Fli1. Ponadto w 11,5-dniowych sercach zaobserwowałam w świetle przedsionków jak i w pobliżu wyścielającego je śródbłonka, a także wewnątrz niego liczne komórki CD41<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>.

Odkrycie w sercach płodowych komórek o podwójnym potencjale waskulogennym/angiogennym i hematopoetycznym przyczyniło się do wstępnej szacunkowej oceny ich występowania w sercu płodowym. Serca 12,5-dniowe trawiłam akutą a następnie barwiłam przeciwciałami anty CD41 i anty-Flk1. Analiza przeprowadzona przy użyciu cytometru FACSCalibur wykazała, że liczebność tej populacji w sercu wynosi  $2.68 \pm 0.82\%$  i jest wyższa od takiej samej populacji we krwi płodowej ( $0.18 \pm 0.82\%$ ).

Moje obserwacje w transmisyjnym mikroskopie elektronowym ukazały ultrastrukturę komórek śródbłonka wsierdzia, w bliskości którego w świetle komórek widziałam liczne dwujądrowe megakariocyty. Niektóre z nich były zakotwiczone swoimi wypustkami cytoplazmatycznymi do komórek śródbłonka, co pozwala wnioskować, że beleczki komórek serca stanowią rodzaj podtrzymania/niszy dla megakariocytów w płodowych sercach. W okolicach beleczek dochodzi do uwalniania płytek z megakariocytów. Jest to całkowicie nowatorska obserwacja.

Najważniejszymi osiągnięciami przedstawionych w zarysie badań opublikowanych w publikacji 2 są:

1. Wykazanie, że serce w okresie między 11,5 i 14 dniem rozwoju płodowego zawiera komórki o fenotypie hematopoetycznych komórek progenitorowych GATA2<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>, GATA2<sup>-</sup>/CD41<sup>+</sup>, GATA2<sup>+</sup>/CD71<sup>-</sup>, GATA2<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>, Flk1<sup>+</sup>/CD71<sup>+</sup>, Flk1<sup>-</sup>/CD71<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>, CD41<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup> oraz Flk1<sup>+</sup>/Flk1<sup>+</sup>. Szczególnie komórki zlokalizowane poza wyspami mogą być wczesnymi komórkami progenitorowymi linii hematopoetycznej i/lub śródbłonkowej.
2. Wykazanie fenotypu homogenego śródbłonka przedsionków 11,5-dniowych serc, śródbłonka poduszczek wsierdziowych 12-dniowych serc oraz śródbłonka komórek serc 13-dniowych.
3. Wykazanie współekspresji czynnika transkrypcyjnego Fli1 z CD31 i CD41 w komórkach śródbłonka o przypuszczalnym potencjale hemogennym, co może znaleźć zastosowanie w wieloznacznikowym fenotypowaniu komórek śródbłonka homogenego.
4. Oszacowanie w 12,5-dniowych sercach populacji komórek o fenotypie hemogennym na  $2.68 \pm 0.82\%$



5. Jakościowa i po raz pierwszy w literaturze przedstawiona ilościowa ocena wysp krwiotwórczych serc płodowych myszy.
6. Odkrycie, że płodowe serca są miejscem wytwarzania płytek krwi oraz że wsierdzie stanowi „niszę” dla zakotwiczonych tam megakariocytów.
7. Wykazanie, że płodowe serce jest miejscem migracji erytroblastów do podnasierdzia oraz płytek krwi do podnasierdzia i wsierdzia.
8. Wykazanie, że w płodowych sercach licznie występują podnasierdziowo zlokalizowane makrofagi, których obecność w tym miejscu prawdopodobnie ma związek z rozwojem krążenia wieńcowego.

Biorąc pod uwagę rolę jaką w rozwoju serca pełni rozwijające się nasierdzie, którego komórki przechodząc przekształcenie nabłonkowo-mezenchymalne stają się różnymi typami komórek miokardium, w tym komórkami śródbłonna naczyń wieńcowych nasunęło się przypuszczenie, że przednasierdzie myszy może zawierać komórki o potencjale hemogennym. Istnieje jedno doniesienie sugerujące, że u ptaków w obrębie przednasierdzia mogą występować hemangioblasty, jednak nie udowodniono ich potencjału hemogennego. Na podstawie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Runx1 lokalizowano komórki śródbłonna hemogennego w obrębie rozwijającego się zarodka myszy, nigdy jednak nie wykazano ich obecności w przednasierdziu. Celem kolejnych badań zawartych w pracy "**Cells with hematopoietic potential reside within mouse proepicardium**" (publikacja 3) było poszukiwanie komórek o potencjale hemogennym w przednasierdziu myszy i potwierdzenie tego potencjału *in vitro*.

Przednasierdzie jest przejściową strukturą pojawiającą się podczas rozwoju serca. Począwszy od 8,5 dnia rozwoju myszy na wysokości przegrody poprzecznej przy obu rogach zatoki żylniej rozwija się skupisko mezodermalnych komórek o kształcie kiści winogron. Począwszy od 9 dnia rozwoju myszy od przednasierdzia odrywają się grupki komórek, które dostają się do jamy osierdziowej a następnie kontaktują się z powierzchnią miokardium. Tam ulegają spłaszczeniu i tworzą wyspy nabłonka jednowarstwowego płaskiego, które rozrastają się do 11,0 dnia rozwoju pokrywają całą powierzchnię serca jako nasierdzie. W tym czasie pozostała część przednasierdzia zanika. Najbardziej swoistym i powszechnie używanym markerem rozwijającego się nasierdzia jest czynnik transkrypcyjny WT1. Jego ekspresja jest niezbędna podczas rozwoju zarodkowego oraz związana nie tylko z powstawaniem nerki. Komórki przednasierdzia, nasierdzia, podnasierdzia, oraz migrujące komórki wywodzące się z nasierdzia (EPDCs – epicardial- derived cells) wykazują ekspresję czynnika WT1.



Możliwość wyznakowania przednasierdzia pozwoliła na ocenę tę niezwykle małej struktury i opracowanie techniki jej izolacji. Z badań wcześniejszych wiadomo, że przednasierdzie posiada własną sieć naczyń krwionośnych, nie wykluczone zatem, że wśród nich znajdują się też komórki śródbłonka hemogenne.

