

Anna Hyc

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Centrum Biostruktury

Warszawski Uniwersytet Medyczny

AUTOREFERAT

Warszawa, 2018

1. Imię i nazwisko: Anna Hyc

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- 1978-1985 studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Praca magisterska pt. „Otrzymywanie i charakterystyka komórek jednojądrzastych krwi obwodowej owcy” wykonana pod kierunkiem profesor Krystyny Izdebskiej-Szymony w Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- 1985 magister biologii, specjalność biologia ogólna, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii
- 1998 doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, nadany przez Radę Naukową Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie, na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: Przeszczepy syngenicznych i allogenicznych chondrocytów do ubytków w chrząstce powierzchni stawowej szczurów. Obrona z wyróżnieniem.
Promotor: prof. dr hab. med. Stanisław Moskalewski; recenzenci: prof. dr hab. med. Ewa Skopińska-Różewska; prof. dr hab. med. Anna Goćławska

3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 1985-1987 Zakład Immunologii Doświadczalnej, Instytut Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie, biolog
- 1987-2002 Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie, biolog
- od 2002 Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, adiunkt

Rola cytokin w utrzymaniu homeostazy błony maziowej

1. **Hyc A [autor korespondencyjny]**, Iwan A, Moskalewski S, 2012: „Budowa i czynność prawidłowej błony maziowej”, *Reumatologia*, 50: 501-506. **MNiSW: 5**
2. **Hyc A**, Osiecka-Iwan A, Dziunycz P, Moskalewski S, 2007: “Preparation of rat synovial membrane for studies of cytokine secretion” *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45: 57-60. **IF: 0,886; MNiSW: 13**
3. **Hyc A**, Osiecka-Iwan A, Niderla-Bielińska J, Jankowska-Steifer E, Moskalewski S, 2009:” Pro- and anti-inflammatory cytokines increase hyaluronan production by rat synovial membrane in vitro”, *International Journal of Molecular Medicine*, 24: 579-585. **IF: 1,98; MNiSW: 27**
4. **Hyc A**, Osiecka-Iwan A, Niderla-Bielińska J, Moskalewski S, 2011: ”Influence of LPS, TNF, TGF-β1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated in vitro”, *International Journal of Molecular Medicine* 27: 127-137. **IF: 1,573; MNiSW: 25**
5. Moskalewski S, **Hyc A [autor korespondencyjny]**, Jankowska-Steifer E, Osiecka-Iwan A, 2013: „ Formation of synovial joints and articular cartilage” *Folia Morphologica (Warszawa)*, 72: 181-7. **IF: 0,524; MNiSW: 15**
6. **Hyc A [autor korespondencyjny]**, Moskalewski S, Osiecka-Iwan A, 2016: “Influence of cartilage interstitial fluid on the mRNA levels of matrix proteins, cytokines, metalloproteases and their inhibitors in synovial membrane”, *International Journal of Molecular Medicine*, 38: 937-942. **IF: 2,341; MNiSW: 20**
7. Osiecka-Iwan A, Moskalewski S, **Hyc A [autor korespondencyjny]**, 2016: “Influence of IGF1, TGFβ1, bFGF and G-CSF/M-CSF on the mRNA levels of selected matrix proteins, cytokines, metalloproteinase 3 and TIMP1 in rat synovial membrane cells”, *Folia Histochemica et Cytobiologica* 54:159-165. **IF: 1,389; MNiSW: 15**

RAZEM IF: 8, 693 MINSW: 120

Błona maziowa (BM) jest wysoce wyspecjalizowaną strukturą, która bierze udział w produkcji i resorpcji płynu stawowego oraz w odżywianiu i smarowaniu chrząstki stawowej. Zbudowana jest z bogato unaczynionej tkanki łącznej wysłanej od strony jamy stawowej komórkami, nazywanymi synowiocytami, które tworzą na jej powierzchni warstwę wyściółkową - w piśmiennictwie anglojęzycznym określaną jako synovial lining lub synovial intima. Warstwa tkanki łącznej tworząca warstwę podwyściółkową, w zależności od budowy, determinuje określenie danego odcinka BM jako błony typu siateczkowego, typu tłuszczowego lub typu włóknistego. Błona maziowa typu siateczkowego charakteryzuje się grubą wyściółką leżącą na bogato unaczynionej tkance łącznej luźnej. Błona typu tłuszczowego zawiera jedną warstwę synowiocytów położonych na tkance tłuszczowej, a błona typu włóknistego ma stosunkowo cienką warstwę wyściółki przylegającą bezpośrednio do zbitej warstwy włókien kolagenowych. Powierzchnia BM tworzy fałdy i kosmki wnikające w głąb jamy stawowej. Synowocyty dzielą się na dwa typy: makrofagi, czyli komórki typu A, i fibroblasty, czyli komórki typu B.

Synowocyty typu A są makrofagami tkankowymi i wykazują ekspresję cząsteczek charakterystycznych dla tych komórek. Są to cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy II, receptor CD14 wiążący LPS, a także receptor CD68 wiążący lipoproteiny o niskiej gęstości, receptory dla fragmentu Fc przeciwciał i dla składnika C3b dopełniacza. Uważa się, że prekursorzy synowiocytów typu A docierają do BM ze szpiku drogą naczyń krwionośnych i prawdopodobnie nie ulegają podziałom w jej obrębie, a ich liczba w chorobach zapalnych stawów zwiększa się w wyniku dodatkowej rekrutacji. Synowocyty typu A są okrągłe, leżą w wyższej warstwie wyściółki i niejednokrotnie wystają do jamy stawowej, w stanach patologicznych mogą być zaangażowane w niszczenie chrząstki i degradację kolagenu. Rola synowiocytów typu A polega na absorpcji i degradacji pozakomórkowych składników i resztek z jamy stawowej, debris komórkowego oraz mikroorganizmów. Wydajnością fagocytozy dorównują makrofagom otrzewnowym, a niekiedy nawet znacznie je przewyższają. Zjawisko to może być adaptacją do specyficznych uwarunkowań panujących w stawach, ponieważ usuwanie debris komórkowego i resztek z płynu stawowego jest niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania. Synowocyty typu A występują również w prawidłowym płynie stawowym.

Synowocyty typu B są zlokalizowane poniżej synowiocytów typu A, bezpośrednio na warstwie podwyściółkowej. Różnią się od występujących w niej fibroblastów bardziej zasadochłonną cytoplazmą, większymi jądrami, a także większą liczbą wakuoli. Cechą charakterystyczną synowiocytów typu B są unikatowe wypustki cytoplazmatyczne, nazwane

dendrytycznymi z uwagi na liczne rozgałęzienia. Wypustki skierowane są ku powierzchni BM i przebiegają w różnych kierunkach, również równoległe do powierzchni błony, zachodzą na siebie i tworzą splot. Prawdopodobnie za pośrednictwem wypustek komórki kontrolują skład płynu stawowego. Synowioocyty typu B produkują składniki macierzy międzykomórkowej, takie jak kolagen typu III, IV, V i VI, fibronektynę, proteoglikany, glikozaminoglikany, lamininę i entaktynę (nidogen). Niektóre z tych białek stanowią charakterystyczne składniki błony podstawnej, nie wytwarzają jednak ciągłej warstwy, pomimo że są zlokalizowane głównie od strony podstawnej synowioocytów B. Komórki B są także głównym źródłem cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) i ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Za adhezję pomiędzy nimi odpowiada kadheryna 11. Synowioocyty typu B wykazują ekspresję białek szoku cieplnego chroniących je przed nieodwracalnymi uszkodzeniami i uczestniczących w odpowiedzi na stres wywołany naprężeniem. Wykazują też wysoką aktywność dehydrogenazy urydynodifosfoglukozy, enzymu związanego z syntezą kwasu hialuronowego (HA), ponieważ produkują i wydzielają do macierzy międzykomórkowej i do płynu stawowego kwas hialuronowy - główny składnik płynu stawowego odpowiadający za lepkość.

