

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

dr n. med. Anna Bajek

**Katedra Urologii, Zakład Inżynierii Tkankowej
Wydział Lekarski
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Karłowicza 24
85-092 Bydgoszcz**

Bydgoszcz 2017

1. Imię i Nazwisko: **Anna Bajek**

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

2005 - dyplom magistra biologii

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł pracy magisterskiej: „Ekto- i egzo-enzymy naczyń krwionośnych i krwi świni”

Promotor: dr hab. Michał Komoszyński, prof. UMK

2005 - dyplom ukończenia Międzywydziałowego Studium Pedagogicznego przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu

2010 - dyplom doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Zakład Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Możliwości transdyferencji mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) szczura w komórki mięśniowe, badanie *in vitro*”

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Drewa

2011 - dyplom ukończenia studiów podyplomowych

Menadżer Projektu Badawczo-Rozwojowego

Wyższa Szkoła Bankowa w Poznaniu

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

od 26.09.2005 do 28.02.2011 - asystent w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 1.03.2011 do nadal - adiunkt w Zakładzie Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 2. 11. 2015 do nadal – p.o. kierownika Zakładu Inżynierii Tkankowej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

dodatkowo od 23.01.2012 do 31.05.2013 - pracownik naukowo-techniczny w Klinice Ortopedii Ogólnej, Onkologicznej i Traumatologii, Wydział Lekarski II, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a/ tytuł osiągnięcia naukowego:

**„Mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej,
badania eksperymentalne”**

b/publikacje wchodzące w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w Załączniku nr 4. Wartość IF wg JCR i punktację MNiSW dla poszczególnych publikacji podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, z wyjątkiem publikacji opublikowanych w roku 2017, dla których przyjęto IF i punktację MNiSW, jak w roku 2016.

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 6 publikacji, które uszeregowano tematycznie, a nie chronologicznie zgodnie z rokiem ich publikacji.

1. **Bajek A**, Olkowska J, Gurtowska N, Kloskowski T, Walentowicz-Sadłecka M, Sadłecki P, Grabiec M, Drewa T, 2014, *Human amniotic-fluid-derived stem cells: a unique source for regenerative medicine*, Expert Opin Biol Ther, 14(6): 831-839.

IF = 3,743; pkt MNiSW = 30

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i analizie piśmiennictwa. Współuczestniczyłam w napisaniu manuskryptu oraz redagowaniu tekstu w języku angielskim. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz odpowiadałam na recenzje jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na: 35%.

2. **Bajek A**, Gurtowska N, Olkowska J, Kaźmierski Ł, Maj M, Drewa T, 2016, *Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies*, Arch Immunol Ther Exp, 64(6): 443-454.

IF = 2,040; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy i analizie piśmiennictwa. Współuczestniczyłam w napisaniu manuskryptu oraz redagowaniu tekstu w języku angielskim. Prowadziłam korespondencję z edytorem oraz odpowiadałam na recenzje jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na: 40%.

3. **Bajek A**, Olkowska J, Walentowicz-Sadłecka M, Walentowicz P, Sadłecki P, Grabiec M, Bodnar M, Marszałek A, Dębski R, Porowińska D, Czarnecka J, Kaźmierski Ł, Drewa T, 2017, *High quality independent from a donor : Human Amniotic Fluid derived Stem Cells - a practical analysis based on 165 clinical cases*, J Cell Biochem, 118(1): 116-126.

IF = 3,085; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich koordynacji, przygotowaniu tabeli 1, analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu w języku angielskim, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje jako autor korespondencyjny. Współuczestniczyłam w izolacji i hodowli komórek macierzystych, optymalizacji warunków różnicowania, przygotowaniu ich do dalszych analiz, ocenie merytorycznej wyników oraz w ich opracowaniu. Mój udział procentowy szacuję na: 40%.

4. **Bajek A**, Gurtowska N, Olkowska J, Maj M, Kaźmierski Ł, Bodnar M, Marszałek A, Dębski R, Drewa T, 2017, *Does the harvesting technique affect the properties of adipose-*

derived stem cells? - The comparative biological characterization, J Cell Biochem, 118(5): 1097-1107.

IF = 3,085; pkt MNiSW = 25

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich koordynacji, analizie markerów pluripotencji (wyniki zostały przedstawione na rycinie 6), analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu w języku angielskim, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje jako autor korespondencyjny. Współuczestniczyłam w izolacji i hodowli komórek macierzystych oraz analizie merytorycznej wyników. Mój udział procentowy szacuję na: 50%.

5. **Bajek A**, Gurtowska N, Gackowska L, Kubiszewska I, Bodnar M, Marszałek A, Januszewski R, Michałkiewicz J, Drewa T, 2015, *Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells?*, Biosci Rep, 35(3): e00212, 1-9.

IF = 2,446; pkt MNiSW = 20

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich koordynacji, analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu w języku angielskim, prowadzeniu korespondencji z edytorem i odpowiedzi na recenzje jako autor korespondencyjny. Współuczestniczyłam w izolacji i hodowli komórek macierzystych, przygotowaniu ich do dalszej analizy fenotypowej oraz analizie merytorycznej wyników. Mój udział procentowy szacuję na: 50%.

6. **Bajek A**, Olkowska J, Walentowicz-Sadłecka M, Sadłecki P, Grabiec M, Porowińska D, Drewa T, Roszkowski K, 2017, *Human Adipose-Derived and Amniotic Fluid-Derived Stem Cells: a preliminary in vitro study comparing myogenic differentiation capability*, Med Sci Monitor; 23: DOI: 10.12659/MSM.905826.

IF = 1,585; pkt MNiSW = 15

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i ich koordynacji oraz analizie piśmiennictwa. Współuczestniczyłam w izolacji i hodowli komórek macierzystych, optymalizacji warunków różnicowania, analizie merytorycznej wyników, napisaniu manuskryptu w języku angielskim, odpowiedzi na recenzje oraz zgromadzeniu funduszy na opublikowanie pracy. Mój udział procentowy szacuję na: 45%.

Sumaryczny IF osiągnięcia = 15,984

Liczba punktów MNiSW = 140

c/omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania - wszystkie cytowania umieszczono w spisie piśmiennictwa.

Wprowadzenie

Termin „komórka macierzysta” współczesnego znaczenia nabrał w XX wieku, chociaż po raz pierwszy użyty został w 1868 roku [Ramalho-Santos i Willenbring, 2007]. Komórki macierzyste definiowane są jako komórki niskozróżnicowane, zdolne do nieograniczonej liczby podziałów, czyli samoodnawiania swojej populacji i wielokierunkowego różnicowania. Komórki te klasyfikuje się w zależności od źródła pochodzenia oraz potencjału do różnicowania w różne typy komórek [Bajek i wsp., 2011]. Obecność niehematopoetycznych komórek macierzystych w szpiku kostnym po raz pierwszy została zaobserwowana przez niemieckiego patologa Josepha Cohnheima ponad 130 lat temu. Jednakże niezbitych dowodów dostarczyła praca Friedensteina i wsp. Zespół badaczy w 1974 roku zidentyfikował w szpiku kostnym adherentną populację komórek, o fibroblastopodobnej morfologii, które dziś znane są jako mezenchymalne komórki macierzyste (MSC, ang. Mesenchymal Stem Cells) [Friedenstein i wsp., 1974]. Pojęcie to zostało spopularyzowane przez Caplana, który jako pierwszy opisał izolację mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego [Caplan, 1991].

Obecność komórek macierzystych o podobnych właściwościach do tych, które zostały zidentyfikowane w szpiku kostnym potwierdzono prawie we wszystkich tkankach organizmu, m.in. w kościach, skórze, mięśniach szkieletowych, krwi obwodowej oraz w tkankach płodowych i tkance tłuszczowej [Kuroda i wsp., 2011]. Pomimo, iż wszystkie te komórki określane są wspólnym mianem mezenchymalnych komórek macierzystych, należy pamiętać, że populacja ta jest heterogenna i różni się pewnymi cechami biologicznymi w zależności od źródła ich izolacji [Kalinina i wsp., 2011]. W 2006 roku Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowych (ISCT, ang. International Society for Cellular Therapy) zaproponowało trzy minimalne kryteria niezbędne do identyfikacji komórek MSC. Pierwsze to zdolność adhezji do powierzchni naczynia hodowlanego, drugie - ekspresja specyficznych antygenów powierzchniowych i trzecie - potencjał do różnicowania [Salem i wsp., 2010]. W świetle dzisiejszych badań nad biologią komórek macierzystych definicja ta jest mało specyficzna i zawodzi, szczególnie w przypadku komórek MSC izolowanych z różnych źródeł [Heo i wsp., 2015]. Od czasu identyfikacji komórek macierzystych w szpiku kostnym, komórki te uważane są jako uniwersalne narzędzie medycyny regeneracyjnej, głównie ze względu na ich dużą plastyczność oraz dużą żywotność podczas procesu izolacji [Lindroos

i wsp., 2011]. Aspiracja szpiku kostnego wiąże się jednak z inwazyjną i bolesną procedurą. Dlatego też, poszukuje się alternatywnych źródeł komórek macierzystych, które pozwolą na izolację wystarczającej liczby mezenchymalnych komórek macierzystych do celów terapeutycznych. Co więcej, komórki macierzyste wykorzystywane do celów klinicznych powinny spełniać następujące kryteria: duża dostępność, minimalnie inwazyjny proces ich pobierania, a także żywotność i możliwość wielokierunkowego różnicowania niezależnie od wieku dawcy. Wydaje się, że źródłami komórek, które spełniają powyższe wymagania są płyn owodniowy i tkanka tłuszczowa.