W omawianej pracy izolowałam przednasierdzia z 9,5-dniowych płodów mysich (stadium 22-25 somitów), trawiłam je enzymatycznie, a następnie uzyskane komórki sortowałam przy użyciu sortera magnetycznego. Ponieważ celem było uzyskanie populacji komórek o właściwościach hemogennych, sort był wieloetapowy. Jako pierwszych użyłam przeciwciał monoklonalnych przeciw-CD45 i przeciw-CD71, dzieląc komórki na dwie populacje: pozytywną, czyli krwinki pochodzące z naczyń i negatywną, w której powinny znajdować się komórki śródbłonka. Kolejnym etapem było uzyskanie z populacji negatywnej dla CD45 i CD71 komórek CD31-pozytywnych, czyli komórek o fenotypie śródbłonka, zaś populacja komórek CD31-negatywnych posłużyła do izolacji komórek Flk1-pozytywnych, czyli rozwojowo wcześniejszych niż komórki śródbłonka. Komórki z poszczególnych populacji hodowałam w podłożu Methocult GF M3434 umożliwiającym wzrost kolonii hematopoetycznych komórek posiadającym taki potencjał. Po 10 dniach hodowli powstające kolonie aspirowałam mikropipetą i wykonywałam z nich rozmazy do barwień immunohistochemicznych i barwienia Giemśą. Test tworzenia kolonii wykazał, że największy potencjał hemogeny *in vitro* posiadają komórki CD31-pozytywne, co przejawia się powstawaniem pierwotnych kolonii hematopoetycznych CFU-GEMM (zawierających komórki prekursorowe wszystkich linii hematopoetycznych), a także tworzeniem kolonii o charakterze bardziej wyspecjalizowanym, CFU-GM (linia granulocytarno makrofagalna) i CFU-E (linia erytroidalna). Podobnie zróżnicowany potencjał hemogeny posiadała populacja Flk1-pozytywna, lecz CD31-negatywna. Jednak w tym wypadku liczba otrzymanych kolonii była niższa. W barwieniach Giemśą potwierdziłam hematopoetyczny charakter komórek kolonii. Ocena immunohistochemiczna komórek kolonii, które wykazywały współekspresję wielu markerów charakterystycznych dla komórek progenitorowych hematopoezy opisane zostały w publikacji. Podsumowując, wykazałam jednoznacznie, że komórki przednasierdzia o fenotypie śródbłonka oraz nie-śródbłonkowe komórki mezodermalne w warunkach *in vitro* zdolne są do tworzenia kolonii hematopoetycznych, czyli niektóre z komórek przednasierdzia posiadają potencjał hemogeny. Ponieważ przednasierdzie posiada sieć naczyń krwionośnych stosując *in situ*, tj. na skrawkach zarodków myszy barwienie mieszaniną przeciwciał anti-WT1 (jako marker przednasierdzia), anti-CD31 (jako marker komórek śródbłonka) oraz anti-Runx1 (jako marker śródbłonka hemogenne) wykazałam obecność w przednasierdziu



myszy nielicznych komórek o fenotypie śródbłonka hemogenego (CD31<sup>+</sup>/Runx1<sup>+</sup>) oraz komórek nie będących śródbłonkiem, a wykazujących ekspresję Runx1 i WT1, czyli nieśródbłonkowych komórek o prawdopodobnym potencjale hemogennym, odpowiadającym hemangioblastom. Śródbłonek hemogeny ma głównie pochodzenie tętnicze, tylko w pęcherzyku żółtkowym śródbłonek hemogeny ma udokumentowane pochodzenie żylnie. Wiadomo, że naczynia krwionośne przednasilrdzia mają pochodzenie żylnie i cechy śródbłonka niedojrzałego zatem ich potencjał hemogeny może być wyrazem plastyczności niedojrzałego jeszcze śródbłonka. Obecność w przednasilrdziu powierzchniowo zlokalizowanych komórek z ekspresją Runx1 może nie tylko wskazywać na ich hemogeny potencjał, ale także można przypuszczać, że pochodne tych komórek częściowo uczestniczą w tworzeniu "wysp krwiotwórczych" serca.

Ponieważ wczesne etapy hematopoezy znajdują się pod kontrolą określonych czynników transkrypcyjnych postanowiłam ocenić ich ekspresję w tkance przednasilrdzia. Metodą RT-PCR wykazałam ekspresję mRNA dla Runx1, Sox17, Notch1, Nkx2-5 i Gata2. Na szczególną uwagę zasługuje wykazanie obecności mRNA czynnika transkrypcyjnego Runx1, którego ekspresja jest konieczna podczas wtórnej hematopoezy płodowej i stanowi potwierdzenie moich wyników badań immunohistochemicznych na komórkach przednasilrdzia.

Ponadto, po raz pierwszy wykazałam, że komórki przednasilrdzia WT1-pozytywne wykazują też obecność czynnika transkrypcyjnego Zeb1, którego ekspresja może wskazywać na dyspozycyjność komórek do przekształcenia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT). Do tej pory zjawisko EMT zachodzące podczas rozwoju serca było opisywane w literaturze jedynie w powiązaniu z czynnikami transkrypcyjnymi Snail1/2 oraz Twist.

Najważniejszymi osiągnięciami badań opublikowanych w publikacji 3 są:

1. Wykazanie obecności w przednasilrdziu myszy komórek o fenotypie hemogennym, zarówno w obrębie śródbłonka jak i poza nim.
2. Potwierdzenie *in vitro* hemogenego potencjału komórek izolowanych z przednasilrdzia myszy.
3. Wykazanie w komórkach przednasilrdzia ekspresji mRNA dla kluczowych czynników specyfikacji i aktywności śródbłonka hemogenego.
4. Wykazanie ekspresji czynnika transkrypcyjnego Zeb1 w powierzchniowych komórkach przednasilrdzia.



Wraz z rozwojem naczyń wieńcowych w ścianie serca pojawiają się naczynia limfatyczne, odgrywające kluczową rolę w regulacji homeostazy płynu tkankowego, transporcie lipidów oraz komórek prezentujących antygeny i limfocytów z obszaru tkankowego przez naczynia do węzłów chłonnych.

Charakterystyka naczyń chłonnych oraz ich pochodzenie zostały opisane w pracy **"Morphogenesis, structure and properties of lymphatic vessels"** (publikacja 4)

Pierwsze naczynia limfatyczne podobnie jak i krwionośne oraz pierwotna hematopoeza zaobserwowane były około 100 lat temu przez Florence Sabin. Pochodzenie naczyń chłonnych początkowo wiązane było tylko z układem żylnym. Śródbłonek żył zasadniczych w miejscu ich połączenia z żyłami podobojczykowymi odpączkowując wytwarza pierwotne woreczki limfatyczne. U myszy pierwsze takie struktury powstają w 9,5-10 dniu rozwoju. Następnie pojawiają się woreczki powstające od żył śródnercza. Ich komórki proliferują i migrują do tkanek okalających woreczki i wytwarzają pierwotne sploty limfatyczne. Ten sposób powstawania naczyń chłonnych określa się jako odśrodkowy. Jednakże naczynia limfatyczne mogą powstawać niezależnie od żył, z mezenchymalnych komórek prekursorowych, w tym wypadku wzrost naczyń chłonnych odbywa się dośrodkowo. Proces limfangiogenezy jest regulowany poprzez czynniki wzrostu VEGF-C i VEGF-D, angiopoetynę i inne czynniki.

Badanie powstawania naczyń chłonnych stało się możliwe dopiero po określeniu markerów odróżniających ich komórki śródbłonka od śródbłonka wyściełającego naczynia krwionośne. Obecność glikoproteiny Lyve-1, uznawanej jako receptor dla kwasu hialuronowego oraz czynnika transkrypcyjnego Prox-1, przy jednoczesnym wykazaniu na powierzchni komórek receptora dla VEGF-R3 oraz podoplaniny pozwala na identyfikację komórek śródbłonka limfatycznego. Czynniki Prox-1 jest niezbędny dla powstawania naczyń chłonnych, gdyż jego brak podczas rozwoju (wskutek delecji u myszy transgenicznym) skutkuje nierozwinięciem się naczyń chłonnych, zaś nadekspresja tego czynnika w komórkach śródbłonka krwionośnego stymuluje transkrypcję genów swoistych dla śródbłonka naczyń limfatycznych. Używany do fenotypowania komórek śródbłonka limfatycznego marker Lyve-1 obecny jest także na powierzchni np. komórek śródbłonka naczyń krwionośnych pewnej populacji naczyń włosowatych płuc, w naczyniach rosnącego zarodka, czy pęcherzyka żółtkowego. Lyve-1 obecny jest także na powierzchni niektórych makrofagów tkankowych i odróżnienie ich od innych komórek jest możliwe dzięki współekspresji dodatkowych cząsteczek, jak choćby CD45. Receptor VEGF-R3 obecny jest na komórkach śródbłonka limfatycznego podczas rozwoju jak i dojrzałego, oraz na



powierzchni niedojrzałych, nowo powstających naczyń krwionośnych, a w miarę ich dojrzewania zanika. Początkowo podczas rozwoju zarodków myszy, VEGF-R3 ulega ekspresji w 8,5 do 12,5 dnia rozwoju w komórkach śródbłonka żyły zasadniczej. U myszy pozbawionych ekspresji genu *VEGF-R3* komórki śródbłonka naczyń chłonnych pączkują z żyły zasadniczej ale nie migrują i nie tworzą woreczków limfatycznych. Podoplanina, glikoproteina występująca na wielu typach komórek, między innymi w podocytach, pneumocytach typu I, ependymocytach, osteocytach i innych pojawia się też na powierzchni komórek śródbłonka limfatycznego wykazując ekspresję Lyve-1, Prox-1 i VEGF-R3. Charakterystyka innych cząsteczek obecnych na komórkach śródbłonka limfatycznego, takich jak neuropilina 2, efryna B2 i jej receptor oraz angiopoetyna zawarta jest w publikacji 4.