Kwas hialuronowy wywiera wielorakie efekty biologiczne, takie jak: hamowanie syntezy prostaglandyny E₂ (PGE₂) i uwalnianie kwasu arachidonowego w stymulowanych interleukiną 1 (IL-1) fibroblastach, supresja migracji i fagocytozy oraz uwalnianie enzymów przez leukocyty, supresja indukowanej przez cytokiny degradacji macierzy chrzęstnej, zmniejszenie bólu stawów poprzez maskowanie zakończeń nerwowych. W płynie stawowym, oprócz nadania mu odpowiedniej lepkości, HA zapobiega jego ucieczce podczas zginania i obciążania, w wyniku których zwiększa się ciśnienie w stawie. Chociaż BM stanowi strukturę nieszczelną, zawierającą pory o średnicy 1 μm między synowioocytami, jest wystarczająca do utrzymania prawidłowej jakości płynu stawowego. Budowa macierzy międzykomórkowej w dużym stopniu odpowiada za opór BM przeciw ucieczce wody z jamy stawowej. Opór ten zależy od stężenia glikozaminoglikanów, proteoglikanów i glikoprotein pomiędzy włóknami kolagenowymi, ponieważ płyn przedostaje się przez wąskie przestrzenie między cząsteczkami. BM stawia również opór ucieczce HA z płynu stawowego. Podczas nacisku HA akumuluje się na powierzchni BM, tworząc warstwę buforową. Zmniejszenie stężenia lub ciężaru cząsteczkowego HA zaburza te procesy i powoduje zwiększoną ucieczkę HA z jamy stawowej. Stężenie HA w płynie stawowym człowieka wynosi ok. 1-4 mg/ml, przy czym wyższe wartości obserwowano u badanych poniżej 40. roku życia. Synowioocyty B wytwarzają także lubrycynę, O-glikozylowane białko o masie ok. 220 kDa, produkt genu

PRG4 (proteoglikan 4). Chondrocyty warstwy powierzchniowej chrząstki stawowej również wykazują ekspresję tego genu i produkują białko warstwy powierzchniowej - SZP (superficial zone protein) o masie 345 kDa . Różnice te są wynikiem modyfikacji posttranslacyjnych (głównie O-glikozylacji). Obydwa produkty genu PRG4 występują w płynie stawowym w stężeniu 35-240 µg/ml. Odpowiadają za smarowanie graniczne, zjawisko polegające na wytworzeniu w wyniku adsorpcji do powierzchni chrząstki stawowej warstwy granicznej, oddzielającej od siebie elementy trące.

Dokładne poznanie budowy i funkcji prawidłowej BM umożliwia porównanie właściwie funkcjonującego narządu do zmienionych patologicznie błon maziowych, pochodzących od pacjentów z chorobami zapalnymi stawów, takimi jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) i osteoartroza (OA). Morfologię i funkcjonowanie błony maziowej opisałam w publikacji poglądowej „**Budowa i czynność prawidłowej błony maziowej. Morphology and function of normal synovial membrane**” (praca nr 1).

Celem następnej pracy pt. ” **Preparation of rat synovial membrane for studies of cytokine secretion**” (praca nr 2) było opracowanie metody badania wpływu cytokin na błonę maziową w hodowli organotypowej *in vitro* i jej odpowiedzi, jako całego organu. Błona maziowa zawiera dwa typy synowocytów, których czynnościowa charakterystyka zwykle przeprowadzana była w oddzielnych hodowlach komórek A lub B. Ale obydwa rodzaje komórek produkują podobny profil cytokin i wpływają na siebie wzajemnie, dlatego ich wspólna odpowiedź różni się prawdopodobnie od odpowiedzi konkretnego typu synowocytów i nie jest także prostą sumą odpowiedzi obydwóch rodzajów komórek hodowanych osobno. Ponadto błona maziowa zawiera również inne komórki tkanki łącznej, i ponieważ jest to tkanka bogato unaczyniona, komórki śródbłonka. Te komórki także mogą produkować cytokiny i wpływać na odpowiedź błony maziowej na stymulację.

Pierwszym etapem pracy było opracowanie metody pozyskania błony maziowej, jako całego, nieuszkodzonego organu ze stawu kolanowego szczura. BM była wycinana wraz z rzepką, więzadłem rzepki i warstwą włóknistą torebki stawowej. Następnie otaczające tkanki były usuwane, a błona maziowa była umieszczana w pożywce hodowlanej nie zawierającej surowicy, w naczyniu hodowlanym. W pożywce błona maziowa zawijała się eksponując wyściółkę. Błony były hodowane na wolnoobrotowej wytrząsarce przez 4, 24, i 48h w 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Po inkubacji błony maziowe były ekstrahowane na lodzie w buforze polecanym do ekstrakcji białek błonowych (CHAPS 1% w/v, NaCl 150 mM, TRIS 50 mM, EDTA 5 mM, fluorek fenylo-metylosulfonowy (PMSF) 1 mM, pH=7.8), przez 30 min.

W pierwszym eksperymencie porównywałam testami ELISA stężenie interleukiny-1 α (IL-1 α) w lizacie z błon maziowych oraz stężenie interleukiny-6 (IL-6) w supernatancie z hodowli błon maziowych pochodzących od tego samego osobnika po 4h inkubacji. Analiza statystyczna wykazała brak różnic dla takich wyników (stężenie IL-1 α 42 \pm 6 pg/ml i 34 \pm 14 pg/ml, IL-6 212 \pm 50 pg/ml i 190 \pm 43 pg/ml). Zatem uznałam, że proces pozyskiwania błon maziowych jest powtarzalny, a ich jakość wystarczająca do badania odpowiedzi błon maziowych na stymulację.

W drugim eksperymencie - jedna z błon maziowych tego samego dawcy poddawana była stymulacji 10 μ g/ml LPS (lipopolisacharyd), a druga służyła jako kontrola. Badałam, podobnie jak poprzednio, stężenie IL-1 α w lizatach z BM, i stężenie IL-6 w supernatantach z hodowli po 4h, 24h i 48h inkubacji. Po inkubacji część błon maziowych była utrwalona i zostały wykonane preparaty histologiczne. Błony maziowe silnie odpowiadały na stymulację LPS po 4h i po 24h inkubacji. Po 4h inkubacji stężenie IL-1 α wynosiło 36 \pm 10 pg/ml dla kontrolnych BM, a 376 \pm 4 pg/ml dla BM po LPS, a IL-6 186 \pm 8 pg/ml dla kontroli i 1404 \pm 45 pg/ml dla BM po LPS. Po 24h inkubacji stężenie IL-1 α wynosiło 45 \pm 6 pg/ml w kontroli i 1031 \pm 16 pg/ml po LPS, a stężenie IL-6 wynosiło 449 \pm 104 pg/ml dla kontroli, a 2581 \pm 62 pg/ml dla błon maziowych stymulowanych LPS. Na preparatach histologicznych komórki błon maziowych inkubowanych 4h i 24 h są prawidłowe. Natomiast po 48h inkubacji produkcja obydwóch badanych cytokin dramatycznie spadła, czemu towarzyszyły morfologiczne zmiany w błonie maziowej i śmierć komórek spowodowana przypuszczalnie brakiem surowicy w pożywce hodowlanej. Dodanie surowicy powodowało, niestety, silną stymulację komórek błony maziowej (prawdopodobnie ze względu na obecność śladowej ilości endotoksyny) i maskowało efekt wywierany przez LPS.

Dotychczas badania reakcji błon maziowych na stymulację *in vitro* były ograniczone do badań materiału pozyskanego od pacjentów z RZS lub od szczurów z adiuwantowym zapaleniem stawów. W tej pracy po raz pierwszy została przedstawiona metoda hodowania prawidłowej błony maziowej jako całego organu, a także zdolność komórek hodowanej błony maziowej do odpowiedzi produkcją cytokin na stymulację LPS.

Celem kolejnej pracy pt. „**Pro- and anti-inflammatory cytokines increase hyaluronan production by rat synovial membrane *in vitro***” (praca nr 3) była ocena produkcji kwasu hialuronowego przez szczurze błony maziowe inkubowane z prozapalnymi (IL-1 β , czynnikiem martwicy nowotworów (tumor necrosis factor TNF), interferonem- γ (IFN- γ) i antyzapalnymi cytokinami (transformującym czynnikiem wzrostu- β 1 (TGF- β 1), IL-4).

