

Agnieszka Banaś-Ząbczyk

# **AUTOREFERAT**

**„Mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej w regeneracji wątroby – parakrynnny potencjał i terapeutyczne oddziaływanie *in vivo*”**

*Pracownia Biologii Komórek Macierzystych*

*Przyrodniczo – Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych*

*Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski*

2016

## 1. Imię i nazwisko

Agnieszka Banaś-Ząbczyk

## 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

**Doktor nauk biologicznych, 2008** - Wydział Biologii, Uniwersytet w Waseda, Nishi-Waseda 1-6-1, Shinjuku-ku, Tokio 169-000051, Japonia.

Tytuł pracy doktorskiej:

*(Pl.) „Różnicowanie komórek mezenchymalnych z tkanki tłuszczowej w kierunku hepatocytów: Potencjalne zastosowanie w chorobie wątrobowej.”*

*(Eng.) „Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Potential for treatment of liver disease”*

**Magister biotechnologii, (specjalność biologia molekularna) 2001** - Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków.

Tytuł pracy magisterskiej:

*(Pl.) „Wpływ egzogenego tlenku azotu i nadtlenu wodoru na stabilność genetyczną limfocytów izolowanych z krwi zdrowych donorów oraz pacjentów z chroniczną leukemią limfoidalną typu B (CLL-B), oszacowany metodą elektroforezy SCGE (Comet assay).”*

*(Eng.) “Effect of exogenous nitric oxide and hydrogen peroxide on genetic stability of lymphocytes isolated from healthy donors and from chronic lymphoid leukaemia patients (CLL-B) type B assessed by Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) method”.*

**Diagnosta laboratoryjny, 2003** – (uprawnienie zawodowe) Krajowa Rada Diagnostów Laboratoryjnych, na podstawie artykułu 9 i 10, ustawy z dnia 27 lipca 2001, o diagnostyce laboratoryjnej (Dz. U. z 2004 r. Nr 144, poz. 1529) , Seria AA 14342.

**Studia podyplomowe – Pozyskiwanie i zarządzanie funduszami na cele rozwojowe uczelni wyższej, 2011**, organizowane przez Centrum Studiów Podyplomowych Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie

**Studia podyplomowe – Certyfikowany Coach, 2016**. Kierunek: Studia podyplomowe Certyfikowany Coach. Studia realizowane przez Wydział Ekonomii, Uniwersytetu Rzeszowskiego, wraz z HPR Group Sp. z o.o. Selectone Sp.k.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

#### 3.1. Zatrudnienia na stanowisku naukowym

**2009 – do chwili obecnej** - Adiunkt, Pracownia biologii komórek macierzystych, Zakład Immunologii Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych; Samodzielna Katedra Medycyny Molekularnej, **Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski**, ul. Warzywna 1a, 35-310 Rzeszów

**2005 – 2008** - Pozycja naukowca zagranicznego, ufundowana przez Fundację Promocji Badań nad Rakiem w ramach 3-ciej Ogólnej 10-letniej Strategii Kontroli nad Rakiem, wspieranej przez Ministerstwo Zdrowia, Pracy i Opieki w Japonii. Narodowy Instytut do Badań nad Rakiem, Sekcja do badań nad metastazą, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, 104-0045 **National Cancer Center Research Institute, Tokio, Japonia**, supervisor: Prof. Takahiro Ochiya

**2004 – 2005** - Starszy referent techniczny, Laboratorium Biologii Molekularnej i Diagnostyki Genetycznej, **Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**, ul. Kopernika 15A, 31-501 Kraków, supervisor: Prof. dr hab. n. med. Aldona Dembińska-Kieć.

**2003-2004** - Stypendium szkoleniowe -Marie Curie. Laboratorium Farmakologii Zakrzepicy i Miażdżycy, **Wydział Farmakologii, Uniwersytet w Mediolanie**, Via. Balzaretti 9, 20133 Mediolan, Włochy, supervisor: Prof. Elena Tremoli.

*(Pol.) "Płytką miażdżycowa i zintegrowane podejście do prewencji choroby"*

*(Eng.) "The atherosclerotic plaque an integrated approach for disease prevention"- sponsorowane przez program "Jakość Życia i Zarządzanie Ludzkimi Zasobami". Główny temat:*

*"Ekspresja receptorów aktywowanych proteazami (PARs) w ludzkich naczyniach krwionośnych"*

**2002 – 2003** - Starszy referent techniczny, Laboratorium Biologii Molekularnej i Diagnostyki Genetycznej, **Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego**, ul. Kopernika 15A, 31-501 Kraków, supervisor: Prof. dr hab. n. med. Aldona Dembińska-Kieć.