Wykorzystując wiedzę na temat możliwości immunohistochemicznego fenotypowania komórek śródbłonka naczyń chłonnych, w pracy "**Cellular phenotypes and spatio-temporal patterns of lymphatic vessel development in embryonic mouse hearts**" (publikacja 5) zbadalam fenotypy rozproszonych w sercu komórek Lyve-1-pozytywnych oraz czasowo-przestrzenny związek tych komórek z powstającymi naczyniami chłonnymi począwszy od 10,5 dnia rozwoju serca. W badaniach zastosowałam metody immunohistochemiczne na całych sercach mysich "whole-mount" oraz na skrawkach mrożeniowych. Zaobserwowałam różnice w ekspresji markerów komórek i ich czasowo-przestrzennym pojawianiu się oraz występowaniu zawiązków naczyń chłonnych na biegunach żylnym i tętnicznym serca. W 10,5-11,5 dniu rozwoju komórki Lyve-1-pozytywne były obecne w podnasierdziu bruzdy przedsionkowo-komorowej na powierzchni przeponowej serca i w drodze odpływu. W 13,0 dniu rozwoju komórek Lyve-1<sup>+</sup> było więcej i pokrywały one równomiernie powierzchnię serca, część z nich tworzyła zgrupowania komórek wykazujących ekspresję VE-kadheryny, a niektóre organizowały się w struktury podobne do tubuli. Rozproszone komórki Lyve-1<sup>+</sup> nie wykazywały markerów śródbłonkowych CD31, a tylko nieliczne posiadały ekspresję Flk-1. Oba markery, CD31 oraz Flk-1, obecne były na komórkach Lyve-1-pozytywnych tworzących ścianę powstających struktur naczyniowych, którym towarzyszyła także ekspresja Prox-1. Rozproszone w podnasierdziu komórki Lyve-1<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> wykazywały współekspresję markerów CD68, CD45, CD11b lub F4/80. Pierwsze naczynia Lyve-1-pozytywne pojawiały się w 13-dniu rozwoju płodowego na powierzchni przedsionków i w bruzdzie przedsionkowo-komorowej [biegun żylny serca]. W tym okresie naczynia takie nie występowały wzdłuż wielkich tętnic [biegun tętniczy], choć nieliczne, rozproszone komórki Lyve-1<sup>+</sup> były tam obecne. W 12.5-13 dniu rozwoju występowały liniowo ułożone komórki Prox-1-pozytywne rozpościerające się od śródpiersia na powierzchni grzbietowej przedsionków w kierunku



bruzdy przedsionkowo-komorowej, a od 13 dnia rozwoju od bruzdy przedsionkowo-komorowej dogłównie i jednocześnie na powierzchni komorowej w kierunku koniuszka. Ponadto, komórki Prox-1<sup>+</sup> lokalizowały się wzdłuż wielkich tętnic i rozpościerały się w kierunku podstawy serca. W 13 dniu rozwoju biegun naczyniowy serca zawierał naczynia Flk-1<sup>+</sup>/Prox-1<sup>+</sup>/Lyve-1<sup>-</sup> oraz rozproszone komórki Lyve-1<sup>+</sup>/Prox-1<sup>-</sup>. Zaś powierzchnia przedsionków i bruzda przedsionkowo-komorowa zawierała naczynia Lyve-1<sup>+</sup>/Prox-1<sup>-</sup> oraz Prox-1<sup>+</sup>/Lyve-1<sup>-</sup>. Nieliczne naczynia na powierzchni przedsionków i bruzdy międzykomorowej były Prox-1<sup>+</sup>/Lyve-1<sup>+</sup>-podwójnie pozytywne. W 13,5 dniu rozwoju podwójnie pozytywne naczynia znajdowały się na biegunie naczyniowych wzdłuż wielkich tętnic. Obserwacje te wskazują, że tworzenie naczyń chłonnych w sercu jest poprzedzone występowaniem i napełnianiem komórek Prox-1<sup>+</sup>/Lyve-1<sup>-</sup> oraz Prox-1<sup>-</sup>/Lyve-1<sup>+</sup> które organizując się w tubule nabywają markera Lyve-1 i Prox-1 odpowiednio, wraz z VE-kadheryną oraz Flk-1 i CD31.

Najważniejszymi osiągnięciami badań opublikowanych w publikacji 5 jest wykazanie, że:

1. Na biegunach żylnym i tętniczym serca zawiązki naczyń chłonnych rozwijają się z różnych pod względem ekspresji markerów komórek i wykazują one różny czasowo i przestrzennie sposób dojrzewania oraz różnicowania.
2. Pojawiające się podczas rozwoju serca rozproszone komórki Lyve-1-pozytywne nie wykazują ekspresji markera śródbłonkowego CD31, zaś posiadają powierzchniowo zlokalizowane antygeny makrofagalne CD68, CD45, CD11b, lub F4/80 i mogą reprezentować różne typy komórek: makrofagi, komórki mezenchymalne lub fibroblasty.
3. Nieliczne, rozproszone komórki Lyve-1<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> zlokalizowane pod nasierdziem mogą być limfangioblastami (komórkami progenitorowymi śródbłonka naczyń chłonnych).
4. Pierwsze naczynia limfatyczne Lyve-1/Prox1-pozytywne pojawiają się w sercach w 12,5-13,5 dniu rozwoju na biegunie żylnym i na biegunie tętniczym.

Oświadczam, że uzyskałam zgodę wszystkich współautorów na zamieszczenie wymienionych publikacji do Dzieła, oraz potwierdzenie mojego wkładu w przygotowaniu publikacji. Zgody oraz szczegółowe określenie wkładu każdego z autorów zawarte są w załączniku 5.



## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Poza wymienionym powyżej cyklem prac, wykazanym jako osiągnięcie naukowe, jestem autorem lub współautorem 44 publikacji, w tym 34 prac oryginalnych oraz 10 publikacji poglądowych.

W mojej pracy badawczej zajmowałam się różnorodną tematyką, wykorzystując zróżnicowane techniki badawcze. Uczestniczyłam zarówno w badaniach kilkuletnich, których wyniki opisywano w kolejnych, tematycznie powiązanych publikacjach, lub w doświadczeniach, których efektem były pojedyncze artykuły oryginalne. Do pierwszej grupy zaliczyć należy badania morfometryczno-ultrastrukturalne komórek satelitarnych mięśni po denerwacji. Były one kontynuacją prac prowadzonych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych. Następnym tematem badań były toksyny produkowane przez bakterie *Clostridium histolyticum*, w tym nie opisywana wcześniej toksyna wakuolizująca. Badania te prowadzone były pod kierunkiem prof. Gajane Martirosian i prof. Stanisława Moskalewskiego. Ponadto, cyklem prac uwieńczona jest współpraca z zespołem badawczym kierowanym przez dr hab. Małgorzatę Dobrzyńską z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego dotycząca wpływu bisfenolu skojarzonego z promieniowaniem X na komórki gonad męskich myszy. Dodatkowo, przedmiotem moich zainteresowań było wykorzystanie różnie modyfikowanych podłoży kolagenowych do hodowli keratynocytów oraz hodowle mieszków włosa, oraz modyfikowanych membran kapilarnych jako nośników komórek transplantowanych do biorców. Ponadto uczestniczyłam w badaniach charakteryzujących przednasionki myszy oraz wykorzystujących izolowane przednasionki myszy do oceny wpływu niektórych leków na angiogenezę.