Za syntezę HA odpowiadają syntazy kwasu hialuronowego (HAS). W BM wyróżnia się trzy typy HAS, kodowane przez trzy różne geny: HAS1, HAS2 i HAS3. Syntazy HAS1 i HAS2 odpowiadają za produkcję wysokocząsteczkowego HA o masie ok. 2×10^6 Da, natomiast HAS3 za syntezę HA o masie 2×10^5 Da. Kwas hialuronowy jest syntetyzowany po wewnętrznej stronie błony komórkowej przez połączoną z błoną syntazę. Cytoplazmatyczna pętla HAS katalizuje naprzemienne dodawanie cukrów do wewnętrznego, rosnącego końca łańcucha hialuronianu, podczas gdy przeciwny koniec jest w sposób ciągły wyciskany do przestrzeni międzykomórkowej przez kanał utworzony przez domeny transbłonowe. Ten unikalny fizjologiczny proces powoduje, że synteza i wydzielanie HA są ze sobą ściśle powiązane, nie występują pęcherzyki zapasowe, a wzrost wydzielania HA jest bezpośrednią konsekwencją jego syntezy przez HAS. Regulacja wydzielania HA może zatem zachodzić wyłącznie w wyniku zmiany ekspresji lub aktywności (fosforylacji) HAS.

Istnieje stosunkowo mało danych na temat katabolizmu HA obecnego w płynie stawowym. Uważa się, że jest on, po fragmentacji, usuwany przez układ naczyń limfatycznych i krwionośnych, a także, że synowioocyty typu A absorbują strawiony HA. Degradacja HA jest katalizowana przez hialuronidazy; u człowieka występuje ich pięć, ale w BM wykryto tylko HYAL1, HYAL2 i HYAL3. HYAL1 występuje w lizosomach, działa w kwaśnym pH, trawi HA do tetrasacharydów. HYAL2, również aktywna w środowisku kwaśnym, jest związana z błoną komórkową łącznikiem glikofosfatydyloinozytolowym (GPI). Wysokocząsteczkowy HA przyłącza się do komórek (np. do chondrocytów, makrofagów) poprzez HYAL2 i CD44, obecną na komórkach hialadherynę, jest endocytowany i cięty na fragmenty o masie ok. 20 kDa (50 disacharydowych podjednostek). Fragmenty te dostają się do lizosomów, w których działa HYAL1, degradująca je do tetrasacharydów, a następnie dwie egzoglikozydazy - do monosacharydów. O roli HYAL3 w degradacji HA w płynie stawowym wiadomo niewiele, ale podobnie jak wyżej opisane może działać wyłącznie w kwaśnym pH. Chondrocyty i synowioocyty wykazują także ekspresję hialuronidazy aktywnej w neutralnym pH. Ten enzym może mieć istotne znaczenie dla fizjologii stawów, obojętna hialuronidaza jest bowiem zdolna do aktywności w płynie stawowym i może być odpowiedzialna za fragmentację obecnego w nim HA. Ponieważ niskocząsteczkowy HA ma inne właściwości niż wysokocząsteczkowy, np. silnie pobudza angiogenezę i produkcję cytokin prozapalnych, może więc mieć udział w patogenezie chorób zapalnych stawów.

Dlatego też, następnym celem tej pracy była ocena ekspresji syntaz kwasu hialuronowego i aktywności neutralnej hialuronidazy w supernatancie z nad hodowli błon

maziowych, aby stwierdzić czy HA ulega degradacji w hodowlach błon stymulowanych cytokinami.

Błony maziowe stawów kolanowych szczurów w pożywce hodowlanej nie zawierającej surowicy, hodowano na wolnoobrotowej wytrząsarce przez 24h w 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Jedna z błon maziowych tego samego dawcy służyła jako kontrola, druga była stymulowana cytokiną.

Eksperymentalne błony maziowe były stymulowane 10 ng/ml IL-1 β , 20 ng/ml TNF, 100 ng/ml, IFN- γ , 10 ng/ml TGF- β 1 lub 10 ng/ml IL-4. Po inkubacji błony maziowe ekstrahowano buforem lizującym. Stężenie HA w supernatantach z nad hodowli i lizatach błon maziowych było oceniane testem ELISA.

Błony maziowe przeznaczone do badania ekspresji HAS były lizowane zaraz po wycięciu albo po 12h inkubacji w pożywce kontrolnej. Następnie z błon izolowałam RNA, wykonywałam odwrotną transkrypcję i przeprowadzałam ilościową reakcję łańcuchową polimerazy DNA (PCR w czasie rzeczywistym), aby ocenić ekspresję HAS.

Długość łańcuchów HA w supernatantach z nad hodowli kontrolnych i ekperymentalnych była oceniana i porównywana po elektroforezie w żelu agarozowym, a aktywność obojętnej hialuronidazy była oceniana metodą zymografii kwasu hialuronowego.

Średnia zawartość HA w lizatach błon maziowych zaraz po wycięciu wynosiła 1 \pm 0,1 μ g/BM. Po 24h inkubacji, zawartość HA w lizatach spadała do <0.1 μ g/BM. Zawartość HA wzrastała natomiast w supernatantach z nad hodowli od 2 do 5 razy po 24h inkubacji. Ten wzrost korelował ze wzrostem poziomu mRNA dla HAS1 i HAS2 (dwukrotny wzrost po 12h inkubacji). Jednakże, i tak niski w porównaniu do HAS1 i HAS2, poziom mRNA dla HAS3, syntazy odpowiadającej za syntezę niskocząsteczkowego HA, obniżył się dwukrotnie w tym samym czasie.

Aktywność obojętnej hialuronidazy nie została wykryta w żadnych supernatantach z nad 24h inkubowanych błon maziowych (kontrolnych i ekperymentalnych), nawet gdy próbki supernatantów były 10 razy zagęszczone. Podobnie rozmiar łańcuchów HA, obecnego w supernatantach z nad hodowli był podobny we wszystkich grupach, kontrolnej i ekperymentalnych. Wszędzie dominował materiał wielkocząsteczkowy.

Natomiast stymulacja błon maziowych cytokinami TNF, IL-1 β , IFN- γ , TGF- β 1 lub IL-4 spowodowała statystycznie istotny wzrost zawartości HA w pożywce hodowlanej w stosunku do niestymulowanej kontroli. Najsilniejszy wzrost spowodowało działanie TNF (ponad 50%), najniższy (10%) IFN- γ . Zawartość HA w lizatach błon maziowych, dla grupy

kontrolnej i wszystkich grup eksperymentalnych była taka sama i nie przekraczała 2,5% zawartości HA w pożywce.

Te wyniki sugerują, że równowaga między zawartością HA w błonie maziowej, a stężeniem HA w płynie stawowym jest zjawiskiem obecnym w stawach maziowych. Zatrzymywanie HA w błonie maziowej jest spowodowane wiązaniem HA z kolagenem typu IV obecnym w warstwie podwyściółkowej, innymi hialadherynami, a także z CD44. Zawartość HA w błonie maziowej stawu kolanowego szczura spada z ~ 1 μg w błonie świeżo wyciętej do < 0.1 μg po 24h inkubacji, natomiast stężenie HA w pożywce hodowlanej rośnie od 0 do 3-5 μg po 24h inkubacji. Ten wynik sugeruje, że HA zawarty w błonie jest uwalniany do pożywki w odpowiedzi na zachwianą równowagę między stężeniem HA w błonie maziowej i w otaczającym ją środowisku. Wzrost ekspresji HAS1 i HAS2 podczas inkubacji potwierdza ten wniosek. Zatem należy wnosić, że komórki wyściółki błony maziowej zawierają sensory, które wykrywają zmiany w stężeniu kwasu hialuronowego w płynie stawowym i aktywują syntazy HA w odpowiedzi na spadek jego poziomu.

Następnie w pracy zatytułowanej „**Influence of LPS, TNF, TGF- β 1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated *in vitro***” (praca nr 4) oceniałam wpływ LPS i wymienionych wyżej cytokin na ekspresję genów dla metaloproteinaz MMP1a, MMP1b, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MMP14, ich tkankowych inhibitorów TIMP1, TIMP2, TIMP3, TIMP4 oraz niektórych cytokin IL-1 β , IL-6, TNF i TGF- β 1 w komórkach błon maziowych hodowanych jako całe organy.

Odpowiedź makrofagów i fibroblastów pochodzących ze zdrowych stawów maziowych na stymulację cytokinami była wprawdzie intensywnie badana w hodowlach komórkowych, lecz były to komórki hodowane oddzielnie. Ponieważ obydwa typy synowocytów produkują metaloproteinazy, ich inhibitory i inne czynniki np. cytokiny, a zatem wpływają na siebie wzajemnie, ich wspólna odpowiedź na stymulację nie jest prostą sumą ich osobnych odpowiedzi. Ponadto cytokiny i hormony produkowane przez inne komórki błony maziowej np. komórki śródbłonna i adipocyty również modyfikują odpowiedź synowocytów.