Płyn owodniowy należy do tkanek pozazarodkowych, które są doskonałym źródłem do badania charakterystycznych cech komórek MSC w nich zawartych. Pobranie płynu owodniowego jest zalecanym zabiegiem w przypadku m.in. podejrzenia wad genetycznych u płodu, a izolacja komórek macierzystych następuje z nadwyżki diagnostycznych tkanek prenatalnych, pod warunkiem świadomej i dobrowolnej zgody pacjentki oraz uzyskania zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej.

Pierwsze doniesienia o obecności komórek macierzystych w płynie owodniowym pojawiły się w 2001 roku [Kaviani i wsp., 2001], a prace nad ich właściwościami biologicznymi prowadzone są od 2003 roku. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego wykazują ekspresję wielu markerów, m.in. OCT4, DDES-4, CD90, czy CD44 [Tsai i wsp., 2006; Chambers i wsp., 2007]. Nie wykazują jednak ekspresji takich markerów, jak CD45, CD34 czy CD14 [In't Anker i wsp., 2003]. Są to komórki o dużym potencjale do wielokierunkowego różnicowania: w komórki pochodzenia mezodermalnego, w komórki endotelialne, a także w hepatocyty, keratynocyty, czy komórki nerwowe [De Coppi i wsp., 2007; Atala, 2009]. Mechanizmy odpowiedzialne za procesy różnicowania są jednak wciąż niewystarczająco poznane. Należy również pamiętać, że sterowanie procesem różnicowania jest znacznie trudniejsze w warunkach *in vivo*.

Tkanka tłuszczowa jest tkanką łączną charakteryzującą się dużą heterogennością pod względem morfologicznym, funkcjonalnym i regulatorowym [Furstenberg i wsp., 2010]. W przeszłości uważana była za bierny magazyn energii. Prawdziwego przełomu dokonano w 2001 roku, kiedy po raz pierwszy opisano nowe źródło somatycznych komórek macierzystych wyizolowanych z tkanki tłuszczowej [Zuk i wsp., 2001]. Tkanka tłuszczowa wydaje się być bogatym rezerwuarem komórek macierzystych, ze względu na jej dostępność w organizmie oraz możliwość pobierania jej w dużych ilościach, co wpływa na zwiększenie wydajności izolacji MSC i ogranicza konieczność długoterminowej hodowli *in vitro*, zmniejszając tym samym ryzyko aberracji chromosomowych [Uzbas i wsp., 2015; Baptista

i wsp., 2015]. Najczęściej tkankę tłuszczową uzyskuje się podczas zabiegów liposukcji. Każdego roku w Stanach Zjednoczonych przeprowadza się średnio 400 000 liposukcji, podczas których pobiera się od 0,1 do 3 litrów lipoaspiratu [Bunnell i wsp., 2008]. Metody izolacji komponentów komórkowych z tkanki tłuszczowej opierają się z kolei na izolacji dwóch frakcji: populacji dojrzałych adipocytów i frakcji naczyniowo-stromalnej (SVF, ang. Stromal Vascular Fraction) [Peinado i wsp., 2012]. Frakcja SVF zawiera multipotencjalne komórki macierzyste, które izolowane są metodami enzymatycznymi, wykorzystując jednocześnie ich zdolności adhezyjne [Lindroos i wsp., 2011]. Największą zaletą komórek macierzystych tkanki tłuszczowej jest ich duża liczebność. Z 1g tkanki możliwe jest wyizolowanie średnio $0,5-2,0 \times 10^6$ komórek frakcji SVF, co odpowiada 1-10% komórek macierzystych [Bear i wsp., 2013]. Komórki te wykazują ekspresję następujących markerów: CD13, CD29, CD44, CD49b, CD90 i CD105 i nie wykazują ekspresji markerów hematopoetycznych: CD14, CD31, CD45 i CD144 [Zuk i wsp., 2013]. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć wiele niejasności związanych z nazewnictwem populacji komórek macierzystych w tkance tłuszczowej. W związku z tym w 2004 roku zdecydowano o przyjęciu terminu ASC (ang. Adipose Derived Stem Cells) opisującego adherentną i multipotencjalną populację komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej.

Mimo dokonania ogromnego postępu w badaniach nad biologią komórek macierzystych, zastosowanie ich w praktyce klinicznej jest nadal problematyczne. Kilkadziesiąt zarejestrowanych badań klinicznych z użyciem mezenchymalnych komórek macierzystych nie daje wyników jednoznacznie potwierdzających efektywność tego typu terapii. To, czy komórki te kiedykolwiek będą częścią standardowo stosowanych metod leczenia pozostawia wiele pytań i wątpliwości. Mezenchymalne komórki macierzyste otrzymywane są z różnych źródeł, różnymi metodami związanymi z ich izolacją i hodowlą. Może mieć to ogromny wpływ na ich przydatność w praktyce klinicznej i uzyskane wyniki. Dlatego też, analiza ich właściwości biologicznych może być niezwykle pomocna w ich potencjalnym zastosowaniu w codziennej praktyce klinicznej.

Celem naukowym prezentowanego cyklu prac było:

- przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej płodowych komórek macierzystych, ich charakterystyka fenotypowa oraz potencjalne zastosowanie w terapiach komórkowych (praca nr 1),
- przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej charakterystycznych cech biologicznych mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC) oraz ich potencjału

regeneracyjnego i aplikacji klinicznych w oparciu o zarejestrowane badania kliniczne (praca nr 2),

- kompleksowa analiza właściwości biologicznych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego oparta na 165 klinicznych próbach i szeroka statystyczna analiza korelacji pomiędzy charakterystyką pacjenta a sukcesem zakładania hodowli komórek macierzystych płynu owodniowego, w warunkach *in vitro* (praca nr 3),

- kompleksowa analiza właściwości biologicznych ludzkich komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC) pobieranej różnymi metodami: resekcja chirurgiczna, liposukcja wspomaganą maszynowo i liposukcja laserowa (praca nr 4),

- analiza 242 markerów powierzchniowych oraz określenie różnic fenotypowych pomiędzy mezenchymalnymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ASC) pobieranej różnymi technikami liposukcji (praca nr 5),

- analiza porównawcza potencjału do różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej w mięśnie szkieletowe i gładkie, pod wpływem jednakowych czynników różnicujących (praca nr 6).

Omówienie uzyskanych wyników

Cykl sześciu prac wchodzących w zakres zgłaszanego osiągnięcia naukowego dotyczy analizy właściwości biologicznych (m.in. fenotypu immunologicznego i potencjału do różnicowania) ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej.

Historia komórek macierzystych jest dość długa, pierwsze wzmianki pojawiły się pod koniec XIX wieku. Wówczas jednak określano je jako krwiotwórcze komórki prekursorowe. W ostatnich latach definicja ta została znacznie rozszerzona i rozbudowana. Obecnie uważa się, że komórki macierzyste są komórkami niskozróżnicowanymi o dużym potencjale proliferacyjnym i regeneracyjnym. Pomimo jednak tak długiej historii badań nad biologią komórek macierzystych, a w szczególności mezenchymalnych komórek macierzystych, określenie ich dokładnego fenotypu i wskazanie specyficznego, unikatowego markera niezbędnego do ich identyfikacji wciąż pozostaje wyzwaniem.

Tematem komórek macierzystych zainteresowałam się pod koniec 2006 roku, po odbyciu stażu w Laboratorium Inżynierii Tkankowej, kierowanym przez prof. Michaela Sittingera, Medycznego Uniwersytetu Charite w Berlinie. Przez pierwsze trzy lata mojej pracy naukowej optymalizowałam warunki izolacji i hodowli szczurzych mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego, a także podejmowałam próby

indukowania ich różnicowania w kierunku komórek mięśniowych. Zwieńczeniem tej pracy było uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych w 2010 roku, z zakresu możliwości transdiferencjacji komórek macierzystych szpiku kostnego w kierunku komórek mięśniowych. Następnie pracowałam nad biologią komórek macierzystych, izolowanych jednak z różnych źródeł. Nawiązanie współpracy z Katedrą Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej CM UMK, Katedrą Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej i Endokrynologicznej CM UMK, a także z prywatnymi klinikami: Centrum Medyczne Bieńkowski i Centrum Medyczne Laser-Med w Bydgoszczy zaowocowało prowadzeniem badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi izolowanymi z płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej, które kontynuowane są do chwili obecnej. Na wszystkie badania z użyciem zwierzęcych i ludzkich komórek macierzystych uzyskałam zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej.

Praca nr 1: Bajek A, Olkowska J, Gurtowska N, Kloskowski T, Walentowicz-Sadłecka M, Sadłecki P, Grabiec M, Drewa T. Human amniotic-fluid-derived stem cells: a unique source for regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther.* 2014; 14: 831-839.

Praca nr 2: Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kaźmierski Ł, Maj M, Drewa T. Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp.* 2016; 64: 443-454.