Do drugiej grupy zaliczyć należy badanie ekspresji transporterów ABC we wczesnym rozwoju zarodkowym myszy, badanie żywotności komórek rąbka rogówki ludzkiej z użyciem mikroskopu konfokalnego. Uczestniczyłam w badaniu wpływu cytokin pro- i przeciwzapalnych na produkcję hialuronianu przez komórki błony maziowej *in vitro*, w badaniach wpływu N-acetylocysteiny na wydzielanie interleukiny-8, metaloproteinazy-9 i cząsteczki ICAM-1 przez hodowane komórki z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych pacjentów ze śródmiąższowymi chorobami płuc oraz w badaniach wpływu cefalosporyn na aktywność angiogenną ludzkich komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi zdrowych dawców.

Moje wieloletnie doświadczenie przy analizie materiału biologicznego w transmisyjnym mikroskopie elektronowym zaowocowało licznymi współpracami, których efektem była ocena ultrastrukturalna torebki nurse-cell *Trichinella spiralis* w siedem miesięcy



od zakażenia myszy, ocena komórek linii DU-145 poddanych działaniu skojarzonej terapii fotodynamicznej z EGF-SubA - kompleksem prowadzącym do degradacji GRP78, oraz ocena zmian indukowanych w komórkach Raji po 16 godzinach inkubacji z SKO53. Ponadto oceniałam ultrastrukturę komórek HEK2932 transfekowanych p.Ser165Phe (w genie *ELOVL1*).

Większość prac została opublikowana w recenzowanych czasopismach naukowych.

Poniżej zamieszczam omówienie najistotniejszych zagadnień zawartych w publikacjach, niewchodzących w skład cyklu stanowiącego osiągnięcie. Prace zostały pogrupowane zgodnie z tematyką poruszanych zagadnień i są oznaczone numerami nadanymi w załączniku nr 4 pt. "Wykaz dorobku naukowego".

### **Ultrastruktura komórek satelitarnych w mięśniach podanych denerwacji** [prace: IIA1, IIA3]

Komórki satelitarne (SC) przylegają do włókna mięśniowego poprzecznie prążkowanego szkieletowego i razem z włóknem otoczone są przez blaszkę podstawną. W stanie spoczynku komórki te w dojrzałych mięśniach znajdują się w fazie G0 cyklu komórkowego. Po zadziałaniu czynników stymulujących podlegają one aktywacji, wchodzi w cykl komórkowy i uczestniczą w regeneracji komórek mięśniowych. Niewielka odległość pomiędzy tymi komórkami i brak jednego charakterystycznego dla komórek satelitarnych barwienia, czyni je nierozróżnialnymi na poziomie klasycznej mikroskopii świetlnej. Zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej, ze względu na specyficzną lokalizację tych komórek pod blaszką podstawną włókna mięśniowego umożliwia ich obserwację.

Wiadomo, że denerwacja prowadzi do degeneracji i atrofii mięśni w mechanizmie nie do końca poznanym. Odnerwienie mięśni występuje nie tylko w następstwie urazów, może do niego dochodzić także w neuropatii cukrzycowej, chorobie zwyrodnieniowej dysków, neuropatii alkoholowej, niedokrwistości złośliwej, stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS), rdzeniowej atrofii mięśniowej, chorobie Charcota-Marie-Tootha, czy infekcjach wirusowych, takich jak polio. Uszkodzenie nerwów w ALS czy w rdzeniowym zaniku mięśni, przyczynia się między innymi do niewydolności oddechowej, utraty niezależności, a także śmierci.

Ponieważ denerwacja powinna być sygnałem aktywującym komórki satelitarne zbadano jej wpływ na komórki satelitarne mięśnia płaszczkowatego. Ocena morfometryczna ultrastruktury tych komórek była przeprowadzana po 7, 14 i 36 dniach po denerwacji. Wykazaliśmy, że w następstwie denerwacji dochodzi do zmniejszenia pola powierzchni przekroju komórek satelitarnych i ich jąder, objętości jądra i elementów aparatu Golgiego



oraz liczby rybosomów. Jednocześnie dochodzi do wzrostu stosunku powierzchni do objętości SC i jądra, frakcji objętościowej i liczby struktur endosomalnych/lizosomalnych oraz liczby struktur podobnych do kaweoli. Ultrastrukturalne zmiany SC w odnerwionych mięśniach silnie sugerują spadek aktywności komórek, któremu towarzyszą zwiększone procesy degradacji materiału pochodzenia endo- i / lub egzogenicznego.

Szybka utrata masy mięśniowej i siły mięśni następuje także po ich unieruchomieniu. Denerwacja i unieruchamianie stosowane jednocześnie powodują silniejsze zwyrodnienie i atrofię włókien mięśniowych, niż tylko jeden z tych czynników. Przeprowadzona w pracy ilościowa i strukturalna analiza komórek satelitarnych zwierząt poddanych unieruchomieniu po denerwacji nie byłaby możliwa bez zastosowania techniki mikroskopii elektronowej transmisyjnej. Obserwacje przeprowadzono po 7, 14 i 36 dniach unieruchomienia. W pracy wykazano, że w grupach doświadczalnych wielkość komórek satelitarnych oraz ich jąder komórkowych ulega zmniejszeniu, obniża się też liczba rybosomów, co pośrednio świadczy o spadku aktywności tych komórek. Ponadto wykazano wzrost objętości i liczebności frakcji endosomalnej/lizosomalnej co sugeruje podwyższony proces degradacji. Zmiany te występują głównie po 7 i 14 dniach unieruchomienia. We wszystkich grupach doświadczalnych zanotowano wzrost liczby struktur podobnych do kaweoli po obu stronach komórki, czyli od strony komórki mięśniowej jak i blaszki podstawnej.

### **Zastosowanie modyfikowanego kolagenu do hodowli keratynocytów ludzkich**

[prace: IID9, IID12]

Uczestniczyłam w badaniu oceny przylegania i wzrostu keratynocytów ludzkich bezpośrednio izolowanych ze skóry oraz komórek HaCaT i HeLa na chemicznie modyfikowanych podłożach kolagenowych. Płatki kolagenowe poddane były działaniu jednym z trzech czynników 0,5% roztworu EDTA, 0,1 N HCL lub 0,25% trypsyny. Proliferacja keratynocytów oceniana była testem XTT, adhezja do kolagenu była mierzona przez oszacowanie procentu przylegających komórek znakowanych  $^{51}\text{Cr}$ . Morfologia komórek oceniana była w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Stwierdzono, że podłoża utworzone z kolagenu ksenogenicznego modyfikowanego HCl lub trypsyną są dobrym rusztowaniem dla ludzkich komórek hodowanych *in vitro*. Modyfikacja kolagenu EDTA nie wpływa na stopień adhezji i proliferacji komórek. Najlepszą adhezję i proliferację komórek stwierdzono na kolagenie potraktowanym HCl. Zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej ukazało prawidłową ultrastrukturę badanych komórek i ujawniło tworzenie w części podstawnej komórek kotwiczących wypustek cytoplazmatycznych



wnikających do testowanego podłoża oraz punktowe zagęszczenia cytoplazmy pod błoną komórkową wskazujące na tworzenie się połączeń na granicy komórka i podłoże. Otrzymane wyniki stanowiły podstawę do dalszych badań interakcji ludzkich keratynocytów z ksenogenicznym kolagenem modyfikowanym HCL, który służył jako podłoże do kilkudniowej hodowli komórek. Ocena w mikroskopie elektronowym transmisyjnym wykazała obecność elementów blaszki podstawnej, zaś analiza immunohistochemiczna w miejscu kontaktu komórka-podłoże wykazała obecność białek błony podstawnej: antygeny BP-180, beta-4 integryny, lamininy 5 oraz kolagenów IV, VII, VIIc. Białka te w hodowlach prowadzonych na zmodyfikowanym kolagenie pojawiały się między 3 a 7 dniem hodowli, podczas gdy w grupie kontrolnej między 7 a 10 dniem. Uzyskane wyniki dają nadzieję na wykorzystanie ksenogenicznego, modyfikowanego kolagenu jako podłoża do hodowli keratynocytów.

