

AUTOREFERAT

PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

dr n. med. Małgorzata Maj

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

Bydgoszcz 2019

1. Imię i nazwisko: **Małgorzata Maj**

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

21.07.2011 – tytuł zawodowy magistra biotechnologii

Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł pracy: Analiza wrażliwości mutanta BRCA2 oraz innych mutantów komórkowych uszkodzonych w homologicznej rekombinacji na wybrane leki nowotworowe

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Zdzenicka

18.11.2015 – stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej

Katedra Urologii, Zakład Inżynierii Tkankowej

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tytuł rozprawy: Badanie właściwości przeciwczerśniakowych rosuwastatyny w warunkach *in vitro*

Promotor: prof. dr hab. Rafał Czajkowski

11.07.2017 – świadectwo ukończenia studiów podyplomowych w zakresie analityki medycznej

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.10.2011 – 31.12.2013

starszy technik

Zakład Inżynierii Tkankowej

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.01.2013 – 31.05.2016

asystent

Katedra Medycyny Regeneracyjnej, Zakład Inżynierii Tkankowej

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

01.06.2016 – obecnie

adiunkt

Katedra Urologii, Zakład Inżynierii Tkankowej

Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

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

a/ tytuł osiągnięcia naukowego: **Interakcje pomiędzy komórkami macierzystymi pochodzącymi z tkanki tłuszczowej a komórkami raka pęcherza moczowego, badania *in vitro***

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

Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku nr 6. Wartość współczynnika IF i punktację MNiSW dla poszczególnych prac podano zgodnie z rokiem ich opublikowania, z wyjątkiem pracy z roku 2019, dla której przyjęto IF i punktację MNiSW jak w roku 2018.

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem trzech przedstawionych poniżej prac opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR) o sumarycznym współczynniku IF równym 10.040 i punktacji MNiSW równej 90. Prace uszeregowano chronologicznie, zgodnie z rokiem ich publikacji.

1. **Maj M**, Bajek A, Nalejska E, Porowińska D, Kłoskowski T, Gackowska L, Drewna 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. **IF = 2.959, MNiSW = 25**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na współpracowaniu koncepcji badań i koordynacji ich przebiegu, hodowli komórek macierzystych i nowotworowych, przygotowaniu materiału do badań cytometrycznych (rycina 2 i 3), a także na analizie i interpretacji wyników. Zebrałam piśmiennictwo, przygotowałam manuskrypt oraz ryciny i tabele. Prowadziłam także korespondencję z edytorem i odpowiadałam na recenzje jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

2. **Maj M**, Kokocha A, Bajek A, Drewa T, 2018, *The interplay between adipose-derived stem cells and bladder cancer cells*, Sci Rep, 8(1): 15118. **IF = 4.122, MNiSW = 40**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu większości doświadczeń (poza oceną migracji/inwazji komórek – rycina 6A i B), a także na analizie i interpretacji wyników. Zebrałam piśmiennictwo, przygotowałam manuskrypt oraz ryciny i tabele. Prowadziłam korespondencję z edytorem i odpowiadałam na recenzje jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. **Maj M**, Kokocha A, Bajek A, Drewa T, *The effects of adipose-derived stem cells on CD133-expressing bladder cancer cells*, J Cell Biochem, 2019; 1-11. **IF = 2.959, MNiSW = 25**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu większości doświadczeń (poza oceną żywotności/prolifracji komórek – rycina 3), a także na analizie i interpretacji wyników. Zebrałam piśmiennictwo, przygotowałam manuskrypt oraz ryciny i tabele. Prowadziłam korespondencję z edytorem i odpowiadałam na recenzje jako autor korespondencyjny. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

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

Aktualny stan wiedzy w zakresie tematu badań

Terapie komórkowe stają się coraz bardziej atrakcyjną opcją w leczeniu wielu schorzeń. Medycyna regeneracyjna, interdyscyplinarna dziedzina medycyny powstała z inżynierii tkankowej, wykorzystuje metody z użyciem przestrzennych rusztowań i hodowanych *in vitro* komórek w celu naprawy funkcji uszkodzonych tkanek lub ich pełnej regeneracji, a nawet przeszczepiania całych narządów skonstruowanych *in vitro*. Poza komórkami i biomateriałami, stanowiącymi podporę mechaniczną dla komórek, do triady inżynierii tkankowej zalicza się również cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu, które regulują podziały i różnicowanie przeszczepionych komórek [O'Brien, 2011].

Do przeszczepu można wykorzystać zróżnicowane, dojrzałe komórki pochodzące z tkanki, która ma podlegać regeneracji. Wyizolowane od pacjentów komórki hodowane są *in vitro* w celu uzyskania odpowiedniej ich liczby do przeszczepu lub podawane są pacjentowi bezpośrednio po etapie izolacji. W ostatnim czasie wiele uwagi poświęca się mezenchymalnym komórkom macierzystym (MSCs, ang. mesenchymal stem cells), które w odróżnieniu od zróżnicowanych komórek dorosłego organizmu posiadają wiele unikalnych cech korzystnych dla ich dalszego zastosowania w terapiach komórkowych,

m.in. wysoki potencjał proliferacyjny, zdolność do wielokierunkowego różnicowania oraz możliwość modulacji odpowiedzi immunologicznej [Nombela-Arrieta et al., 2011]. Komórki macierzyste po raz pierwszy wyizolowano ze szpiku kostnego. Ze względu na inwazyjność pobierania materiału i niewielką ilość komórek jaką udaje się uzyskać w wyniku izolacji prowadzono dalsze badania nad źródłami komórek macierzystych do celów rekonstrukcyjnych. Szczególnie bogatym źródłem komórek dla inżynierii tkankowej okazała się tkanka tłuszczowa, którą można pobrać podczas zabiegu liposukcji charakteryzującego się znacznie mniejszą inwazyjnością w porównaniu do biopsji szpiku kostnego [Bajek et al., 2016; De Francesco et al., 2015].

Komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ASCs, ang. adipose-derived stem cells) syntetyzują liczne cytokiny i czynniki wzrostu, które mogą ułatwiać regenerację elementów składowych prawidłowej ściany pęcherza moczowego w przypadku rekonstrukcji organu z powodu urazu, bądź stanów chorobowych wymagających zwiększenia jego pojemności. Głównym wskazaniem do operacji rekonstrukcyjnych jest jednak cystektomia będąca metodą pozwalającą na całkowite usunięcie naciekającego raka pęcherza moczowego [Pokrywczyńska et al., 2013]. Udany zabieg rekonstrukcji pęcherza moczowego u pacjenta po przebytych nowotworze wykonano w 2006 roku. Była to pierwsza na świecie praca doświadczalna prezentująca możliwość wytworzenia niemalże całego narządu w laboratorium. Po zabiegu cystektomii polegającym na wycięciu pęcherza i pozostawieniu jedynie ujścia moczowodów i cewki moczowej, narząd został zrekonstruowany z wyhodowanych komórek wysianych na rusztowanie z kolagenu i kwasu poliglikolowego o kształcie pęcherza. Zastosowana terapia okazała się całkowitym sukcesem, nie zaobserwowano żadnych powikłań, a wszczepiony narząd spełniał właściwie swoje funkcje [Atała et al., 2006]. Prace badawcze nad konstrukcją funkcjonalnych substytutów pęcherza moczowego trwają nadal, tak aby możliwe było przejście z fazy eksperymentów do zastosowań klinicznych [Lee et al., 2015; Leonhäuser et al., 2017; Pokrywczyńska et al., 2014].

Wykorzystanie komórek macierzystych do konstrukcji rusztowań mających budować materiał do odtworzenia narządu u pacjentów onkologicznych stwarza jednak potencjalne niebezpieczeństwo zainicjowania progresji nowotworu. Mezenchymalne komórki macierzyste wykazują bowiem tropizm do komórek nowotworowych [Cuiffo and Karnoub, 2013]. Syntetyzowane przez nie czynniki, z jednej strony ułatwiają regenerację tkanek, z drugiej mogą powodować wznowę choroby nowotworowej poprzez pobudzenie proliferacji, wzrost żywotności i nabycie przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego, który związany jest ze zwiększoną zdolnością do migracji i naciekania sąsiednich tkanek [Zimmerlin et al., 2013]. Migracja komórek macierzystych w kierunku środowiska nowotworowego jest następstwem syntezy szeregu czynników o właściwościach chemotaktycznych wobec MSCs. Po wbudowaniu w zrąb nowotworu komórki macierzyste mogą różnicować się w miofibroblasty, komórki śródbłonna naczyniowego, bądź też istnieć w postaci komórek macierzystych związanych z nowotworem (T-MSCs, ang. tumor tissue-derived mesenchymal stem cells). Uważa się, że T-MSCs

promują proliferację komórek nowotworowych, zwiększają liczbę komórek o cechach macierzystych komórek nowotworowych (CSCs, ang. cancer stem cells), a także pobudzają procesy angiogenezy [Sun et al., 2014].

Wpływ komórek macierzystych na progresję nowotworów pozostaje w dużej mierze nieznany. Pierwsze doniesienia dotyczące oddziaływań MSCs izolowanych ze szpiku kostnego na wzrost komórek nowotworowych wykazały działanie antyproliferacyjne względem hematopoetycznych i nie-hematopoetycznych nowotworowych linii komórkowych. Redukcja potencjału proliferacyjnego obserwowana była podczas kokultury komórek macierzystych z komórkami nowotworowymi, jak również w warunkach ograniczonego kontaktu fizycznego. Potwierdzono także obniżony poziom apoptozy komórek nowotworowych oraz zahamowanie cyklu komórkowego. Z kolei doświadczenia na modelu zwierzęcym wykazały promocję wzrostu guzów nowotworowych. Opisane rozbieżności mogą sugerować, że w warunkach *in vivo* komórki macierzyste tworzą niszę dla CSCs, w której zachowują one swoje unikalne właściwości, co może potwierdzać ochronne działanie MSCs względem populacji nowotworowych komórek macierzystych [Ramasamy et al., 2007]. Podobne wyniki otrzymano podczas hodowli komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego z komórkami raka płuca i przelyku w warunkach ograniczonego kontaktu fizycznego. W hodowli *in vitro* MSCs hamowały wzrost i inwazję komórek, natomiast *in vivo* promowały progresję nowotworu [Tian et al., 2011].

Niewiele wiadomo na temat wpływu komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na nowotwory układu moczowo-płciowego. Dotychczasowe doniesienia literaturowe opisują wyłącznie oddziaływanie ASCs na nowotwory prostaty. W tym przypadku zaobserwowano zarówno zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych *in vitro*, jak również zwiększenie liczby i rozmiarów guzów nowotworowych *in vivo*. Spadek proliferacji linii komórkowych wrażliwych i niewrażliwych na androgeny związany był z indukcją apoptozy i aktywacją kaspaz wykonawczych, z kolei *in vivo* obecność komórek macierzystych stymulowała unaczynienie guzów nowotworowych [Lin et al., 2010; Prantl et al., 2010; Takahara et al., 2014]. Brak danych na temat wpływu ASCs na komórki raka pęcherza moczowego uniemożliwia jednoznaczne określenie możliwości ich zastosowania w regeneracji tego narządu. Największe wątpliwości wzbudza prawdopodobieństwo zainicjowanie wznowy u pacjentów w stanie remisji, poprzez aktywację niewielkiej populacji komórek niewrażliwych na zastosowane leczenie przeciwnowotworowe [Zhang et al., 2013]. Biorąc pod uwagę wyniki dotychczasowych badań kluczowa dla dalszego rozwoju metod rekonstrukcji pęcherza moczowego z zastosowaniem terapii komórkowych wydaje się analiza wpływu ASCs na proliferację i żywotność oraz indukcję fenotypu inwazyjnego komórek raka pęcherza moczowego hodowanych w warunkach umożliwiających wzajemne oddziaływanie obu typów komórek.

Celem naukowym prezentowanego cyklu prac była:

- analiza wpływu rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez komórki macierzyste na żywotność i proliferację komórek nowotworowych, a także ich wrażliwość na ciprofloksacynę – antybiotyk o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym (praca nr 1),
- analiza wpływu czynników wydzielanych przez komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej na właściwości biologiczne komórek raka pęcherza moczowego, w tym na ich adhezję do składników macierzy zewnątrzkomórkowej, migrację, inwazję oraz aktywację szlaków sygnalizacyjnych zaangażowanych w regulację proliferacji, apoptozy, a także wrażliwości komórek nowotworowych na chemioterapeutyki (praca nr 2),
- analiza wpływu medium kondycjonowanego z komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na populację komórek raka pęcherza moczowego wykazującą ekspresję markera CD133, tj. na komórki o cechach macierzystych komórek nowotworowych (praca nr 3).