Wstęp do cyklu prac oparto na artykułach poglądowych, dotyczących właściwości biologicznych, a także aplikacji klinicznych mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego (praca nr 1) i tkanki tłuszczowej (praca nr 2). Na immunofenotyp komórek macierzystych wpływa wiele czynników, m. in. metoda izolacji i warunki hodowli *in vitro*. Dane literaturowe z ośrodków naukowych na całym świecie wskazują na ogromną liczbę różnych protokołów izolacyjnych i hodowlanych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z płynu owodniowego. Dlatego też, w pracy nr 1 przeanalizowano te metody i wyodrębniono pięć głównych grup: selekcja komórek na podstawie obecności markera powierzchniowego CD117, krótkoterminowe hodowle w celu izolacji kolonii komórek fibroblasto-podobnych, mechaniczna izolacja komórek progenitorowych, jednoetapowa hodowla komórek do momentu pojawienia się kolonii komórek progenitorowych oraz hodowla dwuetapowa zakładająca ponowne założenie hodowli amniocytów, nie ulegających adhezji. Określenie warunków efektywnej izolacji,

a także hodowli komórek MSC jest kwestią kluczową, mającą wpływ na liczbę uzyskanych komórek a także na ich potencjał regeneracyjny, co jest szczególnie ważne dla ich zastosowania w praktyce klinicznej. Nie mniej ważnym aspektem jest utrzymanie multipotencjalnego charakteru komórek macierzystych. Dyskusja nad koncepcją plastyczności komórek, czyli zdolności zmiany swojego fenotypu i przekroczenia bariery jej pochodzenia, z określonego listka zarodkowego, ma długą historię. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego ulegają typowemu różnicowaniu w komórki pochodzenia mezodermalnego. Wykazano jednak, że mogą one różnicować się także w inne typy komórek, chociaż mechanizm jest wciąż słabo poznany, co tym samym wzbudza wiele kontrowersji. Różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego w warunkach *in vitro* w określonym kierunku wymaga zastosowania specyficznych czynników wzrostu lub związków chemicznych o właściwościach różnicujących. W pracy nr 1 zebrano i opisano najczęściej stosowane czynniki determinujące różnicowanie. Opisano również wybrane dotychczasowe aplikacje kliniczne ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego. Niestety, pomimo zadowalających rezultatów *in vitro*, niewiele jest pozytywnych efektów *in vivo*, które potwierdzałyby realne działanie terapii komórkowych z zastosowaniem tych komórek. W związku z tym podjęto próbę analizy dlaczego terapie komórkowe zawodzą. Podstawowym ograniczeniem jest trudność przeniesienia wyników uzyskanych w warunkach *in vitro* na grunt badań *in vivo*. Co więcej, warunki *in vitro* mogą wpływać na zmniejszenie tempa proliferacji, utratę multipotencjalności, a także znacząco wpływać na indukcję starzenia się komórek macierzystych. Nie wiadomo także, czy przeszczepione mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego zachowują swój stan niezróżnicowania wspierając długoterminowy efekt terapeutyczny. Z punktu widzenia klinicznych efektów, kluczowa jest integracja komórek przeszczepionych z uszkodzonymi tkankami czy narządami. Nie ma także jednoznacznych protokołów standaryzujących liczbę przeszczepianych komórek, liczbę iniekcji, a także sposobów ich aplikacji. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe aspekty, przed podjęciem decyzji o przeszczepieniu mezenchymalnych komórek macierzystych należy odpowiedzieć na następujące pytania: Czy komórki macierzyste są w stanie zachować żywotność i proliferację w miejscu docelowym? Czy przeszczepione komórki akumulują się tylko w uszkodzonych tkankach, czy wspomagają również proces regeneracji przez efekt parakryny? Czy efekty kliniczne przeszczepionych komórek macierzystych przewyższają konwencjonalne metody leczenia? Czy komórki macierzyste są podatne na transformację nowotworową pod wpływem czynników stosowanych w hodowli *in vitro*?

Podsumowując, praca nr 1 przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z płynu owodniowego jako wartościowego narzędzia inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej, z jednoczesnymi ograniczeniami ich zastosowania w praktyce klinicznej.

Celem pracy nr 2 było, oprócz przeglądu piśmiennictwa dotyczącego biologii komórek macierzystych tkanki tłuszczowej, metod ich izolacji, charakterystyki immunofenotypu i stabilności genetycznej, przedstawienie potencjału regeneracyjnego komórek i ich aplikacji klinicznych na podstawie zarejestrowanych badań klinicznych. Za potencjał regeneracyjny komórek macierzystych najprawdopodobniej odpowiedzialnych jest kilka mechanizmów. Najczęściej opisywanym i powszechnie akceptowanym jest proces różnicowania w określone typy komórek. Badania identyfikujące komórki po przeszczepieniu nie potwierdzają jednak całkowitego i funkcjonalnego różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych. Być może jest to spowodowane "pośrednim" fenotypem, w którym obserwuje się ekspresję markerów specyficznych dla komórek zróżnicowanych, bez osiągnięcia ich funkcjonalności. Innym wyjaśnieniem może być jeszcze mechanizm opierający się na wspomaganie aktywności endogennej puli komórek macierzystych poprzez np. wydzielanie specyficznych czynników wzrostu i cytokin.

Mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (ASC) po raz pierwszy w praktyce klinicznej zostały zastosowane w 2004 roku. Od tego momentu liczba badań klinicznych oceniająca skuteczność tych komórek w procesie naprawy i regeneracji tkanek i narządów jest imponująca. Według ogólnoświatowej bazy badań klinicznych (clinicaltrials.gov) w roku pisania pracy nr 2 (2015 rok) zarejestrowanych było 122 badań. Badania te dotyczyły m.in. defektów kostnych, cukrzycy, choroby Crohn'a i wielu innych. Jednakże większość z nich była wówczas w początkowej fazie. Warto podkreślić jest również fakt, iż badania te zasadniczo różniły się od siebie, m.in. liczbą przeszczepianych komórek macierzystych. Podsumowując, pomimo wielu badań klinicznych stosujących mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej, wciąż brakuje doniesień jednoznacznie wskazujących na efektywność tego typu terapii komórkowych. Najprawdopodobniej wynika to przede wszystkim z niedostatecznej wiedzy dotyczącej właściwości biologicznych komórek macierzystych, ich potencjału regeneracyjnego oraz zajmowanych nisz.

Praca nr 3: Bajek A, Olkowska J, Walentowicz-Sadłecka M, Walentowicz P, Sadłecki P, Grabiec M, Bodnar M, Marszałek A, Dębski R, Porowińska D, Czarnecka J, Kaźmierski Ł, Drewna T. High quality independent from a donor : Human Amniotic Fluid derived Stem Cells - a practical analysis based on 165 clinical cases. J Cell Biochem, 2017; 118: 116-126.

Celem pracy nr 3 była kompleksowa analiza biologicznych właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z płynu owodniowego. Płyn owodniowy został pobrany od 165 pacjentek, u których przeprowadzano amniopunkcję ze wskazań medycznych. Jednocześnie została przeprowadzona szeroka analiza statystyczna korelacji pomiędzy klinicznymi parametrami każdej pacjentki a sukcesem założenia hodowli pierwotnej komórek macierzystych. Na wszystkie przeprowadzone procedury została uzyskana zgoda Lokalnej Komisji Bioetycznej, a każda pacjentka podpisała zgodę na udział w badaniu.

Płyn owodniowy zawiera obiecującą, z klinicznego punktu widzenia, populację komórek macierzystych. Jednakże sporne kwestie dotyczące ich pochodzenia, czy też biologicznych właściwości nie zostały do tej pory rozwiązane. W związku z tym dokładna analiza tych komórek jest niezbędna. W tym celu płyn owodniowy został pobrany pomiędzy 14 a 27 tygodniem ciąży u pacjentek w wieku od 18 do 46 lat. W przedstawionej pracy analizowano kinetykę wzrostu komórek macierzystych, ich klonogenność, różnicowanie *in vitro*, kariotyp, proces starzenia, a także ich immunofenotyp.

W początkowym etapie hodowli obserwowano komórki o dwóch różnych morfologiach: epitelialno- i fibroblasto-podobnej. Jednakże po drugim pasażu uzyskano homogeną populację komórek, które oznaczono jako mezenchymalno-podobne komórki macierzyste. Obliczony czas podwojenia populacji dla tych komórek wynosił 62 godziny i był różny od doniesień literaturowych. W naszej opinii decydującym czynnikiem wpływającym na tę zmienność może być procedura izolacji komórek. Oceniona została także kinetyka wzrostu i wyizolowane przez nas komórki macierzyste cechował wysoki potencjał proliferacyjny. Kolejnym krokiem w analizie właściwości biologicznych było badanie ekspresji markerów powierzchniowych z użyciem cytometrii przepływowej. Komórki macierzyste płynu owodniowego wykazywały ekspresję takich markerów, jak CD44 i CD90 oraz brak CD34 i CD45, co jest w zgodzie z rekomendacją Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowych. Dodatkowo przeanalizowano ekspresję markerów pluripotencji, gdyż często w piśmiennictwie sugeruje się, iż komórki te mogą wykazywać taką aktywność. Zidentyfikowano obecność hNanog, Oct3/4 i Sox2, ale w bardzo niewielkich ilościach.

Natychmiast po izolacji (pasaż 0) liczba pozytywnie wyznakowanych komórek wynosiła 1%, po drugim pasażu maksymalnie wzrosła do 1,8%. Różne grupy badawcze uzyskują odmienną liczbę pozytywnie wyznakowanych komórek, zazwyczaj jednak niewielką. Może to świadczyć o tym, że komórki w hodowli *in vitro* tracą tę, niezwykle ważną i pożądaną w praktyce klinicznej, właściwość. Wyniki, przedstawione w pracy nr 3, dotyczące różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty pozostają w zgodzie z dostępnym piśmiennictwem, mówiącym o wysokim potencjale do wielokierunkowego różnicowania tych komórek.