W tym celu błony maziowe stawów kolanowych szczurów inkubowałam z 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 20 ng/ml TNF, 10 ng/ml TGF- β 1 lub 10 ng/ml IL-4 przez 12h w temperaturze 37°C, 5% CO₂, na wolnobrotowej wytrząsarce. W przypadku badania ekspresji genów dla TNF i IL-6, błony maziowe inkubowałam dodatkowo przez 1h, 2h i 3h. Jak poprzednio jedna z błon maziowych tego samego dawcy służyła jak kontrola, druga była stymulowana

(eksperymentalna). Po zakończeniu inkubacji z błon maziowych izolowałam całkowite RNA, przeprowadzałam odwrotną transkrypcję i przeprowadzałam ilościową reakcję łańcuchową polimerazy DNA (PCR w czasie rzeczywistym), aby ocenić ekspresję tkankowych metaloproteinaz, ich inhibitorów i wybranych cytokin.

Stymulacja błon maziowych LPS spowodowała statystycznie istotny wzrost poziomu mRNA dla metaloproteinaz MMP1a, MMP1b, MMP3, MMP9, MMP13, MMP14 i ich tkankowych inhibitorów TIMP1 and TIMP3, a także cytokin IL-6, IL-1 β , TGF- β 1. Zahamowana została natomiast ekspresja MMP2, TIMP2 i TIMP4. Stymulacja błon maziowych LPS przez 12h nie wpłynęła na ekspresję TNF, ale po 1h inkubacji z LPS poziom mRNA dla TNF wzrósł stukrotnie, po 2h dziesięciokrotnie, a po 3h trzykrotnie w stosunku do niestymulowanej kontroli.

Dwunastogodzinna stymulacja błon maziowych TNF podwyższyła poziom mRNA dla MMP1a, MMP1b, MMP3, MMP9, MMP13, TIMP1, IL-1 β mRNA i obniżyła poziom mRNA dla MMP2, MMP14, TIMP2, TIMP3 i TIMP4. Ekspresja TNF, IL-6 i TGF- β 1 nie uległa zmianie, lecz po 3h inkubacji poziom mRNA dla IL-6 wzrósł ośmiokrotnie.

Stymulacja błon maziowych IL-4 obniżyła poziom mRNA dla MMP2, MMP9, MMP13, MMP14, TIMP1, wszystkich inhibitorów metaloproteinaz, a także dla IL-1 β i TGF- β 1. Natomiast ekspresja MMP1a, MMP1b, MMP3, IL-6 i TNF nie uległa zmianie.

Stymulacja błon maziowych TGF- β 1 podwyższyła poziom mRNA dla TIMP3 i TGF- β 1, a obniżyła dla wszystkich badanych metaloproteinaz, TIMP1, TIMP2, TIMP4 i IL-1 β . Natomiast ekspresja IL-6 i TNF pozostała niezmienną.

W przedstawionych badaniach podjęłam próbę ogólnej charakterystyki odpowiedzi prawidłowej błony maziowej, traktowanej jako cały organ, na kilka wybranych biologicznie aktywnych czynników. Precyzyjne porównanie tej odpowiedzi z danymi dotyczącymi poszczególnych typów komórek opisanych przez innych autorów jest trudne ze względu na różnice w pochodzeniu komórek (różne gatunki), a także różne warunki hodowli (czas obserwacji, dawki stymulujących czynników). Ponadto, w przypadku moich badań jest to odpowiedź będąca wynikiem aktywności wszystkich komórek wchodzących w skład błony maziowej.

Stymulacja błony maziowej zaliczanym do cytokin prozapalnych TNF, skutkowała, podobnie jak stymulacja LPS, podwyższeniem ekspresji metaloproteinaz i cytokin prozapalnych, co prowadzi do rozwoju procesów zapalnych w tkankach. Natomiast stymulacja błon maziowych cytokinami antyzapalnymi IL-4 i TGF- β 1 wyhamowała ekspresję metaloproteinaz i cytokin prozapalnych.

Zgodnie z tradycyjnym poglądem błona maziowa i chrząstka stawowa wywodzą się z różnych prekursorów, lecz ostatecznie badania wskazują, że łączy je wspólne pochodzenie. Jeszcze do niedawna dominował pogląd, że chrząstka stawowa reprezentuje część modelu chrzęstnego kości długiej, nie ulegającą procesowi kostnienia. Obecnie uważa się, że modele chrzęstne sąsiadujących kości długich są oddzielane od siebie komórkami interzony, które powstają w wyniku konwersji chondrocytów w komórki niechondrocytarne. W strefie interzony zachodzi utworzenie jamy stawowej. Temu procesowi towarzyszy intensywne syntezę kwasu hialuronowego, który ułatwia rozdzielanie tkanek. Ostatnie badania wskazują, że mezenchymalne komórki okołostawowe biorą udział w utworzeniu interzony, a komórki interzony różnicują w komórki chrząstki stawowej i błony maziowej. Temat wspólnego pochodzenia chrząstki stawowej i błony maziowej opisałam w pracy poglądowej zatytułowanej „**Formation of synovial joint and articular cartilage**” (praca nr 5).

Tematem kolejnej mojej pracy pt. “**Influence of cartilage interstitial fluid on the mRNA levels of matrix proteins, cytokines, metalloproteases and their inhibitors in synovial membrane**” (praca nr 6) było zbadanie wpływu chrząstki stawowej na ekspresję genów dla syntaz kwasu hialuronowego (HAS1 i HAS2), białek macierzy międzykomórkowej (lubrycyny, kolagenu typu I, wersykanu i agrekanu) oraz wybranych cytokin (TNF, IL-1 β , IL-6 i TGF- β 1) w komórkach prawidłowej błony maziowej, hodowanej jako cały organ.

Chrząstka stawowa i błona maziowa wspólnie zapewniają sprawne działanie stawów maziowych. Komórki błony maziowej produkują HA i lubrycynę, które odpowiadają za lepkość płynu stawowego i smarowanie stawów. Synowioocyty wydzielają także czynniki, które indukują syntezę metaloproteinaz w chondrocytach. Ponadto, prawidłowy płyn stawowy stymuluje syntezę kolagenu typu II i glikozaminoglikanów w chrząstce stawowej. Można zatem przypuszczać, że również chondrocyty mogą wpływać na aktywność i profil wydzielniczy komórek błony maziowej. Macierz chrzęstna zawiera fazę płynną, która stanowi około 70% jej objętości. Zgodnie z teorią smarowania stawów, obciążenie chrząstki stawowej podczas ruchu wyciska z chrząstki około 10% tego płynu o właściwościach smarujących do jamy stawowej. Jest zatem prawdopodobne, że płyn śródmiąższowy chrząstki (cartilage interstitial fluid - CIF) wyciśnięty z niej podczas obciążenia zawiera cytokiny produkowane przez chondrocyty, które wpływają na aktywność komórek błony maziowej.

Celem tej pracy było uzyskanie płynu śródmiąższowego chrząstki (CIF) z chrząstki kompleksów stawowo-nasadowych szczura i ocena jego wpływu na ekspresję HAS1, HAS2, lubrycyny, kolagenu typu I, wersykanu i agrekanu oraz TNF, IL-1 β , IL-6 i TGF- β 1 w komórkach błony maziowej hodowanej jako cały organ.

CIF był wyciskany z kompleksów stawowo-nasadowych chrząstki noworodków szczurzych. Chondrocyty izolowane z tej chrząstki, po wyciśnięciu CIF, były żywe i dzieliły się w hodowli. Cytokiny obecne w CIF były wykrywane testem ELISA. Wpływ CIF i koktajlu cytokin obecnych w CIF na ekspresję genów w komórkach błony maziowej po 4h inkubacji oceniałam ilościową reakcją łańcuchową polimerazy DNA.

CIF zawierał $2,3 \pm 0,2$ ng/ml zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF), $2,1 \pm 0,2$ ng/ml insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1), $0,5 \pm 0,1$ ng/ml TGF- β 1, 80 ± 29 pg/ml białka morfogenetycznego kości 7 (BMP7), 61 ± 15 pg/ml czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), 23 ± 5 pg/ml czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) i 24 ± 3 pg/ml czynnika hamującego białaczkę (leukemia inhibitory factor - LIF). Nie wykryto w CIF obecności IL-1 β , IL-7, IL-6, IL-10, płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF), naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), TNF, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów/makrofagów (GM-CSF), białka morfogenetycznego kości 2 (BMP2), lubrycyny, ani kwasu hialuronowego (HA).