Omówienie uzyskanych wyników

Praca nr 1

Maj M, Bajek A, Nalejska E, Porosińska D, Kłoskowski T, Gackowska L, Drewna 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.

Unikalne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych sprawiają, że stały się one atrakcyjnym narzędziem medycyny regeneracyjnej, w tym urologii eksperymentalnej. MSCs wytwarzają liczne rozpuszczalne mediatory, które wpływają na procesy regeneracji tkanek sprzyjając przywróceniu funkcji pęcherza moczowego. Coraz częściej wskazuje się, że pozytywne skutki terapii komórkowych wynikają z działania sekretomu komórek macierzystych, a nie ich zdolności do osiedlania się i różnicowania w miejscu przeszczepienia. Skład sekretomu jest tkankowo-specyficzny i zmienia się w odpowiedzi na procesy zachodzące w obrębie tkanki. Synteza dużej liczby rozpuszczalnych mediatorów w miejscu przeszczepienia może jednak wpłynąć na aktywację uśpionych komórek nowotworowych, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż lokalna wznowa występuje u znacznego odsetka pacjentów poddanych cystektomii. Co więcej, MSCs wykazują tropizm do środowiska nowotworowego spowodowany syntezą czynników chemotaktycznych m.in. czynnika martwicy nowotworów α , interferonu γ , interleukiny 1, interleukiny 6, zrębowego czynnika wzrostu, czy płytkopochodnego czynnika wzrostu. Ukierunkowana migracja MSCs może być również nasilona przez niedotlenienie towarzyszące stanowi zapalnemu w mikrośrodowisku nowotworowym. Z tego powodu pojawiają się wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa stosowania terapii komórkowych opartych o komórki macierzyste u pacjentów onkologicznych.

Pomimo prowadzonych badań możliwy wpływ MSCs na progresję choroby nowotworowej pozostaje niejasny, szczególnie w przypadku nowotworów układu moczowo-płciowego. Dlatego celem pracy była analiza wpływu rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez MSCs na żywotność dwóch linii nowotworowych, tj. komórek raka prostaty (786-0) oraz raka pęcherza moczowego (T24). W badaniach wykorzystano medium kondycjonowane (CM, ang. conditioned medium) zawierające czynniki syntetyzowane przez mezenchymalne komórki macierzyste z płynu owodniowego i tkanki tłuszczowej. Płyn owodniowy uzyskano od kobiet ciężarnych, u których przeprowadzono amniopunkcję ze wskazań medycznych. Tkanka tłuszczowa była natomiast pozyskiwana w czasie liposukcji. Oba materiały pobierano zgodnie z procedurami zaakceptowanymi przez Lokalną Komisję Bioetyczną, a od wszystkich pacjentów uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu. Po izolacji, komórki macierzyste hodowano w standardowych warunkach w celu uzyskania sekretomu zawierającego rozpuszczalne mediatory.

Zasadniczym celem prowadzonych badań było określenie wpływu medium kondycjonowanego z komórek macierzystych płynu owodniowego (AFSC-CM) i tkanki tłuszczowej (ASC-CM) na żywotność komórek nowotworowych. Analizie poddano również postęp cyklu komórkowego, a także indukcję apoptozy po okresie hodowli komórek nowotworowych w obecności sekretomu MSCs. Wykazano, że komórki raka pęcherza odpowiadają obniżeniem żywotności o 16,4% po 72-godzinnej inkubacji z ASC-CM. Wydłużona hodowla spowodowała również zwiększenie liczby komórek linii T24 w fazie G0/G1 cyklu komórkowego, odpowiednio o 20% i 17% dla AFSC-CM i ASC-CM. Nie zaobserwowano natomiast wpływu mediów kondycjonowanych na translokację fosfatydylloseryny na zewnętrzną część błony komórkowej, co ma miejsce we wczesnych etapach apoptozy. Aby sprawdzić hipotezę mówiącą o możliwym wpływie czynników syntetyzowanych przez MSCs na indukcję oporności na chemioterapeutyki analizie poddano wrażliwość komórek nowotworowych na ciprofloksacynę po okresie inkubacji z CM. Wybór ciprofloksacyny – powszechnie wykorzystywanego antybiotyku z grupy fluorochinolonów – podyktowany był doniesieniami o możliwości jej potencjalnego wykorzystania w leczeniu nowotworów pęcherza moczowego ze względu na wysoką koncentrację w moczu. Inkubacja z CM znacząco zwiększyła oporność komórek obu linii na związek w stężeniach odpowiadających wartości LC90, tj. powodujących śmierć 90% badanych komórek.

Uzyskane wyniki, jak również wcześniejsze doniesienia literaturowe na temat antyproliferacyjnego wpływu MSCs wobec hematopoetycznych i nie-hematopoetycznych komórek nowotworowych wydają się potwierdzać hipotezę o ochronnym działaniu MSCs względem populacji nowotworowych komórek macierzystych. Konieczne okazało się jednak określenie zmian składu sekretomu MSCs w odpowiedzi na obecność komórek nowotworowych, a także wpływu rozpuszczalnych mediatorów na populację komórek o cechach CSCs, co stało się tematem kolejnych prac wchodzących w skład osiągnięcia.

Praca nr 2

Maj M, Kokocha A, Bajek A, Drewa T, 2018, *The interplay between adipose-derived stem cells and bladder cancer cells*, Sci Rep, 8(1): 15118.