W wielu prowadzonych przeze mnie hodowlach pierwotnych komórek macierzystych, izolowanych z różnych źródeł, obserwowałam nasilający się proces starzenia komórek wraz z upływem czasu i w następujących pasażach. Wydaje się to niezwykle istotną kwestią w przypadku brania pod uwagę potencjalnego zastosowania tych komórek w praktyce klinicznej. Pomimo powszechnie znanego i dostępnego markera starzenia się komórek, jakim jest β -galaktozydaza, nie znalazłam wówczas w piśmiennictwie informacji na temat tego procesu w komórkach macierzystych płynu owodniowego. Wyniki przedstawione w pracy nr 3 i dotyczące procesu starzenia się ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z płynu owodniowego są innowacyjne. Biochemiczna ocena aktywności β -galaktozydazy wykazała stały wzrost tego enzymu do 5 pasażu komórek, po którym aktywność ta gwałtownie rosła. Dodatkowo, wraz ze wzrostem aktywności β -galaktozydazy obserwowano również zmiany morfologiczne, które jednoznacznie wskazywały na postępujący proces starzenia się komórek. Utrzymanie hodowli możliwe było tylko do 15 pasażu, po którym aktywność proliferacyjna została zahamowana. Nie wiadomo co może mieć wpływ na tak gwałtowny proces starzenia się komórek. Być może wiek ciąży, być może dodatkowe czynniki matczyne lub płodowe, bądź też metoda izolacji lub warunki hodowli *in vitro*. Przed wprowadzeniem mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego do grupy konwencjonalnych metod leczenia konieczne jest przeprowadzenie wielu dodatkowych badań. Pomimo tej świadomości, nie znalazłam żadnych danych statystycznych próbujących przeanalizować chociażby parametry pacjentek lub płodu, mogące mieć wpływ na wyizolowane komórki. Dlatego też, taką analizę z wyselekcjonowanymi czynnikami, które w mojej ocenie mogą mieć największy wpływ na hodowlę *in vitro*, wykonano. Wszystkie kliniczne parametry analizowane były w odniesieniu do sukcesu założenia hodowli pierwotnej mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego, czyli do komórek ulegających adhezji i pasażowaniu. Grupa 165 pacjentek została podzielona na dwie grupy wiekowe 18-35 lat vs 36-46 lat.

Nie zauważono istotnej różnicy statystycznej pomiędzy obiema grupami w przypadku różnej gęstości wysiewanych komórek, czasu transportu, czystości próbki, płci płodu, kariotypu płodu, wad wrodzonych, czy też wieku kobiet. Pomimo braku różnic statystycznych obserwowano trend faworyzujący jednak młodszą grupę pacjentek.

Podsumowując, praca nr 3 jest pierwszą, w której wyizolowano ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego z tak dużej grupy pacjentek. Wykazano, że komórki te charakteryzują się podobnymi właściwościami biologicznymi, co inne mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z różnych źródeł. W mojej opinii jednak, jednym z możliwych ograniczeń aplikacyjnych może być proces starzenia się tych komórek.

Praca nr 4: Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Maj M, Kaźmierski Ł, Bodnar M, Marszałek A, Dębski R, Drewa T. Does the harvesting technique affect the properties of adipose-derived stem cells? - The comparative biological characterization. *J Cell Biochem*, 2017; 118: 1097-1107.

Minęło wiele lat od momentu zidentyfikowania mezenchymalnych komórek macierzystych w tkance tłuszczowej. Przez ten czas intensywnych badań wydaje się, że tkanka tłuszczowa jest doskonałym źródłem komórek macierzystych, które izolowane są w dużych ilościach przy relatywnie mało inwazyjnej procedurze liposukcji. Liposukcja jest najczęściej wykonywanym zabiegiem estetycznym na całym świecie. Obecnie dostępnych jest kilka technik liposukcji, nie jest jasne natomiast, która z nich jest najlepszą pod kątem izolacji populacji komórek macierzystych użytecznych do celów terapeutycznych.

Przedmiotem pracy nr 4 była szeroka analiza porównawcza właściwości biologicznych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASC) pozyskiwanych różnymi metodami: zabieg operacyjny, liposukcja wspomagana maszynowo i liposukcja wspomagana laserowo. Tkanka tłuszczowa była pobierana zgodnie z procedurami zaakceptowanymi przez Lokalną Komisję Bioetyczną, od wszystkich dawców uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu.

Rodzaj zabiegu, podczas którego pobierana jest tkanka tłuszczowa może niekorzystnie wpłynąć nie tylko na liczbę wyizolowanych komórek macierzystych, ale także na ich żywotność. Biorąc pod uwagę możliwość zastosowania tych komórek w leczeniu nie jest to korzystne i może ograniczyć ich aplikację. Znacząca większość przeprowadzonych do tej pory badań związanych z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej dotyczy komórek uzyskiwanych podczas tradycyjnej liposukcji zasysającej. Jednakże

nieustannie poszukuje się mniej inwazyjnych technik, chociaż dostępność badań oceniających ich wpływ na biologię komórek macierzystych jest znikoma. Największą zaletą mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej jest możliwość uzyskania dużej liczby komórek (od 5 tys - 3,5 mln / 1g tkanki tłuszczowej). Na taką różnicę w liczbie wyizolowanych komórek wpływ mają cechy pacjentów: płeć, rasa, indeks BMI, a także rodzaj tkanki tłuszczowej (żółta/brazowa). Nie bez znaczenia jest także lokalizacja pobieranej tkanki tłuszczowej, metoda izolacji i warunki hodowli *in vitro*.

Zasadniczym celem badań prezentowanych w pracy nr 4 była odpowiedź na pytanie, czy metoda pobierania tkanki tłuszczowej ma wpływ na właściwości biologiczne uzyskanych komórek macierzystych. Największą liczbę komórek udało się uzyskać z tkanki stałej, pobieranej podczas zabiegów chirurgicznych, u pacjentów ze wskazaniami do chirurgicznego leczenia otyłości i operowanych z powodu przepuklin powłok brzusznych. Nie wykazano natomiast znaczących różnic w liczbie komórek uzyskanych obiema metodami liposukcji. Mniejsza liczba komórek wyizolowanych z obu lipoaspiratów może być spowodowana szkodliwym działaniem lasera, bądź też roztworem infiltracyjnym stosowanym podczas liposukcji wspomaganą maszynowo. Nie mniej jednak, pomimo mniejszej liczby komórek uzyskanych z lipoaspiratów nadal jest to bogate źródło mezenchymalnych komórek macierzystych, chociażby w porównaniu do szpiku kostnego. Podobną tendencję zaobserwowano przy analizie klonogenności, czy kinetyce wzrostu komórek. Osiągnięcie pozytywnych efektów leczenia z zastosowaniem komórek macierzystych wymaga uzyskania ogromnej ich liczby. Na ogół wiąże się to z koniecznością wcześniejszego namnożenia ich w warunkach *in vitro*, co może mieć znaczący wpływ na właściwości komórek macierzystych. Dlatego też, niezwykle istotne dla bezpieczeństwa tego typu terapii jest określenie czynników mających wpływ na strukturę i czynność komórek. Jednym z takich czynników jest proces starzenia, który oceniony został przy pomocy testu z β -galaktozydazą. Potwierdziliśmy wzrost aktywności tego enzymu we wszystkich trzech grupach badanych. Najwolniej jednak temu procesowi podlegały komórki macierzyste izolowane z tkanki uzyskiwanej podczas zabiegów liposukcji wspomaganą laserowo. Niski poziom β -galaktozydazy utrzymywał się do 5 pasaży, a zmian morfologicznych nie zaobserwowano nawet do pasaży 9. Najszybciej natomiast starzeniu ulegały komórki izolowane z tkanki stałej. Wydaje się, że wpływ na to może mieć charakterystyka dawców. Najczęściej byli to pacjenci ze znaczną otyłością, która z całą pewnością ma wpływ na aktywność β -galaktozydazy.

Kolejnym etapem analiz porównawczych prezentowanych w pracy nr 4 była ocena stabilności fenotypowej mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej. W tym celu przeanalizowano ekspresję takich markerów powierzchniowych, jak CD90, CD44, CD34 i CD45 po 1, 3 i 5 pasażu. Wszystkie trzy grupy cechowała wysoka i stabilna, podczas hodowli, ekspresja markerów CD90 i CD44. Zaś ekspresja CD45 była niewielka i malała w każdym kolejnym pasażu, co wskazuje na brak zanieczyszczenia komórkami hematopoetycznymi. Obecność markera CD34 na powierzchni mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej jest kwestią dyskusyjną. Najprawdopodobniej pojawia się na wczesnym etapie hodowli, stopniowo zanikając w kolejnych pasażach, na co wpływ mogą mieć m.in. warunki hodowli. Monitorując poziom ekspresji tego markera we wszystkich trzech grupach badanych zaobserwowano jego spadek w czasie trwania hodowli *in vitro*. Być może wskazuje to także na indukcję procesu różnicowania. Przeprowadzono również analizę cytometryczną markerów embrionalnych: hNanog, Oct3/4 oraz Sox2, która nie wykazała ich ekspresji w żadnej z trzech grup badanych. Wyniki dotyczące ekspresji tych markerów, dostępne w piśmiennictwie, są sprzeczne. Z jednej strony tłumaczy się je różnymi warunkami hodowli, z drugiej jednak bierze się również pod uwagę wiek dawcy tkanki tłuszczowej.

W końcowym etapie badań potwierdzono również, iż mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej pobieranej trzema różnymi metodami wykazują potencjał do różnicowania w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty.

Podsumowując, wyniki przedstawione w pracy nr 4 wskazują, iż metoda pozyskiwania tkanki tłuszczowej wpływa na część właściwości wyizolowanych z niej komórek macierzystych. Są to m.in. liczba wyizolowanych komórek, klonogenność czy czas podwojenia populacji. Biorąc jednak pod uwagę wszystkie aspekty i aktualny stan wiedzy, uważam, że najlepszą metodą dla celów klinicznych pozostaje jednak liposukcja wspomagana maszynowo. Decydującym czynnikiem jest wysoki potencjał proliferacyjny z jednoczesnym wolnym procesem starzenia się komórek macierzystych. Z całą jednak pewnością konieczne są szczegółowe badania dodatkowych aspektów związanych z możliwością przechowywania/mrożenia tych komórek w celu ich późniejszych aplikacji klinicznych.

Praca nr 5: Bajek A, Gurtowska N, Gackowska L, Kubiszewska I, Bodnar M, Marszałek A, Januszewski R, Michałkiewicz J, Drewa T. Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells? *Biosci Rep*, 2015; 35: 1-9.