Stymulacja CIF podwyższyła ekspresję HAS1, HAS2, lubrycyny, kolagenu typu I, wersykanu, agrekanu, MMP2, MMP3, TIMP1, TIMP2, TIMP3, IL-6 i TGF β 1, natomiast obniżyła ekspresję genów dla cytokin prozapalnych TNF i IL-1 β .

Badania dotyczące wpływu koktajlu cytokin obecnych w CIF na ekspresję genów w komórkach błony maziowej były ograniczone do 9 wybranych genów. Stymulacja koktajlem cytokin spowodowała, podobnie jak stymulacja CIF, podwyższenie ekspresji genów dla HAS1, lubrycyny, kolagenu typu I, agrekanu, TIMP1 i TGF β 1. Natomiast w przeciwieństwie do CIF, stymulacja koktajlem cytokin wykrytych w CIF nie zmieniła ekspresji genów dla MMP3 i cytokin prozapalnych TNF i IL-6. Zatem koktajl tylko częściowo imitował efekt wywierany przez CIF.

Generalnie stymulacja CIF spowodowała podwyższenie ekspresji badanych genów ze znamienym wyjątkiem w postaci cytokin prozapalnych, których ekspresja została wyhamowana. Podobnie, choć słabiej, działała stymulacja koktajlem cytokin, który również nie spowodował podwyższenia poziomu mRNA dla cytokin prozapalnych.

Wynik ten sugeruje konieczność dalszych badań nad składem CIF, a także wskazuje na to, że CIF może przeciwdziałać rozwojowi procesów zapalnych w obrębie błony maziowej. Analiza składu płynu śródmiąższowego chrząstki może pomóc w scharakteryzowaniu profilu wydzielniczego chondrocytów w ich naturalnym środowisku, w fizjologicznych i patologicznych warunkach, a także w zrozumieniu interakcji między chrząstką stawową i błoną maziową.

Ponieważ prawidłowy płyn stawowy zawiera wyprodukowane przez chondrocyty czynniki wyciśnięte wraz z płynem śródmiąższowym chrząstki w trakcie obciążania stawów podczas ruchu, celem następnej mojej pracy zatytułowanej „**Influence of IGF1, TGF β 1, bFGF and G-CSF/M-CSF on the mRNA levels of selected matrix proteins, cytokines, metalloproteinase 3 and TIMP1 in rat synovial membrane cells**” (praca nr 7) była ocena wpływu poszczególnych czynników wykrytych w CIF, badanych pojedynczo (bFGF, IGF-1, TGF- β 1) lub w kombinacjach TGF- β 1/IGF-1, TGF- β 1/IGF-1/bFGF, G-CSF/M-CSF) na ekspresję genów dla HAS1, białek macierzy międzykomórkowej - lubrycyny, kolagenu typu I, agrekanu, MMP3, TIMP1, oraz wybranych cytokin - TNF, IL-6 i TGF- β 1 w komórkach organotypowych hodowlach błony maziowej.

W tym celu błony maziowe były inkubowane w 5% CO₂, w temperaturze 37°C na wolnoobrotowej wytrząsarce przez 4h. Jedna z błon maziowych tego samego dawcy służyła jako kontrola, druga była poddawana stymulacji pojedynczą cytokiną lub kombinacją cytokin w stężeniu odpowiadającym stężeniu danej cytokiny w CIF (2,5 ng/ml bFGF, 2 ng/ml IGF-1, 0,5 ng/ml TGF- β 1, 25 pg/ml G-CSF, 60 pg/ml M-CSF). Po inkubacji izolowałam z błon maziowych całkowite RNA, przeprowadzałam odwrotną transkrypcję, a ekspresję badanych genów oceniałam ilościową reakcją łańcuchową polimerazy DNA.

Stymulacja błon maziowych TGF- β 1/IGF-1/bFGF i TGF- β 1/IGF-1 działała podobnie i zwiększała ekspresję genów dla HAS1, lubrycyny i TGF- β 1, a zmniejszała ekspresję genu dla TNF. Natomiast stymulacja dwoma czynnikami spowodowała dodatkowo zwiększenie ekspresji genów dla kolagenu typu I i agrekanu oraz zmniejszyła ekspresję MMP3. Obydwie kombinacje nie zmieniły ekspresji genów dla TIMP1 i IL-6. Wynik ten wskazuje na właściwości przeciwzapalne tych kombinacji cytokin, które podane wspólnie, w stężeniu równym ich stężeniu w CIF, pobudzały lub nie zaburzały ekspresji genów dla badanych białek macierzy międzykomórkowej, zwiększały ekspresję cytokiny przeciwzapalnej – TGF- β 1, a zmniejszały ekspresję genu dla cytokiny prozapalnej – TNF, przy czym silniejszy efekt dawała stymulacja dwoma czynnikami.

Stymulacja TGF- β 1 spowodowała jedynie zahamowanie ekspresji genów dla lubrycyny i MMP3, a stymulacja IGF-1 wyhamowała tylko ekspresję genu dla lubrycyny, Natomiast stymulacja bFGF spowodowała obniżenie ekspresji genu dla lubrycyny, agrekanu, MMP3 i TNF. Zatem wpływ stymulacji pojedynczymi cytokinami był ograniczony do zaledwie dwóch genów kodujących białka macierzy (lubrycyna, agrekan) i MMP3. Interesujące jest, że efekty działania pojedynczych cytokin na ekspresję genów dla białek

macierzy były odwrotne niż kombinacji tych czynników. Zatem wpływ pojedynczych czynników na ekspresję genów błony maziowej jest inny niż ich kombinacji.

Tylko stymulacja jedną pojedynczo podaną cytokiną – bFGF, podobnie jak obydwie kombinacje czynników, wyhamowała ekspresję genu dla cytokiny prozapalnej - TNF.

Stymulacja G-CSF/M-CSF wpłynęła wyłącznie na podwyższenie ekspresji genu dla agrekanu. Ograniczony wpływ tej kombinacji czynników może być wynikiem ich niskiego stężenia w CIF, a tym samym w przeprowadzonym doświadczeniu.

Badania nad odpowiedzią błony maziowej, jako całego organu, zyskały nową perspektywę z powodu wprowadzenia w leczeniu uszkodzeń i przeciążeń narządu ruchu osocza bogatopłytkowego (intraarticular platelet-rich plasma-PRP) jako stymulatora chondrogenyzy. Czynniki wzrostu uwalniane z płytek krwi mogą wywoływać różne, trudne do przewidzenia, reakcje komórek błony maziowej. PRP zawiera TGF- β 1, IGF-1 i bFGF, te same czynniki, które są obecne w CIF; zatem wyniki opisane w tej pracy mogłyby prawdopodobnie być pomocne w scharakteryzowaniu odpowiedzi błony maziowej na PRP.

Podsumowanie

- 1. Opracowałam metodę pozyskiwania kompletnych błon maziowych ze stawów kolanowych szczurów (praca nr 2).** Wykazałam, że metoda jest skuteczna, ponieważ błony maziowe tego samego dawcy zawierały podobną ilość IL-1 α i produkowały podobną ilość IL-6, a także odpowiadały podobnie na stymulację LPS, co potwierdziły testy statystyczne.
- 2. Wykazałam, że zawartość HA w lizatach błon maziowych wynosiła $1 \pm 0,1 \mu\text{g}$ a po 24h inkubacji, spadała do $<0.1 \mu\text{g}$, natomiast wzrastała w supernatantach znad hodowli od 2 do 5 razy (praca nr 3).** Ten wzrost korelował ze wzrostem poziomu mRNA dla HAS1 i HAS2. Uzyskane wyniki sugerują, że istnieje równowaga między zawartością HA w błonie maziowej, a stężeniem HA w płynie stawowym. HA zawarty w błonie jest uwalniany do pożywki w odpowiedzi na zachwianie tej równowagi.
- 3. Wykazałam, że stymulacja błon maziowych TNF, IL-1 β , IFN- γ , TGF- β 1 i IL-4 spowodowała statystycznie istotny wzrost zawartości HA w pożywce hodowlanej w stosunku do niestymulowanej kontroli (praca nr 3).** Najsilniejszy wzrost spowodowało działanie TNF (ponad 50%), najniższy (10%) IFN- γ .
- 4. Wykazałam, że stymulacja błony maziowej TNF, skutkowała, podobnie jak stymulacja LPS, podwyższeniem ekspresji genów dla metaloproteinaz i cytokin**

prozapalnych. Natomiast stymulacja błon maziowych IL-4 i TGF- β 1 wyhamowała ekspresję metaloproteinaz i cytokin prozapalnych (praca nr 4).