Kontynuacja badań nad oddziaływaniem komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej na komórki nowotworowe pozwoliła określić zmianę składu sekretu ASCs w odpowiedzi na obecność komórek nowotworowych. Aby wykluczyć możliwy wpływ czynników osobniczych w badaniach wykorzystano nieśmiertelnioną linię komórek macierzystych (ASC52telo). Komórki ASC52telo wykazują wszystkie cechy charakterystyczne dla mezenchymalnych komórek macierzystych m.in. wysoką (>90%) ekspresję markerów CD29, CD44, CD79, CD105 oraz CD166, a także niską (<5%) ekspresję CD14, CD19, CD34 i CD45. Są również zdolne do wielokierunkowego różnicowania. Linie komórek nowotworowych wyprowadzone z pierwotnych guzów wybrano tak, aby reprezentowały nowotwory w stadium II (linia 5637) i III (linie HT-1376 i HB-CLS-1), w przypadku których najczęściej dokonuje się radykalnej cystektomii. Oba typy komórek hodowano w warunkach uniemożliwiających bezpośredni kontakt, pozwalających jednak na oddziaływanie rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych do środowiska zewnątrzkomórkowego (tzw. system transwell).

Wykazano znaczący wzrost stężenia cytokin prozapalnych w sekretomie ASCs – szczególnie interleukiny 6 (od 23-krotnego do 3,9-krotnego w zależności od linii komórkowej) oraz interleukiny 8 (od 16,1-krotnego do 10,3-krotnego), a także umiarkowany wzrost stężenia GM-CSF, MCP-1 oraz RANTES. Synteza cytokin prozapalnych może nasilać aktywację szlaków sygnalizacji wewnętrznej PI3K/AKT/mTOR i MAPK zaangażowanych w progresję nowotworów. Z tego powodu analizie poddano fosforylację kinaz ERK1/2 i AKT1/2/3, a także białka efektorowe p70 S6K. Wykazano 2,2-krotny wzrost fosforylacji ERK1/2 w komórkach linii 5637 inkubowanych w ASC-CM w porównaniu do kontroli, którą stanowiły komórki hodowane w standardowych warunkach. Z kolei w komórkach linii HB-CLS-1 zaobserwowano 2-krotny wzrost fosforylacji kinazy AKT1/2/3.

Oba szlaki poza regulacją wzrostu komórek nowotworowych, apoptozy i wrażliwości na chemioterapeutyki wpływają także na fenotyp inwazyjny. Dlatego kolejnym etapem badań było określenie przylegalności komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) – kolagenu I, kolagenu II, kolagenu IV, fibronektyny, lamininy, tenascyny i witronektyny. Mimo, że uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie zaobserwowano tendencję do obniżenia przylegalności komórek nowotworowych inkubowanych w ASC-CM do białek ECM. Wykazano również istotne zwiększenie migracji komórek linii HT-1376, zarówno hodowanych w kokulturze z ASCs (o 24,5% w porównaniu do kontroli), jak również w ASC-CM (o 41,7%). Zdolności inwazyjne zostały zbadane przy użyciu insertów pokrytych macierzą Matrigel otrzymaną z mysiego mięsaka EHS

(Engelbreth-Holm-Swarm). Z powodu dużej zawartości białek macierzy zewnątrzkomórkowej Matrigel stanowi odpowiednik błony podstawnej w warunkach *in vitro*. Zdolność do enzymatycznej degradacji składników macierzy Matrigel pozwala komórkom na oddzielenie się od podłoża i migrację przez pory membrany, co tym samym pozwala na odróżnienie komórek nowotworowych mających zdolność do niekontrolowanego przemieszczania się od komórek nieinwazyjnych. W przypadku dwóch linii nowotworowych wykazano istotny wzrost zdolności do inwazji, odpowiednio o 18,2% i 18,3% dla komórek linii HT-1376 oraz HB-CLS-1.

Uzyskane wyniki wskazują na złożoność oddziaływań pomiędzy komórkami macierzystymi i nowotworowymi. Wspierają również hipotezę, iż poprzez syntezę czynników prozapalnych ASCs indukują proliferację, żywotność i inwazyjność komórek raka pęcherza moczowego. Co więcej, aktywacja szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej może wskazywać, że komórki macierzyste wpływają na progresję nowotworów. Z tego powodu kolejnym etapem badań stało się określenie wpływu ASCs na populację komórek o cechach macierzystych komórek nowotworowych wyizolowanych z badanych linii raka pęcherza moczowego na podstawie ekspresji markera CD133.

Praca nr 3

Maj M, Kokocha A, Bajek A, Drewa T, *The effects of adipose-derived stem cells on CD133-expressing bladder cancer cells*, J Cell Biochem, 2019; 1-11.

Ocena możliwości bezpiecznego stosowania ASCs w terapiach komórkowych u pacjentów onkologicznych wymaga określenia wpływu rozpuszczalnych mediatorów na populację komórek o cechach nowotworowych komórek macierzystych, które – jak się powszechnie uważa – odpowiadają za wznowę choroby nowotworowej. Z tego powodu analizie poddano komórki wykazujące ekspresję markera CD133 (prominy 1) – przezbłonowej glikoproteiny szeroko wykorzystywanej do identyfikacji prawidłowych i nowotworowych komórek macierzystych. Na podstawie ekspresji tego markera udało się wyizolować niewielką populację komórek CD133+ z dwóch linii raka pęcherza moczowego – 5637 (2,4%) oraz HB-CLS-1 (2,5%). Fenotyp wyizolowanych komórek potwierdzono cytometrycznie. W badaniach, tak jak poprzednio, wykorzystano unieśmiertelnioną linię komórek macierzystych ASC52telo.

Wykazano, iż rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez ASCs znacząco indukują proliferację i żywotność komórek nowotworowych. Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi populacjami o odmiennej ekspresji markera CD133. Inkubacja z ASC-CM znacząco zwiększyła jednak klonogenność komórek nowotworowych obu linii, czyli ich zdolność do tworzenia kolonii z pojedynczych komórek. Wykazano ponadto, iż komórki CD133- linii 5637

hodowane w standardowych warunkach wykazują obniżoną fosforylację kinazy AKT1/2/3 i białka p70 S6K. Z kolei hodowla w ASC-CM spowodowała nieznaczny, ale istotny statystycznie wzrost aktywności kinaz AKT1/2/3 (1,4-krotny) i ERK1/2 (1,6-krotny) w komórkach CD133+ tej linii. W odróżnieniu od komórek raka pęcherza moczowego linii 5637, w komórkach linii HB-CLS-1 wykazujących ekspresję markera CD133 spadła aktywacja szlaków PI3K/AKT/mTOR i MAPK pod wpływem sekretu ASCs.