Różne metody liposukcji i brak specyficznego markera dla mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej skłoniły mnie do podjęcia próby analizy 242 markerów powierzchniowych oraz określenia różnic immunofenotypowych pomiędzy mezenchymalnymi komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej otrzymanej przy pomocy liposukcji wspomaganą maszynowo i liposukcji laserowej. Do analizy tej wykorzystano komercyjnie dostępny panel Lyoplate, zawierający 242 oczyszczone przeciwciała monoklonalne oraz kontrole izotypowe, mające na celu izotypowo-specyficzną ocenę tła. Bazując na danych zawartych w piśmiennictwie, mówiących o tym, że różne czynniki (np. wiek, czy indeks BMI) mogą wpływać na fenotyp komórek macierzystych, do badań wybrano pacjentów o podobnych parametrach. Pozwoliło to uniknąć dodatkowych zmiennych, mogących mieć wpływ na rzetelność uzyskanych wyników. Szeroka analiza fenotypowa wykazała, w obu grupach badanych, wysoką ekspresję markerów charakterystycznych dla mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z różnych źródeł. Były to CD13, CD29, CD73, CD105 i CD166. Obie grupy komórek wykazywały również obecność CD90 i CD44, markerów typowych dla komórek macierzystych. Zaobserwowano również niską ekspresję CD11b, CD14, CD31 i HLA-DR. Charakterystyczny marker dla hematopoetycznych komórek progenitorowych CD34 obecny był w obu populacjach badanych komórek. Jednakże, wyższą ekspresję odnotowano w grupie komórek uzyskanych metodą liposukcji laserowej. Chociaż rola markera CD34 jest dobrze opisana w piśmiennictwie, jego ekspresja w komórkach macierzystych tkanki tłuszczowej wzbudza wiele kontrowersji. Niektóre badania sugerują, że może to świadczyć o niedojrzałości komórek macierzystych. W naszych wcześniejszych analizach zaobserwowaliśmy spadek ekspresji CD34 w kolejnych pasażach komórek, co może wskazywać na zaindukowany proces różnicowania. Istotne różnice statystyczne, pomiędzy mezenchymalnymi komórkami macierzystymi uzyskanymi podczas liposukcji wspomaganą maszynowo i liposukcji laserowej, wykazano dla 58 z 242 markerów. Warty podkreślenia jest fakt, iż ekspresja markerów charakterystycznych dla komórek tkanki tłuszczowej była podobna w obu grupach badanych.

Przeprowadzona analiza będąca przedmiotem pracy nr 5 jest pierwszą tak szeroką próbą badania ekspresji markerów w zależności od rodzaju liposukcji.

Podsumowując, w mojej opinii metoda liposukcji nie wpływa znacząco na profil immunofenotypowy komórek macierzystych wyizolowanych z tkanki tłuszczowej. Jest to również krok naprzód w standaryzacji procedury transplantacji komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w aplikacjach klinicznych.

Praca nr 6: Bajek A, Olkowska J, Walentowicz-Sadłecka M, Sadłecki P, Grabiec M, Porowińska D, Drewa T, Roszkowski K. Human Adipose-Derived and Amniotic Fluid-Derived Stem Cells: a preliminary in vitro study comparing myogenic differentiation capability. *Med Sci Monitor.* 2017; 23: DOI: 10.12659/MSM.905826.

Różnicowanie komórek macierzystych w kierunku określonego fenotypu wymaga zastosowania specyficznych czynników wzrostu, czy też innych chemicznych czynników o właściwościach różnicujących. Molekularny mechanizm leżący u podstaw różnicowania komórek macierzystych jest w dużej mierze nieznany.

Celem pracy nr 6 było porównanie możliwości różnicowania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej (ASC) i płynu owodniowego w kierunku mięśni szkieletowych i gładkich.

Całkowita regeneracja mięśni i odzyskanie ich prawidłowych funkcji wciąż pozostaje ogromnym wyzwaniem. Zaangażowanie komórek macierzystych w regenerację mięśni wzbudza wielkie nadzieje na nowoczesne terapie, które mogą być zastosowane w przypadku redukcji endogennej populacji komórek progenitorowych. Zdolność komórek mięśni szkieletowych do regeneracji możliwa jest dzięki obecności jednojądrowej populacji komórek mięśniowych, zwanych komórkami satelitarnymi. Niestety, uzyskanie wystarczającej liczby komórek satelitarnych do aplikacji klinicznych jest niemożliwe. Dlatego też nieustannie poszukuje się dodatkowych źródeł komórek o miogennym potencjale. Pomimo różnych protokołów, stosowanych przy różnicowaniu, skuteczność wciąż jest niewielka, co wskazuje na konieczność standaryzacji metod różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w kierunku komórek mięśniowych.

W pracy nr 6 indukcja różnicowania obu populacji komórek w kierunku mięśni szkieletowych uzyskana została poprzez medium kondycjonowane, uzyskane z hodowli ludzkiej linii mięśni szkieletowych dostępnej komercyjnie. Ekspresja specyficznych markerów oceniona została przy pomocy qPCR. Wykazano obecność α -aktyny, desminy i miogeniny, markerów mięśni szkieletowych, w poddawanych różnicowaniu mezenchymalnych komórkach macierzystych

tkanki tłuszczowej. Jednakże ekspresja dwóch z nich, α -aktyny i miogeniny, była niewielka. W różnicujących się komórkach macierzystych płynu owodniowego zaobserwowano zaś ekspresję tylko jednego markera, α -aktyny - również na bardzo niskim poziomie. Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników i dostępnego piśmiennictwa, w mojej opinii regeneracja mięśni szkieletowych możliwa jest raczej poprzez efekt parakryny aniżeli bezpośrednio różnicowanie się komórek macierzystych.

Przedmiotem pracy nr 6 była również próba różnicowania obu populacji komórek w kierunku mięśni gładkich. Zgodnie z opublikowanymi informacjami, dotyczącymi somatycznych komórek macierzystych czynnikami, które indukują ww. różnicowanie są TGF- β 1, PDGF, kwas askorbinowy i kwas retinowy. W opisywanej pracy zastosowano czynnik TGF- β 1, ze względu na jego udział w regulacji procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. Po 14 dniach od zaindukowania różnicowania zaobserwowano ekspresję desminy, kalponiny-1, miozyny-11 i transgeliny w komórkach macierzystych tkanki tłuszczowej, podczas gdy w komórkach macierzystych płynu owodniowego tylko dwa markery: kalponinę-1 i transgelinę.

W 2013 roku wskazano na możliwość różnicowania się komórek macierzystych płynu owodniowego w kierunku mięśni gładkich. Jednakże, w pracy nr 6 po raz pierwszy zastosowano do procesu różnicowania komórek macierzystych płynu owodniowego czynnik TGF- β 1. Ze względu na ograniczoną liczbę danych związanych z różnicowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego w komórki mięśni gładkich uzyskane przeze mnie wyniki w większości porównywane były do mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego. Kalponina uważana jest za wczesny marker różnicowania mięśni gładkich, a jedynym specyficznym markerem jest łańcuch ciężki miozyny, którego w moich badaniach nie zaobserwowałam. Uważa się jednak, że marker ten ulega ekspresji w późnym stadium różnicowania w komórki mięśni gładkich, więc w mojej opinii to jest główny powód jego braku. Należy pamiętać także, iż niezwykle trudno jest uzyskać w warunkach *in vitro* całkowicie zróżnicowane i funkcjonalne komórki. Co więcej, większość aktualnych doniesień wskazuje na aktywację specyficznych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych w procesie dyferencjacji. Dlatego też, na podstawie wyników uzyskanych w pracy nr 6 uważam, że dalsze badania nad różnicowaniem w kierunku mięśni gładkich powinny obejmować hodowlę mieszaną, tzw. ko-kulturę mięśni gładkich i komórek macierzystych, a także zwierzęcy model *in vivo* z zaindukowanym uszkodzeniem mięśni gładkich.

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki dowodzą, że w obu typach komórek macierzystych zaindukowanie procesu różnicowania w kierunku komórek mięśniowych jest możliwe. Należy jednak zaznaczyć, iż efektywność tego procesu jest niewielka. Zaobserwowałam również różnice w podatności komórek obu populacji na proces różnicowania. Wydaje się, iż mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej są bardziej wrażliwe na czynniki różnicujące. Jednakże, do kompletnego procesu regeneracyjnego, oprócz przeróżnicowania się komórek i zasiedlenia przez nie tkanki docelowej, potrzebna jest też całkowita funkcjonalność przeszczepionych komórek. W tym celu w przyszłości należałoby skupić się na modelu *in vivo*. W mojej opinii kluczowym będzie również wystandaryzowanie protokołów różnicowania, a także samych mediów różnicujących w kierunku mięśni szkieletowych i gładkich.

Podsumowanie

Przedmiotem wielu aktualnie prowadzonych eksperymentów jest ocena przydatności komórek macierzystych do regeneracji tkanek i narządów. Terapie komórkowe wciąż stanowią alternatywę do klasycznych metod leczenia. Szczególnym wyzwaniem jest uzyskanie dużej liczby komórek macierzystych, które nie tylko będą spełniały funkcję regeneracyjną, ale także pobudzą czy uzupełnią istniejącą endogenną pulę, tak aby zapewnić trwałą efekt leczenia. Wyniki przedstawione w opisanych powyżej pracach, zgłaszanych jako osiągnięcie naukowe, jednoznacznie wskazują, iż tkanka tłuszczowa i płyn owodniowy są bogatym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych, które mogą mieć znaczenie praktyczne w leczeniu wielu schorzeń.

Z badań prezentowanych w ramach zgłaszanego osiągnięcia naukowego wynika, że:

1/ Płyn owodniowy jest bogatym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych, o dużym potencjalnie do różnicowania i proliferacji. Komórki te charakteryzują się także stabilnym kariotypem. Badania właściwości biologicznych zostały oparte na dużej grupie 165 pacjentek, co jest pierwszym takim doniesieniem w dostępnym piśmiennictwie.