5. Opracowałam metodę pozyskiwania śródmiaższowego płynu chrząstki (CIF) z kompleksu stawowo-nasadowego chrząstki noworodków szczurzych (praca nr 6).

6. Scharakteryzowałam skład CIF w kontekście zawartych w nim cytokin: bFGF, IGF-1, TGF- β 1 BMP7, M-CSF, G-CSF oraz LIF i sporządziłam koktajl wszystkich cytokin wykrytych w CIF (praca nr 6).

7. Wykazałam, że stymulacja CIF spowodowała podwyższenie ekspresji HAS1, HAS2, lubrycyny, kolagenu typu I, wersykanu, agrekanu, MMP2, MMP3, TIMP1, TIMP2, TIMP3, IL-6 i TGF β 1, natomiast obniżyła ekspresję genów dla TNF i IL-1 β (praca nr 6). Podobnie, choć słabiej, działała stymulacja koktajlem cytokin. Wynik ten sugeruje konieczność dalszych badań nad składem CIF, a także wskazuje na to, że CIF może przeciwdziałać rozwojowi procesów zapalnych w obrębie błony maziowej.

8. Wykazałam, że kombinacje cytokin obecnych w CIF podawanych wspólnie (bFGF, IGF-1, TGF- β 1) regulowały ekspresję badanych białek macierzy międzykomórkowej, zwiększały ekspresję TGF- β 1, oraz zmniejszały ekspresję TNF (praca nr 7). Wynik ten wskazuje na właściwości przeciwzapalne tych kombinacji cytokin. Badania nad odpowiedzią błony maziowej jako organu na stymulację powyższymi cytokinami, zyskały nowe znaczenie z powodu wprowadzenia w leczeniu uszkodzeń i przeciążeń narządu ruchu osocza bogatopłytkowego (PRP), które zawiera czynniki wzrostu obecne w CIF, jako stymulatora chondrogenyzy.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Poza powyższym cyklem prac, stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, w mojej pracy badawczej zajmowałam się przede wszystkim tematyką związaną z przeszczepianiem syngenicznych i allogenicznych chondrocytów, reakcją biorców na przeszczepianie chondrocytów i chrząstki, a także poszukiwaniem tkankowo-specyficznych antygenów chondrocytarnych. Badałam również różnice w procesie odtwarzania kości przez przeszczepiane syngenicznym biorcom osteoblasty, w zależności od miejsca ich pochodzenia i warunków przeszczepienia. Kolejnym tematem moich prac było badanie ekspresji cząsteczek chroniących komórki przed atakiem dopełniacza na chondrocytach oraz wrażliwości chondrocytów na lizę przez komórki NK. Osobny rozdział moich zainteresowań stanowią badania związane z biologią rozrodu. Uczestniczyłam w badaniach dotyczących aktywności komórek NK u pacjentek z rakiem jajnika, mastopatią, mięśniakami macicy, a także w badaniu zmian ekspresji greliny, receptorów dla greliny, VEGF A, receptorów dla VEGF1-3 (vascular endothelial growth factor) u pacjentek z nawracającymi poronieniami. Obecnie zajmuję się badaniem zjawiska metapłazji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) w endometriozie. Brałam również udział w badaniu ekspresji transporterów ABC we wczesnym rozwoju zarodkowym myszy, a także w badaniu poziomu cytokin w płynie otrzewnowym niedonoszonych noworodków z martwiczym zapaleniem jelit lub spontaniczną perforacją jelita. Kontynuuję również badania dotyczące wpływu śródmiąższowego płynu chrząstki i zawartych w nim cytokin na fibroblasty pochodzące z różnych źródeł. Obecnie moje zainteresowania obejmują wykrywanie czynników wzrostu zawartych w niezwapniałej macierzy chrzęstnej sąsiadującej z depozytami wapnia oraz charakterystykę złogów wapnia, a także sposoby modyfikacji rusztowań z polikaprolaktonu służących do tworzenia trójwymiarowych przeszczepów komórkowych w inżynierii tkankowej. Wieloletnie doświadczenie w pracy laboratoryjnej umożliwiło mi swobodne posługiwanie się różnymi technikami badawczymi oraz prawidłowy wybór stosowanych metod. Przedstawione prace charakteryzują się różnorodnością stosowanych modeli badawczych - badania *in vivo* na modelach zwierzęcych, *in vitro* na hodowlach komórkowych, a także na materiale ludzkim. Prace zostały opublikowane 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.

Badanie wpływu śródmiąższowego płynu chrząstki (CIF) na fibroblasty więzadeł krzyżowych i fibroblasty skóry (prace nr II. A.20 i II.A.21).

Ta część mojego dorobku dotyczy badań nad wpływem CIF oraz koktajlu cytokin obecnych w CIF na ekspresję wybranych genów w fibroblastach izolowanych z więzadeł krzyżowych szczura. Wpływ ten był porównywany z wpływem CIF na ekspresję genów w fibroblastach izolowanych ze skóry szczura. W obydwóch typach fibroblastów CIF w tym samym stopniu stymulował ekspresję HAS2, TIMP1 oraz TGFβ1 i hamował ekspresję kol genu typu I, MMP2, TIMP2 oraz IL-1β. Natomiast silniej stymulował ekspresję HAS1 i lubrycyny, a silniej hamował ekspresję wersykanu w fibroblastach więzadeł. W fibroblastach skóry dużo silniej stymulował ekspresję MMP3. Przeciwny efekt CIF wywierał na ekspresję agrekanu i TIMP3 (stymulacja w fibroblastach więzadeł, hamowanie w fibroblastach skóry) oraz TNF (hamowanie w fibroblastach więzadeł, stymulacja w fibroblastach skóry). Zatem CIF silniej stymulował ekspresję białek charakterystycznych dla chrząstki (agrekan, lubrycyna) w fibroblastach więzadeł i również tylko w nich hamował ekspresję cytokiny prozapalnej - TNF. Koktajl cytokin wykrytych w CIF wywierał efekt podobny choć słabszy niż CIF.

Przeszczepianie chondrocytów i chrząstki

A. Przeszczepianie chrząstki i chondrocytów żebrowych (prace nr (II.A.4 i II.D.1).

Uczestniczyłam w badaniach nad przeszczepianiem chrząstki żebrowej oraz chondrocytów pochodzących z tej chrząstki syngenicznym i allogenicznym biocom. Przeszczepy syngeniczne i allogeniczne chrząstki żebrowej u nieimmunizowanych myszy nie różniły się od chrząstki biorecy, nie były odrzucane i ulegały procesowi wapnienia w tym samym czasie, co chrząstka żebrowa biorecy *in situ*. Jedynie wokół przeszczepów allogenicznych zaobserwowano nieliczne komórki nacieku. Słaba reakcja biorców na przeszczepy allogeniczne chrząstki wynika z jej budowy – jest to tkanka nieunaczyniona, zawierająca leżące w jamkach chondrocyty otoczone zwartą macierzą pozakomórkową, która chroni je przed kontaktem z układem odpornościowym gospodarza. Natomiast wokół allogenicznych przeszczepów chrząstki u biorców preimmunizowanych chondrocytami lub

splenocytami nastąpiła indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej, utworzyły się masywne nacieki a proces wapnienia został zahamowany (praca II.D.1).

Kolejne badania dotyczyły wpływu surowicy antytymocytarnej podawanej z prokarbazyną (ATS-PCH) na odrzucanie chrząstki utworzonej przez przeszczepione allogeniczne chondrocyty żebrów u myszy (praca II.A.4). Chrząstka utworzona przez allogeniczne chondrocyty u nieleczonych myszy była niszczone przez naciekające komórki biorcy, podczas gdy podanie ATS-PCH zapobiegało procesowi niszczenia przeszczepu, indukcji odpowiedzi komórkowej i ograniczało w znacznej mierze odpowiedź humoralną biorcy.

B. Przeszczepianie chondrocytów kompleksu stawowo-nasadowego

1. Porównanie chrząstki utworzonej przez szczurze i mysie syngeniczne chondrocyty przeszczepiane do wątroby, nerki, śledziony, mięśnia lub hodowane na błonie kosmówkowo-omoczniowej kurcząt (praca II.A.5). W chrząstce utworzonej w wątrobie zaobserwowano proces wapnienia rozpoczynający się już po 7 dniach od przeszczepu i większe jamki chrzęstne niż w chrząstkach odtworzonych w pozostałych eksperymentach. Zatem przypuszczalnie proces hipertrofii chondrocytów jest regulowany przez czynniki środowiskowe pochodzące spoza chrząstki.