Uzyskane wyniki wskazują, że komórki o odmiennej ekspresji markera CD133 odpowiadają w różny sposób na rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez komórki macierzyste. Czynniki parakryne wydzielane do środowiska zewnątrzkomórkowego przez przeszczepione lokalnie w dużej ilości ASCs mogą modulować aktywność szlaków zaangażowanych w progresję, przerzutowanie i chemiooporność komórek nowotworowych.

Podsumowanie

Komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej pacjentów cierpiących na nowotwory pęcherza moczowego wykazują podobne właściwości biologiczne, m.in. kinetykę wzrostu, ekspresję markerów powierzchniowych oraz zdolność do różnicowania, jak komórki izolowane od populacji osób zdrowych. Z tego powodu wydaje się, iż mogą być z powodzeniem wykorzystane w terapiach komórkowych z zakresu urologii eksperymentalnej. Mają one jednak nietypową, niepokojącą cechę, tj. tropizm do komórek nowotworowych. Mobilizowane przez mediatory zapalne migrują do mikrośrodowiska nowotworowego, gdzie osiadają się i wbudowują w zręb nowotworu. Czynniki wydzielane przez ASCs, z jednej strony niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu regeneracji tkanki, mogą indukować wznówę choroby nowotworowej przez aktywację uśpionych komórek niewrażliwych na zastosowane leczenie. Ze względu na możliwy wpływ ASCs na progresję nowotworu i nabycie przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego istotna jest ocena zmian właściwości biologicznych komórek raka pęcherza moczowego pod wpływem czynników wydzielanych przez komórki macierzyste.

Z badań prezentowanych w ramach zgłaszanego osiągnięcia wynika, że:

1/ Komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej hodowane w obecności komórek raka pęcherza moczowego zmieniają profil syntezy rozpuszczalnych czynników bioaktywnych, zwiększając produkcję cytokin prozapalnych m.in. interleukiny 6 oraz interleukiny 8.

2/ Komórki macierzyste oddziałują na komórki raka pęcherza moczowego w warunkach *in vitro*, istotnie wpływając na ich właściwości biologiczne, w tym potencjał proliferacyjny i żywotność.

3/ Nowotworowe linie raka pęcherza moczowego obniżają swoją przylegalność do składników macierzy zewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na rozpuszczalne mediatory syntetyzowane przez komórki macierzyste, co powoduje zmiany w ich zdolności do migracji i inwazji.

4/ Sekretom komórek macierzystych powoduje zmiany fosforylacji kinaz AKT1/2/3 i ERK1/2, kluczowych elementów szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej PI3K/AKT/mTOR i MAPK.

5/ Bioaktywne molekuly syntetyzowane przez komórki macierzyste powodują zmiany fosforylacji kinaz AKT1/2/3 i ERK1/2 w komórkach CD133-dodatnich, reprezentujących populację komórek raka pęcherza moczowego o cechach nowotworowych komórek macierzystych.

Uzyskane przeze mnie wyniki i wyciągnięte wnioski mają istotne znaczenie dla określenia możliwości stosowania terapii komórkowych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej w urologii eksperymentalnej. Określenie wpływu ASCs na właściwości biologiczne komórek raka pęcherza moczowego stanowi niewątpliwy wkład w badania podstawowe prowadzone na modelu *in vitro*, które są krokiem naprzód w standaryzacji terapii komórkowych z wykorzystaniem komórek macierzystych stosowanych w praktyce klinicznej.

Literatura

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367(9518):1241–1246.

Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. 2016. Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64(6).

Cuiffo BG, Karnoub AE. 2013. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr* 6(3):220–30.

Francesco F De, Ricci G, D'Andrea F, Nicoletti GF, Ferraro GA. 2015. Human adipose stem cells: from bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev* 21(6):572–84.

Lee JN, Chun SY, Lee H-J, Jang Y-J, Choi SH, Kim DH, Oh SH, Song PH, Lee JH, Kim JK, Kwon TG. 2015. Human urine-derived stem cells seeded surface modified composite scaffold grafts for bladder reconstruction in a rat model. *J Korean Med Sci* 30(12):1754.

Leonhäuser D, Stollenwerk K, Seifarth V, Zraik IM, Vogt M, Srinivasan PK, Tolba RH, Grosse JO. 2017. Two differentially structured collagen scaffolds for potential urinary bladder augmentation: proof of concept study in a Göttingen minipig model. *J Transl Med* 15(1):3.

Lin G, Yang R, Banie L, Wang G, Ning H, Li L-C, Lue TF, Lin C-S. 2010. Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *Prostate* 70(10):1066–73.

Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(2):126–31.

O'Brien FJ. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today* 14(3):88–95.

Pokrywczynska M, Jundzill A, Adamowicz J, Kowalczyk T, Warda K, Rasmus M, Buchholz L, Krzyzanowska S, Nakielski P, Chmielewski T, Bodnar M, Marszalek A, Debski R, Frontczak-Baniewicz M, Mikułowski G, Nowacki M, Kowalewski TA, Drewa T. 2014. Is the poly (L-Lactide-Co-Caprolactone) nanofibrous membrane suitable for urinary bladder regeneration? *PLoS One* 9(8):e105295.

Pokrywczyńska M, Jundziłł A, Adamowicz J, Drewa T. 2013. [Tissue engineering - experimental method of urinary bladder regeneration]. *Postępy Hig i Med doświadczalnej* 67:790–9.

Prantl L, Muehlberg F, Navone NM, Song Y-H, Vykoukal J, Logothetis CJ, Alt EU. 2010. Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate* 70(15):1709–15.

Ramasamy R, Lam EW-F, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 21(2):304–10.

Sun Z, Wang S, Zhao RC. 2014. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* 7(1):14.

Takahara K, Ii M, Inamoto T, Komura K, Ibuki N, Minami K, Uehara H, Hirano H, Nomi H, Kiyama S, Asahi M, Azuma H. 2014. Adipose-derived stromal cells inhibit prostate cancer cell proliferation inducing apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.080>.

Tian LLH, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. 2011. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 226(7):1860–7.

Zhang L, Xiang J, Li G. 2013. The uncertain role of unmodified mesenchymal stem cells in tumor progression: what master switch? *Stem Cell Res Ther* 4(2):22.

Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD. 2013. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie* 95(12):2235–45.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza omówionym powyżej cyklem publikacji składających się na osiągnięcie naukowe, jestem również współautorką trzynastu artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych posiadających współczynnik IF i znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR), jednego artykułu w czasopiśmie spoza listy JCR oraz jednego rozdziału w zagranicznym opracowaniu zbiorowym. Łączny IF wszystkich opublikowanych przeze mnie prac naukowych wynosi 42.172, a liczba punktów MNiSW 443. Pełny wykaz prac znajduje się w załączniku nr 7 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Rozwój naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorem sześciu prac o łącznym współczynniku IF równym 11.367 i punktacji MNiSW równej 138, w tym pierwszym autorem trzech publikacji o łącznym współczynniku IF równym 3.503 i punktacji MNiSW równej 48. Byłam również współautorem dwunastu doniesień zjazdowych, w tym dziesięciu zagranicznych.

W roku 2011 ukończyłam studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską pt. „Analiza wrażliwości mutanta BRCA2 oraz innych mutantów komórkowych uszkodzonych w homologicznej rekombinacji na wybrane leki nowotworowe” realizowałam w Katedrze i Zakładzie Genetyki Molekularnej Komórki pod kierownictwem prof. dr hab. Małgorzaty Zdzenickiej. Uzyskane przeze mnie wyniki przedstawiłam na Międzynarodowej Konferencji Studentów Uczelni Medycznych w Krakowie (2011, *Analiza wrażliwości komórek mutantów Brca2 i Rad51C opornych na terapię przeciwnowotworową z wykorzystaniem wybranych chemioterapeutyków*). Po ukończeniu studiów i uzyskaniu tytułu zawodowego magistra zostałam zatrudniona w Zakładzie Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu na stanowisku starszego technika.

Początkowo moje zainteresowania naukowe skupiały się na wykorzystaniu melanocytów do celów inżynierii tkankowej. Wyniki prowadzonych wcześniej prac zostały przeze mnie zaprezentowane na XXI Kongresie Europejskiej Akademii Dermatologii i Wenerologii w Pradze (2012, *Culture of melanocytes using in vitiligo treatment: hope or danger?*) oraz na I Pomorskim Sympozjum Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej w Bydgoszczy (2013, *Zastosowanie melanocytów hodowlanych w dermatologii*). Efektem współpracy z Katedrą Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii było również współautorstwo rozdziału w zagranicznym opracowaniu zbiorowym, które w druku ukazało się już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora nauk

medycznych (Czajkowski R, Maj M, Drewa T, 2018, *Management of vitiligo: setting up a tissue culture laboratory. Vitiligo: medical and surgical management. Red. Gupta S, Olsson MJ, Parsad D, Lim HW, van Geel N, Pandya AG, Wiley-Blackwell, 317-321*).

W roku 2012 rozpoczęłam badania nad oceną przeciwczerśniakowej aktywności rosuwastatyny w warunkach *in vitro*, co stało się później tematem mojej rozprawy doktorskiej. W tym celu skontaktowałam się z p. Jerzym Pieczykolanem, Kierownikiem Laboratorium Badawczego firmy ADAMED, który udostępnił mi związek w czystej postaci do dalszych analiz. Udało mi się również pozyskać środki na badania z funduszy przeznaczonych na granty dla młodych naukowców CM UMK (*Ocena antyproliferacyjnego i proapoptotycznego działania statyn na komórki czerniaka ludzkiego - badanie in vitro*, nr projektu MN-2/WL, kierownik). Z kolei stypendium wyjazdowe Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego umożliwiło mi udział w XLIV Zjeździe Europejskiego Towarzystwa Badań Dermatologicznych w Kopenhadze, na którym przedstawiłam wstępne wyniki prowadzonych badań w formie plakatu (2014, *Rosuvastatin: is it a promising agent for melanoma chemoprevention?*).

Wyniki czteroletnich prac zebrałam w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Badanie właściwości przeciwczerśniakowych rosuwastatyny w warunkach *in vitro*”, której promotorem był prof. dr hab. Rafał Czajkowski, Kierownik Katedry Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii, a promotorem pomocniczym dr hab. Marta Pokrywczyńska, adiunkt w Zakładzie Inżynierii Tkankowej. 18 listopada 2015 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. Ostateczne wyniki badań nad oceną przeciwczerśniakowej aktywności rosuwastatyny zostały przeze mnie zaprezentowane w formie wystąpienia ustnego na X Sympozjum Naukowo-Szkoleniowe Polskiej Akademii Dermatologii i Wenerologii w Karpaczu (2015, *Czy rosuwastatyna wykazuje potencjał przeciwczerśniakowy?*) oraz na Zjeździe Sekcji Forum Młodych Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego w Ossie k. Warszawy (2015, *Analiza cytotoksycznej aktywności rosuwastatyny wobec komórek czerniaka ludzkiego w warunkach in vitro*), a także opublikowane już po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w postaci pracy oryginalnej w czasopiśmie z listy JCR (Maj M, Czajkowski R, Zegarska B, Kowaliszyn B, Pokrywczyńska M, Drewa T, 2016, *Anti-proliferative and cytotoxic activity of rosuvastatin against melanoma cells, Postępy Dermatol Alergol, 33(4): 257-262*). Za wspomnianą publikację otrzymałam Nagrodę im. Profesora Feliksa Wąsika przyznaną przez Dolnośląski Oddział Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego za najlepszą pracę z onkologii dermatologicznej opublikowaną przez polskiego badacza w danym roku. Szczegółowy wykaz doniesień konferencyjnych i publikacji związanych z badaniami prowadzonymi we współpracy z Katedrą Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i Immunodermatologii znajduje się w załączniku nr 7 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Po rozpoczęciu pracy w Zakładzie Inżynierii Tkankowej na stanowisku starszego technika, a także po awansie na stanowisko asystenta angażowałam się również w projekty dotyczące analizy cytotoksycznej aktywności związków o potencjale przeciwnowotworowym. W tym celu podjęłam współpracę z Katedrą Chemii Nieorganicznej i Koordynacyjnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Efektem prowadzonych badań były dwie prace opublikowane w czasopismach z listy JCR (*Katafias A, Impert O, Kita A, Fenska J, Koter S, Kaczmarek-Kędziera A, Różycki H, Bajek A, Uzarska M, van Eldik R, 2014, Kinetics and mechanism of the reduction of mer-Tris picolinate ruthenium(III) by L-Ascorbic acid, Eur J Inorg Chem, 2014: 2529-2535; Jarzynka P, Topolski A, Uzarska M, Czajkowski R, 2014, New dinuclear platinum complexes. Synthesis and kinetics of chloride substitution by thiourea and glutathione in water-DMF solution, Inorg Chim Acta, 413: 60-67*). Badania nad analizą nowych kompleksów cisplatyny, prowadzone we współpracy z dr. Adrianem Topolskim, kontynuowałam także po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, czego wynikiem była kolejna publikacja (*Topolski A, Rozmarynowska P, Maj M, Czajkowski R, 2017, Kinetics and mechanism of chloride substitution by thiourea, L-methionine, and glutathione in bimetallic [Pt₂(6NNqui)Cl₄] complex in water-DMF medium. Unusually slow reaction with thiourea, Inorg Chim Acta, 462: 10-15*).