2/ Ograniczeniem zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych płynu owodniowego w praktyce klinicznej jest proces starzenia. Analiza β -galaktozydazy, biochemicznego markera starzenia, gwałtownie wzrasta po 5 pasażu, co z punktu widzenia konieczności uzyskania dużej liczby komórek przed przeszczepieniem i ich namnożeniem w warunkach *in vitro* jest problematyczne.

3/ Metoda pobierania tkanki tłuszczowej znacząco wpływa na wybrane właściwości biologiczne izolowanych mezenchymalnych komórek macierzystych. Przeprowadzone badania wskazują, iż m.in. liczba wyizolowanych komórek, ich klonogenność, czy czas podwojenia populacji różnią się w zależności od metody uzyskiwania tkanki tłuszczowej.

4/ Różne metody liposukcji nie wpływają na immunofenotyp mezenchymalnych komórek macierzystych. Po raz pierwszy przeprowadzono badanie dotyczące porównania ekspresji 242 markerów powierzchniowych mezenchymalnych komórek macierzystych uzyskanych z tkanki tłuszczowej pobieranej przy pomocy liposukcji wspomaganiej maszynowo i liposukcji laserowej.

5/ Liposukcja wspomagana maszynowo jest najlepszą metodą pobierania tkanki tłuszczowej i izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych do celów terapeutycznych.

6/ Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej wykazują różny potencjał do różnicowania w kierunku mięśni szkieletowych i gładkich. Mezenchymalne komórki macierzyste tkanki tłuszczowej są bardziej podatne na czynniki różnicujące (medium kondycjonowane i czynnik TGF- β 1) i proces dyferencjacji.

Uzyskane przeze mnie wyniki i zaprezentowane wnioski mają fundamentalne znaczenie dla pełnego poznania biologii mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej i płynu owodniowego. Określenie profilu obu populacji komórek macierzystych stanowi niewątpliwą wkład w badania podstawowe, które są krokiem naprzód w standaryzacji terapii komórkowych stosowanych w praktyce klinicznej. Badania te są także istotne dla nowych rozwiązań metodycznych w hodowli komórek *in vitro*.

Piśmiennictwo

1. Atala A. Amniotic fluid-derived pluripotential cells. In: LanzaR, editor. Essentials of stem cell biology. Chapter 16. Academic Press, USA: 2009. p. 145-150.
2. Bajek A, Olkowska J, Drewa T. Mesenchymal stem cells as a therapeutic tool in tissue and organ regeneration. Postepy Hig Med Dosw. 2011; 65: 124-132.
3. Baptista LS, Silva KR, Borojevic R. Obesity and weight loss could alter the properties of adipose stem cells? Worl J Stem Cells. 2015; 7: 165-173.

4. Bear PC, Kuci S, Krause M, et al. Comprehensive phenotype characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. *Stem Cells Dev.* 2013; 22: 330-339.
5. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008; 45: 115-120.
6. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9: 641-650.
7. Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature.* 2007; 450: 1230-1234.
8. De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, et al. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol.* 2007; 177: 369-376.
9. Estrada JC, Albo C, Benguría A, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 743-755.
10. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hemat.* 1974; 2: 83-92.
11. Furstenberg E, Lachowicz K, Stachoń M. Different sides of the adipose tissue and of dietary fat. *Kosmos.* 2010; 59: 315-326.
12. Heo SJ, Thorpe SD, Driscoll TP, et al. Biophysical regulation of chromatin architecture instills a mechanical memory in mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2015; 5: 16895, DOI: 10.1038/srep16895.
13. In't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica.* 2003; 88: 845-852.
14. Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, et al. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae.* 2011; 3: 30-37.
15. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, et al. The amniotic fluid as a source of stem cells for fetal tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2001; 36: 1662-1665.
16. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp.* 2011; 59: 369-378.

17. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2011; 7: 269-291.
18. Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2010; 7: 150-161.
19. Peinado JR, Pardo M, de la Rosa O, et al. Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics.* 2012; 12: 607-620.
20. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007; 1: 35-38.
21. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells-current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010; 28: 585-596.
22. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, et al. Clonal amniotic fluid derived-cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. *Biol Reprod.* 2006; 74: 545-551.
23. Uzbas E, May ID, Parisi AM, et al. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2015; 2: 298-308.
24. Zuk P. Adipose derived-stem cells in tissue regeneration: a review. *ISRN Stem Cells.* 2013: 713959.
25. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7: 211-228.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Poza omówionym powyżej cyklem 6 publikacji składających się na osiągnięcie naukowe opisane w punkcie 4. Autoreferatu, jestem również współautorką 35 artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), 20 artykułów w czasopismach spoza bazy JCR oraz 4 rozdziałów w opracowaniach zbiorowych. Łączny IF wszystkich opublikowanych przeze mnie prac naukowych wynosi 67,650, a liczba punktów MNiSW 927. Pełny wykaz prac znajduje się w Załączniku nr 6A do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Rozwój naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką 14 publikacji naukowych o łącznej wartości 4,659 IF i 104 pkt wg MNiSW oraz 21 doniesień zjazdowych.

W 2005 roku ukończyłam studia biologiczne, o specjalności biologia molekularna, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu. Pracę magisterską pt. „Ekto- i egzo-enzymy naczyń krwionośnych i krwi świni” wykonałam w Zakładzie Biochemii pod kierownictwem dr hab. Michała Komoszyńskiego, prof. UMK i obroniłam 23 czerwca 2005 roku. Uzyskane przeze mnie wyniki zostały zaprezentowane w 2005 i 2006 roku na 40 i 41-szym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Lublinie i Białymstoku w formie plakatów konferencyjnych.

Od września 2005 roku zostałam zatrudniona w Zakładzie Inżynierii Tkankowej Katedry Biologii Medycznej CM UMK jako asystent. Moje pierwsze badania dotyczyły izolacji i hodowli chondrocytów w celu ich praktycznego zastosowania w ortopedii (rekonstrukcja chrząstki stawowej) i urologii (nietrzymanie moczu). W tym celu nawiązałam współpracę z prof. dr hab. Jarosławem Deszczyńskim i dr n. med. Konradem Słynarskim z Kliniki Ortopedii i Rehabilitacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Współpraca ta zaowocowała czterema publikacjami naukowymi (Artroskop Chir. Stawów. 2006; 2: 51-56; Artroskop Chir. Stawów. 2007; 3: 11-16; Artroskop Chir. Stawów. 2008; 4: 12-16; Artroskop Chir. Stawów. 2009; 5: 24-28) i czynnym udziałem w trzech sympozjach dotyczących ortopedii: 2. Spotkanie Polskiego Klubu International Cartilage Repair Society w Warszawie (2006 rok), III Międzynarodowa Konferencja „Inżynieria Tkankowa w Ortopedii” (Warszawa, 2007 rok) i IV Konferencja naukowa „Inżynieria tkankowa w ortopedii” (Warszawa, 2010 rok). Dodatkowo również wraz z dr n. med. Konradem Słynarskim, w 2007 roku, zostałam współautorką rozdziału pt. „Regeneracja chrząstki przy użyciu technik inżynierii tkankowej. Wybrane zagadnienia z medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej”, zamieszczonego w podręczniku do seminariów dla studentów kierunku biotechnologia.

W roku 2006, w celu doskonalenia swojego warsztatu naukowego, odbyłam staż naukowy w Laboratorium Inżynierii Tkankowej Medycznego Uniwersytetu Charite w Berlinie, u prof. Michaela Sittingera. Przedmiotem badań prowadzonych w ramach stażu było opanowanie techniki izolacji i hodowli ludzkich chondrocytów. W czasie ww. stażu zainteresowałam się mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, w szczególności

izolowanymi ze szpiku kostnego, co po powrocie stało się przedmiotem moich dalszych badań eksperymentalnych. Mezenchymalne komórki macierzyste izolowałam ze szpiku kostnego szczura, na co uzyskałam zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej. Poza optymalizacją metody izolacji i hodowli *in vitro* szczególnie interesowały mnie możliwości tych komórek do różnicowania w kierunku mięśni szkieletowych i gładkich, co w przyszłości mogłoby posłużyć do regeneracji pęcherza moczowego czy też leczenia nietrzymania moczu u kobiet. W ramach prowadzonych badań zoptymalizowałam również metodę izolacji komórek satelitarnych, czyli progenitorowych komórek mięśni. W tym celu odbyłam także w 2007 roku krótki staż na Uniwersytecie Warszawskim, u prof. Anny Ciemerych-Litwinienko. Uzyskane przeze mnie wyniki czteroletnich badań zebrałam w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Możliwości transdiferencjacji mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) szczura w komórki mięśniowe, badanie *in vitro*”, której promotorem był prof. dr hab. Tomasz Drewna. 15 grudnia 2010 roku, Uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, uzyskałam stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Wyniki badań nad możliwością transdiferencjacji mezenchymalnych komórek macierzystych szczura prezentowane były podczas licznych krajowych i zagranicznych konferencji, publikowane w materiałach zjazdowych (szczegółowy wykaz w Załączniku nr 3), a finalnie zostały opublikowane w *Curr Signal Transduct Ther* 2012; 7: 220-227.

W okresie tym brałam również udział w badaniach dotyczących optymalizacji metody izolacji i hodowli komórek macierzystych izolowanych z mieszków włosowych szczura oraz ich potencjalnego zastosowania w urologii, a w szczególności w rekonstrukcji pęcherza moczowego (*Polim. w Med.* 2008; 38: 33-42; *Transplant. Proc.* 2009; 41: 1932-1935; *Transplant. Proc.* 2009; 41: 4345-4351).

Podsumowaniem tego okresu badań nad biologią komórek macierzystych oraz ich potencjałem do różnicowania było wyróżnienie w konkursie „Najlepszy Projekt-BioInnowacje 2009”, otrzymane podczas Konferencji „BIO Biznes Finanse Innowacje” w Gdańsku i Gdyni w 2009 roku, a także zespołowa nagroda Rektora UMK w Toruniu II^o za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2010 roku.