#### **Hodowle mieszków włosa** [prace: IIA7, IIA9]

Kolejne prace związane były z hodowlą szczurzych mieszków włosa, w trakcie której zaobserwowano powstawanie nie opisywanych wcześniej struktur sferycznych. Przeprowadzono ich ocenę w mikroskopie świetlnym i transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Wykazano, że sferoidy składały się z kropelek tłuszczu pokrytych komórkami reagującymi z przeciwciałem monoklonalnym AE 15, znakującym białko pochewki wewnętrznej włosa. Źródłem kropelek tłuszczu były podskórne adipocyty uszkodzone podczas izolacji. W transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazano, że komórki pokrywające krople tłuszczu odpowiadają morfologicznie komórkom warstwy Henlego prawidłowych mieszków włosa. Prawdopodobnie kropelki tłuszczu penetrują pod warstwę Henlego, uczestnicząc w tworzeniu sferoidy.

Hodowle mieszków włosa posłużyły do wyjaśnienia, dlaczego keratynocyty pochewki zewnętrznej włosa (ORS) nie keratynizują *in situ*. Rozważono dwie możliwości - zahamowanie rogowacenia spowodowane kontaktem ORS z pochewką wewnętrzną lub niedostatecznym wpływem czynników sprzyjających keratynizacji. Stworzenie odpowiednich warunków hodowli wyizolowanym ze skóry, środkowym fragmentom mieszków włosa uwidocznilo, że komórki pochewki wewnętrznej wywierają hamujący wpływ na ekspresję mucyny zapobiegając keratynizacji komórek ORS *in situ*.



## **Badania toksyn *Clostridium histolyticum*** [prace:IIA6,IIA8,IIA13,IIA14]

*Clostridium histolyticum* jest Gram-dodatnią, tworzącą spory pałeczką beztlenową z rodzaju *Clostridium*, bytującą w ziemi i kale. Po raz pierwszy została ona wyizolowana przez Weinberga i Seguina z ran odniesionych przez żołnierzy podczas działań wojennych w 1916 roku. Już w 1936 roku wykazano, że podłoże hodowlane (bulion odżywczy) *Clostridium histolyticum* posiada aktywność letalną i hemolityczną. Następnie wykazano trzy aktywności: pierwsza ( $\alpha$  alfa) ma właściwości letalne i nekrotyczne, druga ( $\beta$  beta) odpowiada kolagenazie i trzecia ( $\gamma$  gamma) odpowiada proteazie aktywowanej cysteiną. Dalsze badania filtratu z hodowli bakterii wykazały, że oprócz kolagenazy znajdują się w nim inne enzymy proteolityczne, takie jak klostrypaina, elastaza i niespecyficzne peptydazy, proteinazy aminopeptydaza i żelatynaza. Toksyna letalna jest produkowana podczas logarytmicznej fazy wzrostu *Clostridium histolyticum*, po której zanika prawdopodobnie w wyniku inaktywacji przez jednocześnie produkowane enzymy. Częściowo oczyszczona toksyna letalna niszczy hodowane komórki zarodka kurczęcia i komórki beta wysepek trzustkowych.

W pierwszej z opublikowanych prac [IIA6] opisano metodę oczyszczania toksyny poprzez jej precypitację siarczanem amonu, wirowanie z zastosowaniem filtrów Amicon i dalszą chromatografię z zastosowaniem kolumn hydrofobowych. Tak oczyszczona toksyna pozbawiona jest aktywności proteolitycznej. Ustalono stężenie toksyny, które zabija 50% komórek HeLa po 24h ekspozycji. Wykazano, poprzez ocenę stanu filamentów aktynowych, aktywacji kaspaz, fragmentacji DNA i ultrastruktury komórek, że toksyna letalna zabija komórki HeLa na drodze apoptozy.

Podczas badań toksyny letalnej została odkryta cytotoksyna powodująca wakuolizację komórek HeLa, a jej aktywność przypomina toksynę wakuolizującą (VacA) *Helicobacter pylori*. Toksyna była izolowana z supernatantu *Clostridium histolyticum* (szcep ATCC 19401) po 15-18 godzinach hodowli. W celu zahamowania aktywności klostrypainy do supernatantu dodawano jej inhibitor. Izolację toksyny przeprowadzano metodą chromatografii niskociśnieniowej z wykorzystaniem kolumn wypełnionych Bio-Gel A. Aktywne formy, czyli zawierające czynnik letalny, były liofilizowane i dalej oczyszczane przy użyciu kolumn hydrofobowych wypełnionych metyl HIC medium, co pozwoliło na oddzielenie we wstępnie oczyszczonej toksynie dwóch wyraźnych podfrakcji, których aktywność biologiczna była sprawdzana na komórkach HeLa. Dzięki temu odkryto istnienie w supernatancie *Clostridium histolyticum* toksyny powodującej wakuolizację komórek HeLa. Charakterystyka nowej toksyny przeprowadzana była różnymi metodami i technikami, a jej aktywność oceniana na różnych poziomach. Do oceny zmian wywoływanych przez toksynę na poziomie



ultrastruktury komórki zastosowano mikroskopię elektronową transmisyjną. Pozwoliło to na obserwację zmiany gęstości cytoplazmy już po dwóch godzinach hodowli komórek z toksyną w dawce 1,2 mg. Tworzenie wakuoli w komórkach HeLa stwierdzano na poziomie mikroskopii świetlnej, jednak zastosowanie TEM wykazało, że w obrębie pojawiających się w czasie trwania hodowli dużych wakuoli znajdują się struktury mielino-podobne, krople lipidowe, czy mniejsze wakuole. Obserwowano zmiany w obrębie jądra komórkowego, które wykazywało większą gęstość elektronową, często heterochromatyna tworzyła wyraźną obwódkę pod otoczką jądrową, choć cytoplazma komórek nie wykazywała cech apoptozy. W miarę trwania hodowli powierzchnia jądra wykazywała pofałdowania, po 24 godzinach hodowli wiele z komórek było zdegenerowanych zaś te które przeżyły miały cytoplazmę wypełnioną bardzo dużymi wakuolami. Odkrycie toksyny wakuolizującej *Clostridium histolyticum*, spotkało się z naszym dużym zainteresowaniem, zwłaszcza w kontekście jej podobieństwa do VacA *Helicobacter pylori* [praca IIA8].

W kolejnej pracy [IIA13] porównano zdolność sześciu referencyjnych szczepów *C. histolyticum* (ATCC 6282, 8034, 17859, 17860, 19401 and 25770) do produkcji toksyn letalnej i wakuolizującej oraz enzymów. Wykazano, że produkcja toksyny wakuolizującej nie jest zależna od szczepu jednak ilość produkowanych czynników różni się pomiędzy szczepami.