Ważną częścią mojej aktywności naukowej stały się także badania na prawidłowych i nowotworowych liniach komórkowych izolowanych z dróg moczowo-płciowych. Wyniki badań nad przeciwnowotworową aktywnością ciprofloksacyny – antybiotyku z grupy fluorochinolonów - przedstawiłam na XXII Zjeździe Europejskiego Towarzystwa Urologicznego w Dreźnie (2012, *Ciprofloxacin as possible anti-cancer prophylactic agent. An in vitro study on bladder cancer cells*) oraz na XXIII Zjeździe Europejskiego Towarzystwa Urologicznego w Pradze (2013, *Cytotoxic and antiproliferative activity of ciprofloxacin against human urinary tract cancer cell lines*). W późniejszym czasie badania rozszerzyłam o analizę wpływu komórek macierzystych na wrażliwość komórek nowotworowych na ciprofloksacynę, których wstępne wyniki przedstawiłam na XXIV Zjeździe Europejskiego Towarzystwa Urologicznego w Krakowie (2014, *Do mesenchymal stem cells influence urinary tract cancer cells sensitivity to ciprofloxacin?*). Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych analiza interakcji pomiędzy mezenchymalnymi komórkami macierzystymi a komórkami raka pęcherza stała się głównym nurtem moich zainteresowań naukowo-badawczych. Ponadto, w latach 2013-2015 uczestniczyłam jako wykonawca w realizacji dwóch projektów finansowanych z funduszy Narodowego Centrum Nauki związanych z wykorzystaniem hodowli komórkowych w urologii eksperymentalnej (*Poznanie procesu gojenia pęcherza moczowego drogą do jego regeneracji*, nr projektu UMO-2012/07/D/NZ100854, wykonawca; *Badanie nowych bezpieczniejszych metod sieciowania materiałów białkowych dla inżynierii tkankowej*, nr projektu UMO-2011/03/D/ST8/04600, wykonawca).

Rozwój naukowy po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych byłam współautorem jedenastu prac o łącznym współczynniku IF równym 30.805 i punktacji MNiSW równej 305, w tym pierwszym autorem czterech publikacji o łącznym współczynniku IF równym 11.723 i punktacji MNiSW równej 105, a także współautorem jednego opracowania zbiorowego. Byłam również współautorem dziesięciu doniesień zjazdowych, w tym dwóch zagranicznych.

Zaangażowanie w projekt dotyczący poszukiwania metod sieciowania materiałów białkowych dla inżynierii tkankowej zaowocował podjęciem stałej współpracy z dr Joanną Skopińską-Wiśniewską, pracownikiem Katedry Chemii Biomateriałów i Kosmetyków, a także publikacją cyklu prac (*Skopińska-Wiśniewska J, Kuderko J, Bajek A, Maj M, Sionkowska A, Ziegler-Borowska A, 2016, 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*). Badania na tym polu rozszerzyłam o analizę właściwości innych naturalnych i syntetycznych biomateriałów o potencjalnym zastosowaniu w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej prowadzoną we współpracy z dr. Mariuszem Tszydlem, pracownikiem Katedry Ekologii i Zoologii Kręgowców Uniwersytetu Łódzkiego oraz dr. Konradem Szustakiewiczem, pracownikiem Zakładu Inżynierii i Technologii Polimerów Politechniki Wrocławskiej. Efektem badań na modelu *in vitro* były prace opublikowane w czasopismach z listy JCR (*Tszydel M, Zablotni A, Wojciechowska D, Michalak M, Krucińska I, Szustakiewicz K, Maj M, Jaruszewska A, Strzelecki J, 2015, Research on possible medical use of silk produced by caddisfly larvae of Hydropsyche angustipennis (Trichoptera, Insecta), Mech Behav Biomed Mater, 45: 142-153; Szustakiewicz K, Stępak B, Antończak AJ, Maj M, Gazińska M, Kryszak B, Piękowski J, 2018, Femtosecond laser-induced modification of PLLA/hydroxyapatite composite, Polym Degrad Stabil, 149: 152-161*).

W tym czasie zaangażowałam się również w badania nad analizą mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej. Współpraca z dr hab. Anną Bajek pozwoliła mi na rozszerzenie warsztatu naukowego, a także poznanie właściwości biologicznych komórek, które wykorzystuje się najczęściej w eksperymentalnych terapiach komórkowych. Badania zaowocowały współautorstwem dwóch prac w czasopismach z listy JCR (*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; 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). Poznanie technik wykorzystywanych przy analizie komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej umożliwiło mi również udział w projekcie finansowanym ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (*Nowoczesne protezy odprowadzające mocz dla pacjentów z rakiem pęcherza moczowego poddanych bezkontaktowym minimalnie inwazyjnym operacjom onkologicznym wycięcia pęcherza moczowego*, nr projektu Strategmed1/25368/8/NCBR/2014, wykonawca).