Ważną częścią mojej aktywności naukowej była współpraca z dr hab. Marią Łuczkiwicz z Katedry i Zakładu Farmakognozji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania prowadzone w ramach współpracy dotyczyły wpływu związków fenolowych na metabolizm chondrocytów. Wyniki zostały przedstawione na XXI Naukowym Zjeździe

Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Farmacja Polska na tle Unii Europejskiej”, w 2010 roku w Gdańsku. Natomiast nawiązanie współpracy z dr Joanną Skopińską-Wiśniewską z Katedry Chemii Biomateriałów i Kosmetyków z UMK w Toruniu zaowocowało cyklem badań nad oceną cytotoksyczności różnych biomateriałów, które zostały opublikowane (Inż. Biomater. 2007; 67-72: 67-69 i Appl. Surf. Sci. 2009; 255: 8286-8292) i są kontynuowane do chwili obecnej.

Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorką 49 publikacji naukowych o łącznej wartości 62,991 IF i 822 pkt wg MNiSW oraz 58 doniesień zjazdowych.

W marcu 2011 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta, a od listopada 2015 roku pełnię funkcję p.o. kierownika Zakładu Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych moje główne zainteresowania i tematyka badawcza nadal dotyczyły biologii komórek macierzystych izolowanych z różnych źródeł. Pracowałam nad metodą otrzymania tych komórek m. in. z łożyska czy miazgi zębowej. Najwięcej uwagi wówczas poświęciłam jednak komórkom macierzystym izolowanym z tkanki tłuszczowej i płynu owodniowego. Oprócz analizy właściwości biologicznych tych komórek, takich jak immunofenotyp, kinetyka wzrostu czy proces starzenia, dokonana została także ocena ich potencjału do różnicowania. Poza standardowym różnicowaniem w kierunku linii mezodermalnej interesowała mnie możliwość zaindukowania dyferencjacji w chondrocyty, osteoblasty i mięśnie, w celu ewentualnego zastosowania w ortopedii. Efektem mojej siedmioletniej pracy z komórkami macierzystymi jest cykl publikacji, stanowiący podstawę osiągnięcia habilitacyjnego. Izolacja i hodowla komórek macierzystych z nowych źródeł wymagała optymalizacji metody, co było długim procesem. Podsumowaniem tego okresu badań, oprócz sześciu zgłaszanych do osiągnięcia habilitacyjnego prac, jest zrealizowany w 2011 roku projekt pt. „Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w regeneracji chrząstki” oraz wymienione poniżej publikacje:

- **Bajek A**, Olkowska J, Drewa T, 2011, *Mezenchymalne komórki macierzyste narzędziem terapeutycznym w regeneracji tkanek i narządów*. Postępy Hig. Med. Dośw, 65: 124-132.
- Kuźniewski R, **Bajek A**, Joachimiak R, Roszek K, Drewa T, 2011, *Mezenchymalne komórki macierzyste oraz perspektywy ich zastosowania w terapii klinicznej wybranych schorzeń*.

Nowoczesne metody analizy surowców rolniczych. Pod red. G. Bartosz i Cz. Puchalski. Rzeszów, 473-482.

- **Bajek A**, Czerwiński M, Olkowska J, Gurtowska N, Kloskowski T, Drewa T, 2012, *Does aging of mesenchymal stem cells limit their potential application in clinical practice?* Aging Clin. Exp. Res, 24: 404-411.
- **Bajek A**, Porowińska D, Kloskowski T, Brzoska E, Ciemerych MA, Drewa T, 2015, *Cell therapy in Duchenne muscular dystrophy treatment: clinical trials overview*. Crit. Rev. Eukar. Gene Expr, 25: 1-11.
- **Bajek A**, Porowińska D, Roszkowski K, 2017, *Influence of extracellular matrix on the proliferation and adhesion properties of stem cells derived from different sources*. Eur. J. Biol. Res, 7: 165-171.

Ważną częścią mojej pracy naukowej były zagadnienia dotyczące urologii, a w szczególności regeneracji pęcherza moczowego oraz leczenia nietrzymania moczu. Zaowocowało to publikacją serii prac:

- **Bajek A**, Pokrywka Ł, Wolski Z, Dębski R, Drewa T, 2011, *Prostate epithelial stem cells are resistant to apoptosis after $\alpha 1$ -antagonist treatment. The impact for BPH patients*. Central Eur. J. Urol, 64(4): 256-257.
- **Bajek A**, Pokrywczyńska M, Drewa T, 2012, *Regeneracja narządów metodami inżynierii tkankowej u pacjentów dotkniętych chorobami nowotworowymi stanowi istotny problem. Rozważania na przykładzie raka pęcherza moczowego*. Nowotwory, 62(1): 34-41.
- **Bajek A**, Drewa T, Joachimiak R, Marszałek A, Gagat M, Grzanka A, 2012, *Stem cells for urinary tract regeneration*. Central Eur. J. Urol, 65(1): 7-10.
- Drewa T, Krzyżanowska S, Marszałek A, **Bajek A**, 2012, *Bladder cancer and stem cells*. Curr. Signal Transduct. Ther, 7(3): 209-219.
- **Bajek A**, Olkowska J, Radziszewski P, Drewa T, 2012, *Cell therapy for urinary incontinence. Does it really work?* Pelviperineol, 31(2): 37-41.
- Kloskowski T, Gurtowska N, **Bajek A**, Drewa T, 2012, *Ciprofloxacin as a prophylactic agent against prostate cancer : a "two hit" hypothesis*. Med. Hypotheses, 78: 235-238.
- Gurtowska N, **Bajek A**, Olkowska J, Drewa T, 2012, *Identyfikacja krążących komórek nowotworowych jako obiecująca metoda diagnostyki chorób nowotworowych układu moczowo-płciowego*. Postępy Hig. Med. Dośw, 66: 983-990.
- Adamowicz J, Juszcak K, **Bajek A**, Tworkiewicz J, Nowacki M, Marszałek A, Thor PJ, Chłosta P, Drewa T, 2012, *Morphological and urodynamic evaluation of urinary bladder wall regeneration: muscles guarantee contraction but not proper function - a rat model research study*. Transplant. Proc, 44: 1429-1434.
- Drewa T, Joachimiak R, **Bajek A**, Gagat M, Grzanka A, Bodnar M, Marszałek A, Dębski R, Chłosta P, 2013, *Hair follicle stem cells can be driven into a urothelial-like phenotype: An experimental study*. Int. J. Urol, 20: 537-542.
- Kloskowski T, Uzarska M, Gurtowska N, Olkowska J, Joachimiak R, **Bajek A**, Gagat M, Grzanka A, Bodnar M, Marszałek A, Drewa T, 2014, *How to isolate urothelial cells? Comparison of four different methods and literature review*. Hum. Cell, 27: 85-93.
- Maj M, **Bajek A**, Nalejska E, Porowińska D, Kloskowski T, Gackowska L, Drewa T, 2017, *Influence of mesenchymal stem cells conditioned media on proliferation of urinary tract cancer cell lines and their sensitivity to ciprofloxacin*. J. Cell. Biochem, 118(6): 1361-1368.

Dodatkowo, w latach 2015-2016 realizowałam projekt Biotech50 finansowany przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Celem tego projektu była ocena przejścia

epitelialno-mezenchymalnego w różnych subpopulacjach komórek raka prostaty (m.in. komórki macierzyste raka prostaty oraz heterogenna populacja komórek nowotworowych). Oceniona została także migracja, inwazyjność i właściwości komórek macierzystych raka prostaty. Analizie poddana została też efektywność standardowo stosowanej hormonoterapii. Powszechnie stosowany jest bikalutamid, mający na celu zahamowanie oddziaływania androgenów krążących we krwi na ich receptory znajdujące się w komórkach prostaty. Niestety, leczenie hormonalne nie przynosi zadowalających efektów. W celu zwiększenia efektu terapeutycznego standardowo stosowany bikalutamid został połączony z tlenkiem grafenu (GO).

Wyniki uzyskane w ramach tego projektu są aktualnie zbierane i analizowane, również statystycznie. Wstępna ich ocena wskazuje, iż mogą mieć istotne znaczenie dla oceny progresji i rokowania choroby gruczołu krokowego.

Ukoronowaniem pracy naukowej związanej z zastosowaniem komórek macierzystych w urologii było otrzymanie w 2014 roku nagrody za najlepszą pracę opublikowaną w „Central European Journal of Urology” w latach 2012-2013.

Innymi realizowanymi przeze mnie badaniami była możliwość izolacji komórek macierzystych z jajowodu kury. Badania te prowadziłam we współpracy z Katedrą Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy. Jest to pierwsza udana próba wyprowadzenia hodowli pierwotnej komórek macierzystych z jajowodu kury, która zaowocowała udzieleniem patentu nr 218931 na wynalazek pt. „Sposób otrzymania komórek epitelialnych z jajowodu kury w hodowli pierwotnej *in vitro*”, przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej. Po uzyskaniu komórek z jajowodu badania zostały rozszerzone o możliwość produkcji białek terapeutycznych w jajowodzie kury i przepiórki. Projekt zatytułowany „Modele komórkowe *in vitro* do badań sekrecji białek terapeutycznych w jajowodzie ptaków”, którego byłam wykonawcą, uzyskał finansowanie w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (nr projektu 2011.03/N/N29/03814).