2. Przeszczepy domięśniowe chondrocytów szczurzych (prace II.A.10, II.D.8). Chrząstka utworzona w mięśniu przez przeszczepione chondrocyty syngeniczne szczura nie wykazywała cech odrzucania, natomiast chrząstka utworzona przez chondrocyty allogeniczne była penetrowana przez leukocyty (komórki szeregu monocyt/makrofag, limfocyty B, limfocyty TCD4⁺ i TCD8⁺). W miarę upływu czasu wzrastała liczba limfocytów TCD8⁺ i pojawiały się chondrocyty z ekspresją MHC klasy II (praca II.D.8). U szczurów preimmunizowanych chondrocytami allogenicznymi również chrząstka utworzona przez chondrocyty syngeniczne była otaczana przez komórki nacieku i częściowo resorbowana wskutek indukcji odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Ta obserwacja potwierdziła teorię, że chondrocyty wykazują ekspresję tkankowo swoistych antygenów (praca II.A.10).

3. Przeszczepy dostawowe chondrocytów (II.D.2, II.A.7, II.A.8, II.A.9, II.A.14)

Ponieważ w następnych pracach zajmowałam się przeszczepianiem chondrocytów do ubytków w chrząstce stawowej napisałam pracę poglądową o jej budowie i biologicznych właściwościach (praca nr II.D.11).

W pracy nr II.D.2 porównywana była chrząstka odtworzona przez syngeniczne chondrocyty przeszczepione do mięśnia i do ubytków w chrząstce stawowej szczura. W mięśniu w chrząstce obserwowano hipertrofię chondrocytów i wapnienie macierzy po 2

tygodniach od przeszczepu, a kość zastępowała całkowicie chrząstkę po 8 tygodniach. W chrząstce odtworzonej w ubytkach w chrząstce stawowej proces hipertrofii, wapnienia, a następnie kościotworzenia zachodził jedynie w głębokiej warstwie, natomiast chondrocyty warstwy powierzchniowej nie ulegały hipertrofii, a macierz wapnieniu. Zatem środowisko jamy stawowej prawdopodobnie wpływa hamująco na hipertrofię chondrocytów i wapnienie macierzy chrzęstnej.

W pracy nr II.A.7 porównywana była chrząstka odtworzona przez syngeniczne i allogeniczne chondrocyty przeszczepione do ubytków w chrząstce stawowej szczura. Przeszczepy syngeniczne nie ulegały odrzuceniu, a nowopowstała chrząstka wypełniała ubytki w chrząstce stawowej i budową przypominała prawidłową chrząstkę stawową. Natomiast w chrząstce odtworzonej przez allogeniczne chondrocyty obserwowano masywne nacieki od strony jamy szpikowej i resorpcję macierzy. Zastosowanie cyklosporyny A (CsA) jedynie częściowo ograniczyło liczbę komórek nacieku i odpowiedź komórkową biorców.

W kolejnej pracy (nr II.A.8) porównywany był wpływ immunosupresji CsA i kladrybiną (2-CdA) na przeżycie chrząstki odtworzonej przez allogeniczne chondrocyty w mięśniu i ubytku w chrząstce stawowej szczura. Przeszczepy takie bez zastosowania immunosupresji były naciekane przez leukocyty i ulegały resorpcji. W chrząstce odtworzonej w mięśniu CsA i 2-CdA podawane osobno jedynie częściowo, natomiast zastosowane razem silnie zahamowały proces tworzenia nacieków oraz systemową odpowiedź komórkową i humoralną biorców. Wpływ takiej immunosupresji na chrząstkę odtworzoną przez allogeniczne chondrocyty w ubytku w chrząstce powierzchni stawowej był znacznie mniejszy. Komórki nacieków były tu mniej liczne, ale resorpcja macierzy nie została wyhamowana, pomimo, że intensywność nacieków i pobudzenie splenocytów w mieszanej hodowli splenocytów z chondrocytami, jak i produkcja przeciwciał były bardziej intensywne u biorców przeszczepów domięśniowych. Zatem zastosowane leczenie immunosupresyjne było bardziej skuteczne w przypadku silnej reakcji ogólnosystemowej niż słabszej lecz lokalnej.

Ponieważ chrząstka odtwarzana w ubytkach w powierzchni stawowej była naciekana przez leukocyty od strony jamy szpikowej, w dalszych badaniach w celu zapobieżenia odrzucaniu, została podjęta próba mechanicznego oddzielenia nowopowstającej chrząstki odtwarzanej w ubytku w chrząstce stawowej szczura przez allogeniczne chondrocyty od jamy szpikowej za pomocą cementu kostnego (praca nr II.A.9). Chrząstka odtworzona w ubytku wysłanym masą cementu kostnego była wolna od nacieku, a układ odpornościowy biorców pozostał niepobudzony. Jednakże dystrybucja proteoglikanów macierzy w przeszczepie była

zaburzona. Ponieważ także hodowane *in vitro* chondrocyty produkowały mniej proteoglikanów, można przypuszczać, że czynnik(i) uwalniane z cementu hamowały ich produkcję.

W kolejnej pracy (nr II.A.14) porównywany był proces odrzucania chrząstki odtwarzanej w ubytkach w chrząstce stawowej szczura przez przeszczepiane chondrocyty allogeniczne u naiwnych biorców z procesem odrzucania chrząstki odtwarzanej przez syngeniczne chondrocyty u biorców preimmunizowanych podawanymi domięśniowo chondrocytami allogenicznymi. W obu eksperymentach proces odrzucania przebiegał podobnie. Limfocyty CD8⁺ i makrofagi penetrowały odtwarzaną chrząstkę, która ulegała resorpcji, te same komórki obecne były w błonach maziowych. Ponieważ chrząstka odtwarzana przez przeszczepiane chondrocyty syngeniczne u naiwnych biorców nie jest odrzucana, wynik powyższego doświadczenia potwierdził teorię, o ekspresji antygenów tkankowo swoistych na chondrocytach.

Z uwagi na to, że przeszczepianie chondrocytów było jednym z głównych tematów moich badań przez wiele lat (1991-2005) byłam współautorem dwóch prac przeglądowych dotyczących tego zagadnienia (prace nr II.A.11 i II.D.10).

Antygenowość i immunogenność chondrocytów

Uczestniczyłam również w badaniach nad identyfikacją tkankowo swoistego antygenu obecnego na chondrocytach (praca nr II.A.12). Za pomocą przeciwciał z surowic uzyskanych od królików immunizowanych chondrocytami szczurzymi wykrywane były w ekstrakcie chondrocytów białka o masie 74 kDa i 23 kDa. Po redukcji dwumerkaptoetanołem wykrywane było tylko białko o masie 23 kDa, co wskazuje, że białko 23 kDa tworzy oligomeryczne kompleksy o masie 74 kDa. Ponieważ białko to nie występowało w ekstraktach fibroblastów, komórek śródbłonna i tymocytów można przypuszczać, że jest antygen związany z chondrocytami (chondrocyte-associated antygen CAA).

Celem następnej pracy (nr II.D.13) było porównanie ekspresji CAA i charakterystycznych dla chrząstki białek kolagenu typu II i białka rdzenia agrekanu w jednowarstwowej i wielowarstwowej hodowli chondrocytów kompleksu stawowo-nasadowego szczura. Stwierdzono, że ekspresja CAA była ściśle związana z zależnym od warunków hodowli zachowaniem fenotypu chondrocytarnego, co sugeruje że CAA jest antygenem swoistym dla chondrocytów.

W kolejnej pracy (nr II.A.17) antygen chondrocytarny (CAA) został zidentyfikowany jako transbłonowe białko Tmp21 (TMED10) należące do rodziny białek p24. Białka te

uczestniczą w transporcie między siateczką śródplazmatyczną i aparatem Golgiego, ale występują też w błonie komórkowej. Ponieważ chondrocytarny Tmp21 jest sialylowany (ta modyfikacja nie została opisana w innych tkankach) można sądzić, że jest to chondrocytarny antygen tkankowo-swoisty.