Zainteresowanie metodami analizy właściwości biologicznych komórek macierzystych i komórek nowotworowych, szczególnie linii nowotworowych izolowanych z układu moczowo-płciowego, a także technikami inżynierii tkankowej wykorzystywanymi w urologii eksperymentalnej zaowocowało podjęciem badań nad szeroką i wieloparametryczną analizą wzajemnych oddziaływań komórek macierzystych i nowotworowych. Udało mi się pozyskać środki na realizację badań z funduszy przeznaczonych na podniesienie kompetencji studentów i młodych naukowców na Wydziale Lekarskim CM UMK (*Wpływ sekretu mezenchymalnych komórek macierzystych tkanki tłuszczowej na komórki macierzyste raka pęcherza moczowego*, nr projektu BIOTECH100, główny wykonawca; *Poznanie wpływu rozpuszczalnych mediatorów mikrośrodowiska nowotworów układu moczowo-płciowego na fenotyp mezenchymalnych komórek macierzystych*, nr projektu MN-1/WL, kierownik). Efektem prowadzonych badań jest szereg doniesień zjazdowych (szczegółowy wykaz znajduje się w załączniku nr 7) oraz cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. Uzyskane wyniki wskazują kierunek dalszych działań, które zostaną podjęte przeze mnie w najbliższej przyszłości, a które koncentrować się będą na izolacji składowych sekretu komórek macierzystych, które mogą stanowić bezpieczny produkt inżynierii tkankowej wspomagający procesy regeneracji.

Plany badawcze

Najnowszym, podjętym przeze mnie zagadnieniem badawczym jest analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych (EVs, ang. extracellular vesicles) będących elementem komunikacji pomiędzy komórkami macierzystymi a nowotworowymi. W świetle coraz większego zainteresowania terapiami komórkowymi, także u pacjentów onkologicznych, konieczna wydaje się ocena możliwego wpływu komórek macierzystych na komórki nowotworowe. Techniki inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej koncentrują się w dużej mierze na wykorzystaniu mezenchymalnych komórek macierzystych. Coraz częściej wskazuje się jednak, że to nie same komórki poprzez mechanizmy różnicowania, ale wytwarzane przez nie rozpuszczalne mediatory odpowiadają za odbudowę tkankową w miejscu przeszczepienia. Lokalna synteza dużej ilości bioaktywnych molekuł istotnie zmienia warunki panujące w mikrośrodowisku, co może wpływać na aktywację uśpionych komórek nowotworowych. Jest to szczególnie istotne w przypadku pacjentów po przebytej radykalnej

cystektomi, u których wykorzystuje się konstrukty odprowadzające mocz, przygotowane w oparciu o innowacyjne techniki inżynierii tkankowej, gdyż pozostawiona cewka moczowa jest najczęstszym miejscem wznowy nowotworu.

Prowadzone wcześniej badania wykazały, że sekretom komórek macierzystych wpływa na proliferację i żywotność komórek raka pęcherza moczowego. Istotna dla zrozumienia wzajemnych interakcji obu typów komórek okazała się ocena oddziaływania czynników wydzielanych przez komórki izolowane z tkanki tłuszczowej na szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, głównie szlaki PI3K/AKT/mTOR i MAPK, które regulują wzrost i różnicowanie komórek nowotworowych, odpowiadają za inicjację apoptozy i wrażliwość na chemioterapeutyki, a także wpływają na nabycie fenotypu inwazyjnego przez indukcję przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Wykazałam, że wśród rozpuszczalnych mediatorów syntetyzowanych przez mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej pod wpływem komórek nowotworowych szczególnie miejsce zajmują cytokiny prozapalne promujące aktywację szlaków indukujących wzrost nowotworu. Ostatnie doniesienia wskazują jednak, że nie tylko rozpuszczalne mediatory, ale także EVs oderwane od powierzchni komórek macierzystych zmieniają fenotyp komórek nowotworowych.

EVs stanowią heterogenną populację pęcherzyków przenoszących informację pomiędzy komórkami różnych typów w postaci białek, mRNA i miRNA. Przeprowadzona analiza proteomu egzosomów z linii raka pęcherza moczowego T24 pozwoliła na identyfikację ponad 350 różnych białek. Potwierdzono, że komórki raka pęcherza moczowego są zdolne do internalizacji pęcherzyków błonowych pochodzących z innych komórek nowotworowych. Konieczne jest jednak określenie wpływu EVs izolowanych z mezenchymalnych komórek macierzystych na komórki nowotworowe, gdyż do chwili obecnej, poza jedną pracą wykorzystującą komórki macierzyste pochodzenia płodowego, skądinąd rzadko wykorzystywane w celach rekonstrukcyjnych, nie ma żadnych doniesień na temat oddziaływania pęcherzyków z komórek mezenchymalnych na komórki raka pęcherza moczowego. Izolowane EVs mogłyby stanowić produkt inżynierii tkankowej, który regulowałby procesami regeneracyjnymi, ale jednocześnie nie uruchamiałyby szlaków odpowiedzialnych za wzrost żywotności, proliferacji, czy inwazyjności komórek nowotworowych.

W tym celu planuję izolację EVs z komórek macierzystych przy użyciu nowoczesnych metod pomijających ultrawirowanie. Hodowla komórek w surowicy pozbawionej pęcherzyków błonowych pozwoli na wykluczenie wpływu egzogennych EVs na wyniki prowadzonych badań. Po identyfikacji EVs przeprowadzona zostanie inkubacja z komórkami nowotworowymi. Następnie określony zostanie potencjał proliferacyjny komórek nowotworowych, fenotyp inwazyjny i aktywacja szlaków kluczowych dla procesu progresji nowotworowej. Potwierdzenie wpływu EVs na komórki raka pęcherza moczowego wskazywałoby na konieczność poszukiwania innego źródła komórek do celów

dr n. med. Małgorzata Maj – załącznik nr 2

rekonstrukcyjnych w urologii eksperymentalnej. Z tego powodu projekt jaki planuję złożyć w przyszłych konkursach Narodowego Centrum Nauki zakłada przeprowadzenie badań w oparciu o model *in vivo*. Mając na uwadze ograniczenia badań z wykorzystaniem linii komórkowych wiarygodna analiza wzajemnych oddziaływań między MSCs a komórkami raka pęcherza moczowego nie jest możliwa bez przeprowadzenia badań na modelu zwierzęcym. Konieczna będzie również identyfikacja i pełna charakterystyka EVs, w tym określenie ich zawartości.

Małgorzata Maj