Współpraca ta, rozpoczęta w 2011 roku i kontynuowana do dzisiaj, została udokumentowana następującymi publikacjami i doniesieniami zjazdowymi:

- Kasperczyk K, **Bajek A**, Joachimiak R, Walasik K, Marszałek A, Drewa T, Bednarczyk M, 2012, *In vitro optimization of the Gallus domesticus oviduct epithelial cells culture*. Theriogenology, 77: 1834-1845.
- Stadnicka K, Marszałek A, Kozłowska I, Walasik K, Bodnar M, **Bajek A**, Porowińska D, Drewa T, Bednarczyk M, 2014, *The expression of p63 and Ck HMW in magnum and infundibulum of Gallus domesticus oviduct*. Folia Biol, 62(3): 179-185.
- Stadnicka K, Bodnar M, Marszałek A, **Bajek A**, Drewa T, Płucienniczak G, Chojnacka-Puchta L, Cecuda-Adamczewska V, Dunisławska A, Bednarczyk M, 2016, *Efficient source of cells in proximal oviduct for testing non-viral expression constructs in the chicken bioreactor model and for other in vitro studies*. Folia Biol, 64(1): 37-46.
- Kasperczyk K, Chojnacka-Puchta L, Cecuda-Adamczewska V, **Bajek A**, Płucienniczak G, Drewa T, Bednarczyk M, 2011, *The in vitro model for transfection and exogene expression studies in Gallus domesticus*. 6th International Chick Meeting, Edynburg, Wielka Brytania.
- Kasperczyk K, **Bajek A**, Drewa T, Bednarczyk M, 2011, *Elaboration of in vitro model for transgenic research with tissue-specific promoters in Gallus Gallus domesticus*. International Ph.D. Workshop on Welfare, Biotechnology and Quality of Animal Production, Dolina Raczkowa, Słowacja.
- Kasperczyk K, **Bajek A**, Joachimiak R, Gagat M, Sawicka D, Walasik K, Chojnacka-Puchta L, Płucienniczak G, Drewa T, Bednarczyk M, 2011, *Non-viral transfection of chicken oviduct epithelial cells - first results*. XXIII Międzynarodowe Sympozjum Drobiarskie PO WPSA. "Nauka praktyce drobiarskiej - praktyka drobiarska nauce", Poznań, Polska.
- Stadnicka K, Bodnar M, Marszałek A, **Bajek A**, Drewa T, Bednarczyk M, 2014, *Stem-like characteristic of chicken oviduct epithelial cells*. APPC 2014. The 10th Asia Pacific Poultry Conference "Poultry Science & Industry for Next Generation", Jeju, Korea.

Odrębnym obszarem moich zainteresowań naukowych jest analiza cytotoksyczności i biokompatybilności nowych biomateriałów, mogących mieć zastosowanie w praktyce klinicznej. Badania te zostały rozpoczęte w 2007 roku i intensywnie trwają do chwili obecnej. Zostały zapoczątkowane dzięki współpracy z dr Joanną Skopińską-Wiśniewską z Katedry Chemii Biomateriałów i Kosmetyków UMK w Toruniu. W 2012 roku otrzymałam finansowanie na realizację projektu pt. „Ocena wybranych biomateriałów w regeneracji i rekonstrukcji chrząstki stawowej”, w którym oceniałam zdolność materiałów hydrożelowych do zaindukowania procesu odnawiania tkanki chrzęstnej. W latach 2012-2015 brałam również udział jako główny wykonawca w projekcie NCN zatytułowanym „Badanie nowych, bezpieczniejszych metod sieciowania materiałów białkowych dla inżynierii tkankowej” (nr projektu 924-Ch).

Analiza cytotoksyczności materiałów na wybrane linie komórkowe zwierzęce i ludzkie prowadzona jest zgodnie z normą ISO 10993 (Biologiczna ocena wyrobów medycznych), a wyniki opublikowane zostały w następujących artykułach:

- Skopińska-Wiśniewska J, Sionkowska A, Kamińska A, **Każnica A**, Joachimiak R, Drewa T, 2009, *Surface characterization of collagen/elastin based biomaterials for tissue regeneration*. Appl. Surf. Sci, 255: 8286-8292.
- Skopińska-Wiśniewska J, Olszewski K, **Bajek A**, Rynkiewicz A, Sionkowska A, 2014, *Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels*. Mat. Sci. Eng. C - Mater, 40: 65-70.

- Skopińska-Wiśniewska J, Kuderko J, **Bajek A**, Maj M, Sionkowska A, Ziegler-Borowska M, 2015, *Collagen/elastin hydrogels cross-linked by squaric acid*. Mat. Sci. Eng. C - Mater, 60: 100-108.
- Skopińska-Wiśniewska J, Węgrzynowska-Drzymalska K, **Bajek A**, Maj M, Sionkowska A, 2016, *Is dialdehyde starch a valuable cross-linking agent for collagen/elastin based materials?* J. Mater. Sci.: Mater. Med, 27(4): 1-10.
- Skopińska-Wiśniewska J, **Bajek A**, Maj M, Sionkowska A, 2017, *PEG-dialdehyde-the new cross-linking agent for collagen/elastin hydrogels*. Polym. Adv. Technol, 28(6): 763-767.

Wyniki tej owocnej współpracy zostały również zaprezentowane podczas wielu konferencji krajowych i zagranicznych, których dokładny wykaz zawarty jest w Załączniku nr 3.

Podsumowaniem mojej ówczesnej pracy naukowej było otrzymanie w 2013 roku nagrody zespołowej I^o Rektora UMK w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej w 2012 roku.

Dużym wyróżnieniem było zaproszenie mnie do udziału w 7. Programie Ramowym Komisji Europejskiej w ramach wspólnego konkursu Komisji Europejskiej UE i Meksykańskiej Organizacji CONACYT „Adding Value to Mining at the Nanostructure level”, „Rozwój i zastosowanie nowych nanokompozytowych materiałów otrzymanych w recyklingu metali szlachetnych” o akronimie NANOMINING, w latach 2010-2013, gdzie zajmowałam stanowisko pracownika naukowo-technicznego. Do moich głównych obowiązków należała analiza cytotoksyczności modyfikowanych implantów tytanowych. Uzyskane wyniki opublikowano w *J Biometer Tissue Eng* 2016; 6: 463-472.

Od października 2017 roku, po powrocie z drugiego urlopu macierzyńskiego, rozpoczęłam również pracę nad projektem NCN pt. „Nowe materiały zawierające mikrocząsteczki inkorporowane w matrycy polimerowej do zastosowań medycznych, farmaceutycznych i kosmetycznych” (nr projektu UMO-2016/21/D/ST8/01705), we współpracy z dr Justyną Kozłowską z Katedry Chemii Biomateriałów i Kosmetyków UMK w Toruniu.

Plany badawcze

Najnowszym zagadnieniem badawczym podjętym przeze mnie jest ocena wpływu obecnie stosowanego leczenia przeciwnowotworowego u kobiet w ciąży na mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego reprezentujące rozwijający się płód. Oszacowanie

ryzyka i korzyści z podawania leków w czasie ciąży często stanowi wyzwanie. Szczególnie, że dane dotyczące wpływu związków biologicznie czynnych na płód są niewystarczające. Nowotwory złośliwe u kobiet w ciąży stanowią 0,05-0,1% wszystkich nowotworów i są one związane z 0,02-0,1% wszystkich ciąż. Diagnostyka i leczenie kobiet chorych na nowotwory w ciąży jest trudna, dotyczy bowiem zarówno matki, jak i płodu. Niestety, standardy postępowania z kobietami ciężarnymi z rozpoznaniem nowotworu są wciąż niewystarczająco dobrze opisane. Optymalne leczenie obejmuje skuteczność terapii z jednoczesnym zachowaniem prawidłowego rozwoju płodu. Istnieje wiele kontrowersji związanych z wpływem ciąży na rozwój choroby nowotworowej. Aktualna wiedza opiera się głównie na wynikach badań klinicznych, analiz retrospektywnych czy też przeglądzie dostępnego piśmiennictwa. Z tego też powodu bardzo często decyzje istotne z klinicznego punktu widzenia podejmowane są bez wystarczającej wiedzy opartej na rzetelnych i wiarygodnych danych naukowych.

Dlatego też, obecnie prowadzę badania nad oceną wpływu wybranych chemioterapeutyków i antybiotyków antynowotworowych na ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste płynu owodniowego.

Kolejnym zagadnieniem naukowym, które będzie przeze mnie realizowane przez najbliższe dwa lata, jest analiza wpływu warunków hipoksji na właściwości biologiczne ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej i płynu owodniowego. Dotychczas nie poświęcano należytej uwagi odpowiedniemu stężeniu tlenu w warunkach hodowli *in vitro*. Wiele aktualnie prowadzonych badań klinicznych stosuje mezenchymalne komórki macierzyste namnożone w warunkach *in vitro* w 20% stężeniu tlenu [Estrada, 2012]. 10-krotnie przekracza to stężenie tlenu osiąganego w fizjologicznych niszach komórek macierzystych. Poziom tlenu, który dociera do poszczególnych tkanek i organów waha się od 2% do 9% [Mohyeldin, 2010]. Dodatkowo również tkanki mogą znacząco różnić się w kontekście zapotrzebowania na tlen. Odbiega to od warunków uważanych za „normoksję” (21% tlenu), w których standardowo hoduje się komórki w warunkach *in vitro*. Nieliczne badania, głównie z ostatnich 4 lat, wskazują na to, iż 20% tlen indukuje w komórkach ssaków uszkodzenia DNA, przyspieszając tym samym proces ich starzenia czy zmniejszenie żywotności. Odwrotnie, hodowanie ludzkich komórek macierzystych w stężeniu tlenu od 1 do 5% korzystnie wpływa na ich wzrost, hamuje proces ich różnicowania, a także powoduje wzrost ekspresji Oct4 (specyficznego markera pluripotencji), czy aktywności telomerazy [Mohyeldin, 2010].

Moje najbliższe plany badawcze obejmują kompleksową analizę właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w różnych stężeniach tlenu, co wydaje się być kluczowe w świetle cieszących się ogromną popularnością terapii komórkowych.

Anna Bajek