Celem kolejnej pracy (nr II.A.16) było sprawdzenie czy, i w jaki sposób, klasyczny fenotyp chondrocytarny jest związany z wrażliwością chondrocytów na lizę przez komórki NK (natural killer cells) Utrata fenotypu chondrocytarnego (ekspresja kolagenu typu II, agrekanu, synteza glikozaminoglikanów) w hodowli była skorelowana z utratą wrażliwości chondrocytów na lizę przez komórki NK. Podobny efekt występował przy supresji chondrocytarnego fenotypu przez TNF, natomiast stymulacja IGF-1 (czynnikiem promującym syntezę białek charakterystycznych dla chrząstki) powodowała wzrost antychondrocytarnej cytotoksyczności komórek NK. Zatem wrażliwość chondrocytów na lizę przez komórki NK zależy od ich chondrocytarnego fenotypu.

Ekspresja cząsteczek chroniących komórkę przed atakiem dopełniacza w na powierzchni chondrocytów (prace nr II.D.12 i II.A.13).

Ponieważ w poprzednich badaniach (prace nr II.A.7, II.A.8) w surowicach naiwnych szczurów, wykrywane były przeciwciała reagujące *in vitro* z syngenicznymi chondrocytami, lecz nie zaburzające procesów odtwarzania chrząstki przez przeszczepiane syngeniczne chondrocyty, zainteresowałam się ekspresją na chondrocytach cząsteczek chroniących komórki przed uszkodzeniem spowodowanym aktywacją dopełniacza (CD46, CD55, CD59). W pracach poświęconych tym zagadnieniom badałam zmiany w ekspresji powyższych cząsteczek pod wpływem IL-1 β , TNF i IL-4 na chondrocytach izolowanych z ludzkich stawów skokowych pochodzących od pacjentów ze stopą końsko-szpotawą. Cytokiny prozapalne - IL-1 β , TNF podwyższały ekspresję wszystkich trzech cząsteczek zarówno na poziomie mRNA jak i białka, natomiast stymulacja cytokiną antyzapalną - IL-4 podwyższała wyłącznie ekspresję CD46. Można zatem przypuszczać, że podczas procesów zapalnych obejmujących chrząstkę stawową np. w RA, gdy wysokie jest miano przeciwciał anychondrocytarnych, i zachodzi aktywacja dopełniacza, prozapalne cytokiny podwyższając poziom ekspresji CD46, CD55 i CD59 przyczyniają się do ochrony chondrocytów przed atakiem dopełniacza.

Przeszczepianie osteoblastów (prace nr II.A.1, II.A.2, II.A.3)

Uczestniczyłam również w badaniach nad porównaniem właściwości osteoblastów pochodzących z różnych kości (czaszki, łopatki), przeszczepianych w różnych warunkach (domięśniowo - przeszczepy wolne, lub w zdewitalizowanych kościach pokrywy czaszki - przeszczepy podtrzymywane). Osteoblasty łopatkowe odtworzyły kość ze znacznie większymi wysepkami i przestrzeniami szpikowymi niż czaszkowe we wszystkich rodzajach przeszczepów. Zarówno osteoblasty łopatkowe jak i czaszkowe w przeszczepach wolnych odtworzyły kość z wysepkami większymi niż w przeszczepach podtrzymywanych. Mogło to być spowodowane różnymi siłami mechanicznymi działającymi na przeszczepione komórki, ale też zdewitalizowane kości w przeszczepach podtrzymywanych mogły stanowić barierę dla substancji odżywczych. Zatem zarówno warunki przeszczepiania jak i pochodzenie osteoblastów wpływały na rozmiar wysepek kostnych i jamy szpikowej.

Biologia rozrodu

Osobny rozdział moich zainteresowań, kontynuowany do dziś, dotyczy biologii rozrodu. Uczestniczyłam w badaniu kilku zagadnień tej dziedziny.

1. Aktywność komórek NK w prawidłowym cyklu menstruacyjnym, a także u pacjentek z mastalgią, zwłóknieniami gruczołu sutkowego, mastopatią, gruczolakowłóknikiem, guzami jajnika, mięśniakami macicy i endometriozą (prace II.A.6, II.D.3, II.D.4, II. D.5, II.D.6).

Ponieważ aktywność komórek NK może zapobiegać procesowi nowotworzenia, celem pierwszej pracy była ocena aktywności NK w komórkach krwi obwodowej u pacjentek z łagodnymi i złośliwymi guzami jajnika i z mięśniakami macicy (praca nr II.D.3). U wszystkich badanych pacjentek aktywność komórek NK była niższa niż u kobiet zdrowych, przy czym najniższą aktywność obserwowano u pacjentek ze złośliwymi zmianami w jajnikach. Ponieważ zwykle u takich pacjentek podwyższony jest poziom estrogenów w osoczu można przypuszczać, że te hormony odpowiadają za obniżenie aktywności komórek NK.

Celem kolejnych badań (nr II.A.6, II.D.4) było sprawdzenie korelacji cytotoksycznej aktywności komórek NK w krwi obwodowej w odniesieniu do poziomu estradiolu, progesteronu, lutropiny, folitropiny i prolaktyny u pacjentek z mastopatią. U wszystkich pacjentek poziom progesteronu był obniżony, a większość miała także obniżony poziom estradiolu. Aktywność komórek NK mieściła się w normalnym zakresie u wszystkich pacjentek, ale u pacjentek z niskim i wysokim poziomem estradiolu występował odpowiednio

niższy i wyższy poziom aktywności komórek NK. Wynik ten sugeruje, że prawdopodobnie u pacjentek z mastopatią estradiol może pośrednio lub bezpośrednio wpływać na cytotoksyczność komórek NK. Wysoki poziom estradiolu i niska aktywność komórek NK może stanowić zwiększone ryzyko powstania nowotworu.

U pacjentek z endometriozą również występowało znaczne obniżenie aktywności komórek NK niezależnie od stopnia zaawansowania choroby. Wynik ten sugeruje, że w przebiegu endometriozy występują nieprawidłowości w układzie odpornościowym. Ponieważ pacjentki z endometriozą poddane leczeniu danazolem miały prawidłową aktywność NK, zatem zahamowanie produkcji hormonów płciowych miało wpływ na naturalną aktywność cytotoksyczną (II.D.6). Wyniki te potwierdziły badania aktywności komórek NK w prawidłowym cyklu menstruacyjnym zdrowych kobiet, u których obniżenie aktywności NK występowało cyklicznie w okresie okołoolulacyjnym, gdy poziom estrogenu jest wysoki. (II.D.5).

2. Ekspresja greliny i receptora dla greliny w endometrium pacjentek z nawracającymi poronieniami.

Ponieważ grelina ulega ekspresji w endometrium i należy do modulatorów angiogenezy, celem pracy (nr II.A.19) było porównanie poziomu mRNA dla greliny, receptora dla greliny (GHS-R), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu A (VEGF A) i jego receptorów (VEGFR 1-3) w endometrium pacjentek z nawracającymi poronieniami (grupa badana) z poziomem mRNA dla tych genów w endometrium kobiet, które urodziły przynajmniej jedno dziecko (grupa kontrolna). Poziom mRNA dla greliny i VEGF A był wyższy w grupie badanej, zatem można przypuszczać, że białka te uczestniczą w patogenezie nawracających poronień. W grupie kontrolnej, ekspresja greliny pozytywnie korelowała z ekspresją VEGF A i VEGFR 1. W grupie badanej taka korelacja nie występowała.

Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Prace jako pierwszy lub korespondencyjny autor - prace oryginalne wchodzące w skład osiągnięcia nr 1,2,3,6,7, prace oryginalne niewchodzące w skład osiągnięcia nr II.A.7, II.A.13, II.A.20, II.A.21, II.D.12, artykuły przeglądowe wchodzące w skład osiągnięcia nr 4, 5, artykuł przeglądowy niewchodzący w skład osiągnięcia nr II.D.11.

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	9	1	13,695	155
Artykuły przeglądowe	1	2	0,524	25
Łącznie	10	3	14,219	180

Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	7	7	3,617	67

Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	17	3	32,408	273
Artykuły przeglądowe	3	4	3,384	57
Łącznie	20	7	35,792	330

Publikacje ogółem

Rodzaj publikacji	Liczba prac z IF	Liczba prac bez IF	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Oryginalne prace twórcze	24	10	36,025	340
Artykuły przeglądowe	3	4	3,384	57
Łącznie	27	14	39,409	397

1. Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (Web): **172** (bez autocytowań)

2. Indeks Hirscha według bazy Web of Science (Web): **10**
3. Impact factor dla publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **8,693**

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”.

Nawszawa, dn 07.05.2018

Anna Hyc