Ponieważ w literaturze pojawiały się sugestie, że mikroflora przewodu pokarmowego może brać udział w patogenezie autyzmu, w kolejnej pracy [IIA14] przebadano stolec dzieci autystycznych i zdrowych na obecność laktoferyny, toksyn *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*. Podwyższony poziom laktoferyny stwierdzono w 24,4% próbek kału, wszystkie pochodziły od chłopców. Nie wykazano obecności toksyn w badanych próbkach, zaś z porównywalną częstością izolowano *Clostridium spp.* z kału chorych i zdrowych dzieci. Z kału dzieci autystycznych częściej izolowano *Clostridium perfringens*. Konieczne są dalsze, szczegółowe badania zmierzające do powiązania flory bakteryjnej z chorobami neurologicznymi.

### **Wpływ skojarzonego działania bisfenolu i promieniowania X na morfologię gonad męskich, liczebność i jakość plemników** [prace: IIA18, IIA22, IIA28]

Układ rozrodczy męski wykazuje dużą wrażliwość na działanie czynników chemicznych i fizycznych. Niektóre z nich obniżają płodność, prowadzą do utraty zarodków lub nieprawidłowego ich rozwoju, a także do powstawania nowotworów na wczesnym etapie rozwoju. Komórkami szczególnie podatnymi na wpływ czynników toksycznych są komórki



wczesnych stadiów spermatogenezy. Bisfenol A jest zaliczany do ksenoestrogenów i jest stosowany do produkcji różnych tworzyw sztucznych, z którymi w życiu codziennym mamy kontakt. Jego obecność wykazano między innymi w butelkach dla niemowląt, w zabawkach, plastrach opatrunkowych, materiałach do wypełnień dentystycznych, plastikowych pojemnikach wykorzystywanych do przechowywania wody i żywności. Stosowany był także jako przeciwutleniacz w środkach spożywczych i kosmetycznych. Bisfenol A uwalniany z tworzyw sztucznych dostaje się do organizmu człowieka głównie drogą pokarmową a także poprzez układ oddechowy i skórę. Jego obecność wykazywano w nasieniu mężczyzn. Badania na zwierzętach laboratoryjnych poddanych działaniu bisfenolu A wykazały, że związek ten działa toksycznie na gonady męskie. Zmniejsza produkcję nasienia, zwiększa częstość występowania nieprawidłowości w budowie plemników, zmniejsza ich ruchliwość oraz obniża ciężar jąder i najądrzy. Człowiek, podobnie jak na bisfenol A narażony jest także na działanie promieniowania jonizującego, którego źródłem są radioizotopy różnych pierwiastków oraz promieniowanie kosmiczne. Najbardziej wrażliwe na promieniowanie są komórki macierzyste spermatogonii i różnicujące się spermatogonia, podczas gdy spermatoocyty są mniej wrażliwe, zaś spermatoidy są niewrażliwe.

Prezentowane prace opisują wpływ bisfenolu A (5, 10 i 20 mg/kg), promieniowania X (0,05 Gy) oraz ich skojarzonego działania (5mg/kg + 0,05 Gy) na gonady męskie oraz jakość nasienia. Badania przeprowadzono na dojrzewających płciowo i dorosłych samcach myszy. Po 8 tygodniowej ekspozycji na badane czynniki sprawdzano ilość i jakość plemników jak i oceniano morfologię gonad po 1 godzinie oraz po 1, 4, 8 tygodniach od zakończenia ekspozycji. Wykazano zróżnicowany, zależny od czasu badania wpływ skojarzonego działania bisfenolu A i promieniowania X na jakość plemników.

Ocena w transmisyjnym mikroskopie elektronowym wykazała, że bardziej podatne na działanie badanych czynników są gonady zwierząt dojrzewających płciowo niż dorosłych. We wszystkich grupach obserwowano degenerujące spermatogonia i spermatoocyty 1 i 2 rzędu.

Dodatkowo ocenie zostało poddane męskie potomstwo F1, pokolenia FO poddawane wcześniej działaniu bisfenolu A, promieniowania X oraz obu w skojarzeniu. Wykazano, że ekspozycja na sam bisfenol A lub w skojarzeniu z promieniowaniem X dojrzewających samców jest bardziej szkodliwa dla ich potomstwa niż dla potomstwa samców dorosłych.



## **Modyfikowane, polipropylenowe membrany kapilarne jako nośnik komórek**

[prace: IIA2, IIA4]

Transplantacja komórek wiąże się z reakcją immunologiczną biorcy. W celu jej minimalizacji testowano jako nośnik dla komórek, wydzielających substancje biologicznie czynne membrany kapilarne propylenowe specjalnie modyfikowane poprzez silanizację. Wszczepiane podskórnie do myszy silanizowane membrany kapilarne po 2 i 4 miesiącach od implantacji otoczone były cienką warstwą fibroblastów i komórek olbrzymich, nie obserwowano w tkance biorcy stanu zapalnego.

Membrany propylenowe nie obniżają zdolności przeżycia i jakości zawartych w nich komórek *Escherichia coli* transfekowanych zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFPI), zarówno w warunkach hodowlanych jak i po krótkotrwałej implantacji podskórnej do myszy. *E. coli* nie przemieszczały się do tkanki biorcy. Wydaje się, że modyfikowane membrany kapilarne mogą służyć jako nośnik dla komórek wydzielających różne cytokiny, w przypadku ich niedostatecznej produkcji w tkankach.

## **Wykrywanie komórek macierzystych i progenitorowych w oparciu o barwienia**

**Rodaminą 123** [prace: IIA5, IID10]

Transportery ABC odpowiadają za wypompowywanie z komórek ksenobiotyków, w tym barwników rodaminy 123 (Rh123) i Hoechst 33342 (Ho). Obecność transporterów ABC cechuje komórki macierzyste i progenitorowe. Badanie dotyczyło czasowo/przestrzennej lokalizacji transporterów *Abcb1* i *Abcg2* w przed- i poimplantacyjnych zarodkach myszy. Wykrywana w zarodkach dwukomórkowych ekspresja mRNA dla *abcb1a*, *abcb1b* i *abcg2* była prawdopodobnie pochodzenia matczyne. W blastocystach i w 7-dniowych zarodkach wykrywano ekspresję *abcb1b* i *abcg2*, zaś w zarodkach 9-dniowych ekspresji *abcb1b/abcg2* towarzyszyła także ekspresja *abcb1a*. W badanym materiale nie wykryto ekspresji mRNA dla *abcb2*. Ocena fenotypu komórek zarodka pod względem aktywności transporterów ABC, czyli ocenianej w mikroskopie konfokalnym zdolności do wypompowywania rodaminy 123/Hoechst 33342 wykazała, że pierwsze komórki zdolne do aktywnego pompowania barwników pojawiają się w moruli, zaś w blastocyście cechą tą posiadają komórki węzła zarodkowego. Endoderma przednia zarodków 6-8-dniowych wykazała polarność pod względem aktywności transporterów ABC, wraz z rozpoczęciem organogenezy liczba komórek pompujących barwniki spada, co odpowiada intensywnemu różnicowaniu komórek podczas rozwoju organizmu.



Komórki macierzyste nabłonka przedniego rogówki występują w rąbku, biorąc pod uwagę zdolność komórek macierzystych do wypompowywania barwników fluorescencyjnych dokonano wizualizacji tych komórek z zastosowaniem barwienia przeciwciałem pierwszorzędowym przeciw epiligrynie (składnik błony podstawnej), a następnie przeciwciałem drugorzędowym znakowanym cyjaniną 5 lub rodaminą 123. W rąbku rogówki wykazano obecność trzech populacji komórek różniących się intensywnością barwienia rodaminą, co wskazuje na istnienie zróżnicowanych pod względem możliwości rozwojowych populacji komórek.

### **Przedniasierdzie myszy jako nowy model do badań angiogenezy *in vitro*** [prace: IIA23, IIA24, IIA26, IIA27]

Z literatury wiadomo, że proepikardium posiada własną sieć naczyń krwionośnych, jednak dopiero dokładne badania immunohistochemiczne wykazały [praca:IIA23], że komórki śródbłonka proepikardium są niedojrzałe i wykazują ekspresję zarówno wczesnych jak i późnych markerów rozwojowych tych komórek, takich jak CD31, Flk-1, Lyve-1 i Tie-2. Sieć naczyń przedniasierdzia wykazuje ciągłość ze śródbłonkiem zatoki żyłnej. Ponadto zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej uwidocznili obecność erytrocytów w świetle naczyń przedniasierdzia, wskazując na połączenie naczyń przedniasierdzia z krążeniem centralnym. W pracy wykazano także, że izolowane przedniasierdzia hodowane na kolagenie i poddane działaniu bFGF oraz dwóch izoform VEGF-A (VEGF-A120 i VEGF-A164) wykształcają, zależnie od kombinacji stosowanych czynników, różną pod względem liczby, długości, grubości i rozgałęzień liczbę tubuli naczyniowych. Komórki śródbłonka tych nowo tworzących się naczyń wykazały różny poziom ekspresji mRNA dla Notch1 i jego ligandu Dll4. Obie cząsteczki są istotne dla prawidłowej angiogenezy. Pod wpływem stymulacji mieszaniny bFGF/VEGF-A164 powstające komórki śródbłonka, nabywają ekspresję antygeny Lyve-1, charakterystycznego dla naczyń chłonnych. Dzięki wykazaniu, że izolowane przedniasierdzia pod wpływem czynników wzrostu tworzą wypustki naczyniowe pozyskano nowy model do badania angiogenezy [praca:IIA24]. Model ten został wykorzystany do badania wpływu sulodeksydu (SDX) i pentoxyfiliny (PTX) na angiogenezę [prace: IIA26, IIA27]. Oba leki stosowane są w chorobach sercowo-naczyniowych jednak ich wpływ na komórki śródbłonka nie został jeszcze dobrze poznany.

Sulodeksyd (SDX) jest lekiem przeciwzakrzepowym, zaliczanym do grupy pochodnych heparyny (mieszanina siarczanów heparanu i dermatanu). W chorobach sercowo-naczyniowych jest on używany jako czynnik przeciwzapalny i ochronny dla komórek



śródbłonka. W pracy zbadano wpływ leku na angiogenezę oraz na ekspresję mRNA dla specyficznych białek angiogenezy (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, bFGF, IGF-1, Dll4 i Notch-1) w komórkach powstających tubuli naczyniowych z eksplantów przednasilka i dodatkowo w hodowlach komórek śródbłonka linii komórkowej C166. Sulodeksyd dodawany był do hodowli wraz z mieszaniną czynników wzrostu: bFGF/VEGF-A120/VEGF-A164. Liczba i morfologia tubuli naczyniowych oceniana była w mikroskopie konfokalnym po wyznaczeniu komórek śródbłonka przeciwciałem anti-CD31. Chociaż w linii komórkowej C166 nie wykazano wpływu sulodeksydu na tworzenie tubuli naczyniowych i ekspresję mRNA, to w hodowlach eksplantów zaobserwowano zmniejszenie pod wpływem SDX liczby tubuli naczyniowych i poziomu mRNA dla DLL4 i Notch-1, przez co można wnioskować, że SDX osłabia angiogenezę.

Pentoksyfilina jest niespecyficznym inhibitorem fosfodiesterazy cAMP stosowanym w leczeniu zaburzeń krążenia obwodowego. Dokładny wpływ tego leku na komórki śródbłonka nie został jeszcze poznany. Stosując analogiczny do powyższego układ doświadczalny wykazano, że pentoksyfilina mimo że nie wpływa na angiogenezę komórek linii komórkowej C166, to jednak w przednasilkowym modelu angiogenezy osłabia tworzenie tubuli naczyniowych i także obniża ekspresję mRNA dla Dll4 i Notch-1, cząsteczek powierzchniowych istotnych dla tworzenia tubuli naczyniowych.

### **Limfangiogeneza w sercu** [praca: IIA19]

Praca stanowi podsumowanie wiedzy na temat rozwoju naczyń chłonnych w sercu myszy podczas kilkuletnich nad nimi badań. W rozwoju prenatalnym występowanie naczyń chłonnych ograniczone jest jedynie do podnasilka, po urodzeniu naczynia zaczynają wzrost w kierunku śródnasilka jednak nie rozpościerają się przez całą jego grubość. Mniej licznie naczynia limfatyczne występują przy koniuszku serca niż przy jego podstawie, gdzie układają się preferencyjnie wokół gałęzi tętnic wieńcowych i żył. Na podstawie specyficznych barwień immunohistochemicznych wykazano, że z serca chłonka odprowadzana jest przez dwa naczynia zbiorcze. Jedno stanowi odprowadzenie z komór prawej i lewej i przebiega wzdłuż żyły stożkowej biegnąc w górę po lewej stronie pnia płucnego do najbliższego węzła chłonnego (pod łukiem aorty, w pobliżu tchawicy). Drugie naczynie zbiorcze przebiega po powierzchni przeponowej wzdłuż lewej żyły serca, a następnie na powierzchni zatoki wieńcowej oraz lewego przedsionka kierując się do węzłów chłonnych zlokalizowanych wokół tchawicy.



### **Modulujący wpływ cytokin i leków na aktywność komórek** [prace: IIA10, IIA11, IIA12]

N-acetylocysteina wykazuje właściwości antyoksydacyjne, mukolityczne i przeciwzapalne. Znajduje ona zastosowanie w leczeniu schorzeń płuc. Bezpośredni wpływ N-acetylocysteiny na komórki popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) pacjentów ze śródmiąższowymi chorobami płuc nie był badany. Komórki BAL hodowano w mediach zawierających różne stężenia N-acetylocysteiny. Testem ELISA oceniano ekspresję IL-8, MMP-9 oraz na ICAM-1. Wykazano zależny od dawki hamujący wpływ NAC na uwalnianie przez makrofagi i limfocyty IL-8 i MMP-9 i produkcję ICAM pacjentów z sarkoidozą i samoistnym włóknieniem płuc. Ponieważ czynniki te odgrywają rolę w etiopatogenezie śródmiąższowych chorób płuc wydaje się korzystnym terapeutyczne użycie NAC u tych pacjentów [praca:IIA12].

Oceniano modyfikujący wpływ niektórych cefalosporyn na angiogenezę i odporność komórkową gospodarza. Komórki jednojądrzaste pochodzące z krwi zdrowych dawców podawane były podskórnie myszom Balb/c, a następnie po trzech dniach przeprowadzano podskórną iniekcję cefalosporyn w różnych dawkach w przeliczeniu na masę ciała. W teście podskórnym angiogenezy wykazano zróżnicowany wpływ antybiotyków na tworzenie nowych naczyń. Cefradyna, ceftriakson, cefsulodyna hamują angiogenezę, cefoperazon nie ma wpływu na to zjawisko, zaś cefuroksym i ceftazydim wzmacniają neowaskularyzację [praca:IIA11].

W kolejnej pracy badano wpływ cytokin pro- i przeciwzapalnych na produkcję hialuronianu przez komórki izolowanych błon maziowych. Wykazano, że wszystkie oceniane cytokiny (IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-4) mają wpływ stymulujący na produkcję kwasu hialuronowego, przy czym najwyższy efekt uzyskano dla TNF- $\alpha$  [praca:IIA10].

### **Transmisyjna mikroskopia elektronowa - metoda wspomagająca badania różnokierunkowe**

Moje wieloletnie doświadczenie w dziedzinie transmisyjnej mikroskopii elektronowej umożliwiło mi współdziałanie w różnych badaniach, w których technika ta była ważną metodą dopełniającą.

Larwy L<sub>1</sub> *Trichinella spiralis*, aby przeżyć w organizmie żywiciela muszą dokonać zmiany metabolizmu i ultrastruktury jego komórek. Zmieniony fragment komórki mięśniowej, tzw. "nurse cell" wytwarza specyficzne mikrośrodowisko umożliwiające larwie przeżycie przez długi czas. Przeprowadzono ultrastrukturalną ocenę stanu i funkcjonowania



kompleksu "nurse-cell" i larwy podczas długotrwałej inwazji. Po 7 miesiącach od zakażenia, struktura "nurse-cell" pozostaje niezmienną, w pełni zachowany jest kontakt pomiędzy larwą i komórką mięśniową żywiciela [praca: IID11]

W wielu liniach nowotworowych nadekspresji ulega, powiązane z siateczką śródplazmatyczną szorstką (ER), białko chaperonowe GRP78 (glukose-regulated protein 78), a jego ekspresja wiąże się z inwazją i metastazą wielu ludzkich guzów. Ponadto, w wyniku terapii przeciwnowotworowych, takich jak terapia fotodynamiczna (PDT), indukujących stres siateczki śródplazmatycznej szorstkiej dochodzi do wzrostu ekspresji mRNA i białka dla GRP78, co osłabia działanie terapii. Badania przeprowadzono na komórkach dwóch linii: raka płuc SW-900 (podatna na apoptozę) oraz raka prostaty DU-145 (oporna na apoptozę), które poddano skojarzonemu działaniu PDT oraz EGF-SubA - kompleksu prowadzącego do degradacji GRP78, dzięki czemu komórki stają się wrażliwe na PDT. W pracy wykazano, że skojarzona terapia prowadzi do indukcji białek powiązanych z ER i włączających ścieżkę apoptozy. Wykazano aktywację kaspaz, zmiany w błonie mitochondrialnej, jednak nie zaobserwowano fragmentacji DNA oraz przemieszczania się fosfatydyloseryny do warstwy zewnętrznej błony komórkowej. Skojarzona terapia wykazała skuteczność w stosunku do komórek rakowych, jednak nie wykazała, że komórki giną na drodze apoptozy. Na tym etapie badań zastosowano transmisyjną mikroskopię elektronową. Komórki linii DU-145 poddane terapii wykazywały różny stopień wakuolizacji, obserwowaliśmy liczne małe lub nieliczne duże wakuole, a także komórki, których cytoplazmę wypełniała jedna bardzo duża wakuola. Duże wakuole były puste, zaś małe niejednokrotnie zawierały materiał homogenny, sugerujący zawartość lipidową. Niektóre z wakuoli wykazywały ciągłość z ER. Obserwowałam tylko w niektórych komórkach początki autofagii. Zatem terapia skojarzona wyzwała atypową, nieapoptotyczną śmierć komórek [praca: IIA16].

Tioredoksyna (Trx) i reduktaza tioredoksyny (TrxR) utrzymują homeostazę tiolową i pełnią cytoprotekcyjną rolę w komórkach nowotworowych. Wykazano, że zastosowanie peptydomimetyku SKO53 działającego na układ białek Trx-TrxR indukuje stres oksydacyjny i w badaniach na myszach wykazuje właściwości przeciwnowotworowe. W pracy wykazano, że SKO53 indukuje apoptozę w komórkach Raji powiązaną z aktywacją stresu siateczki śródplazmatycznej szorstkiej i indukcją odpowiedzi na niesfałdowane białka. Transmisyjna mikroskopia elektronowa została wykorzystana do obserwacji zmian indukowanych w komórkach Raji po 16 godzinach inkubacji z SKO53. Wygląd komórek potwierdził występowanie apoptozy, jądra komórkowe były pofragmentowane z widocznym, obwodowym zagęszczeniem chromatyny. W cytoplazmie obserwowaliśmy też liczne,



zróznicowane pod względem wielkości wakuole, będące często rozszerzeniami przestrzeni okołojądrowej [praca: IIA21].

W pracy przedstawiającej dwa przypadki kliniczne dzieci z genodermatozą łagodną, hipomielinizacją, spastycznością i cechami dysmorficznymi stosując sekwencjonowanie całogenomowe opisano nową mutację w genie dla elongazy *ELOVL1* p.Ser165Phe. Efekt mutacji sprawdzany był w komórkach HEK2932 transfekowanych p.Ser165Phe oraz w hodowanych fibroblastach pacjentów, wykazując obniżoną ilość kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach. Ocena ultrastrukturalna transfekowanych komórek HEK2932 oraz fibroblastów pacjentów nie wykazała obecności kropli lipidowych w żadnej z grup komórkowych [praca: IIA25].

### **Podsumowanie osiągnięć naukowo - badawczych**

Jestem autorem lub współautorem 49 publikacji, w tym 37 prac oryginalnych oraz 12 publikacji poglądowych. Dodatkowo dwie publikacje oryginalne pełnotekstowe opublikowane są w suplementach czasopism. Informacje dotyczące aktywności dydaktycznej zawarte są w załączniku nr 4 pt. „Wykaz dorobku naukowego”.

#### **Prace jako pierwszy lub korespondencyjny autor**

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
<b>Oryginalne prace twórcze</b>	7	4	15,905	175
<b>Artykuły przeglądowe</b>	1		1,275	20
<b>Łącznie</b>	8	4	17,180	195

#### **Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.**

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
<b>Oryginalne prace twórcze</b>		5	0	29
<b>Artykuły przeglądowe</b>				
<b>Łącznie</b>		5	0	29



### Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	28	4	70,034	707
Artykuły przeglądowe	6	6	4,418	169
<b>Łącznie</b>	<b>34</b>	<b>10</b>	<b>74,452</b>	<b>876</b>

### Publikacje ogółem

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	ImpactFactor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	28	9	70,034	736
Artykuły przeglądowe	6	6	4,418	169
<b>Łącznie</b>	<b>34</b>	<b>15</b>	<b>74,452</b>	<b>905</b>

1. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (Web): **191** (bez autocytowań)
2. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (Web): **8**
3. Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **9,361**

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o pozostałych osiągnięciach habilitanta (m.in. dydaktycznych, uzyskanych nagrodach, popularyzacji nauki) zostały zamieszczone w załączniku nr 4. pt „Wykaz dorobku naukowego”.

Obecnie zaangażowana jestem w realizację dwóch projektów badawczych: Konsorcjum ERA-NET Belgium; France; Germany; Netherlands; Poland; Spain. LYMIT-DIS Targeted LYmphatic and Microvessel Treatments in metabolic-DISEase HFpEF oraz STRATEGMED2/260807/14/NCBR/2015. Ponadto sprawuję opiekę naukową nad minigrantem studenckim [1M15/NM1/18].

Współpracuję z Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego w zakresie oceny zmian w plemnikach i gonadach myszy db/db, uznanego zwierzęcego modelu zespołu metabolicznego. Ponadto, współpracuję naukowo z Kliniką Leczenia Bezpłodności InviMed – uczestnicząc w realizacji projektu związanego z wpływem defenzyny HNP1-3 na plemniki ludzkie.

28.12.2018 