#### 3.2 Mianowania na stanowiska funkcyjne

**2010 – 2016** Kierownik Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

**2011 – 2015** Koordynator merytoryczny projektu "Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych" w latach 2011 – 2015, realizowanego przez Uniwersytet

Rzeszowski w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2007 – 2013, nr umowy UDA-RPPK.01.03.00-18-004/12-00, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

**2016 do chwili obecnej** Kierownik Pracowni Biologii Komórek Macierzystych, Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

**4. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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 z zm.):**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej w regeneracji wątroby – parakryny potencjał i terapeutyczne oddziaływanie *in vivo*”.

**4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, strony)**

1. **Banas A.**, Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Osaki M., Kawamata M., Kato T., Okochi H., Ochiya T. 2008 (October): *IFATS Collection: In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury*. Stem Cells 2008; 26 (10): 2705-2712. (IF: 7,741 / MNiSW: 32)
2. **Banas A.**, Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Osaki M., Kato T., Okochi H., Ochiya T.: *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2009; 24 (1): 70-77. (IF: 2,317 / MNiSW: 15)
3. Ishikawa T., **Banas A.**, Hagiwara K., Iwaguro H., Ochiya T.: *Stem Cells for Hepatic Regeneration: The Role of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells*. Current Stem Cell Research & Therapy 2010; 5(2): 182-189. (IF: - / MNiSW:2)
4. Ishikawa T., **Banas A.**, Teratani T., Iwaguro H., Ochiya T.: *Regenerative Cells for Transplantation in Hepatic Failure*. Cell Transplantation 2012; 21(2-3) : 387-399. (IF: 4,422 / MNiSW: 40)
5. **Banas A.**: *Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells*. W : Ochiya T. (ed.) *Liver Stem Cells : Methods and Protocols*. Clifton : Humana Press, 2012 : 61-72 *Methods in Molecular Biology*. (IF: - /MNiSW:5)

#### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Odkrycie skutecznej terapii na przewlekłe choroby wątroby, którym często towarzyszy marskość wątroby, rak wątrobowokomórkowy oraz zakażenia wirusowe, jest priorytetem wielu ośrodków naukowo-badawczych. W zaawansowanej niewydolności wątroby ostatnią nadzieją jest przeszczep, jednak długa lista pacjentów oczekujących, dostępność odpowiedniego przeszczepu oraz wciąż wysokie ryzyko odrzucenia sprawiają, że alternatywne terapie są pilnie potrzebne. Terapie przy użyciu komórek macierzystych, mogą być alternatywą dla przeszczepu i wielką nadzieją dla pacjentów. Multipotencjalne mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) odkryte ponad 15 lat temu (1,2) w szpiku kostnym, są bardzo atrakcyjne pod względem ich zastosowania w autologicznych i allogenicznych terapiach.

*International Society for Cell Therapy*, opisało kryteria definiujące mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs), jako komórki adherentne, które na swojej powierzchni wykazują ekspresję: CD105, CD90 i CD73, oraz nie wykazują ekspresji CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 i cząsteczek kompleksu zgodności tkankowej typu II – czyli ludzki antygen leukocytarny (HLA-DR, *human leukocyte antigen*). Ponadto, komórki te wykazują zdolność do różnicowania w kierunku chondrocytów, osteocytów i adipocytów w odpowiednich warunkach *in vitro*. MSCs mogą być izolowane z wielu organów i tkanek. Do najpowszechniejszych źródeł MSCs, pod względem terapeutycznym należą: szpik kostny (1,2), krew pępowinowa (3), płyn owodniowy (4) i tkanka tłuszczowa (5,6). Wśród wyżej wymienionych, na szczególną uwagę zasługuje tkanka tłuszczowa.

Tkanka tłuszczowa jest niezwykle atrakcyjna pod względem terapeutycznym, ze względu na łatwość pozyskania i izolacji komórek z tkanki tłuszczowej, zasobność tkanki tłuszczowej w MSCs, nieinwazyjność metody pobrania bez uszczerbku na zdrowiu dawcy, oraz co najważniejsze – możliwość zastosowania w przyszłości w terapii autologicznej. W porównaniu z komórkami mezenchymalnymi ze szpiku kostnego (BM-MSCs, *bone marrow mesenchymal stem cells*), MSCs z tkanki tłuszczowej wykazują podobne, a nawet większe właściwości immunomodulacyjne (7), podobny profil markerów powierzchniowych oraz „immuno-uprzywilejowanie”. Co ciekawe, tkanka tłuszczowa zawiera więcej komórek macierzystych mezenchymalnych niż szpik kostny (8). Ponadto, w przeciwieństwie do tkanki tłuszczowej, pobieranie szpiku kostnego do izolacji komórek macierzystych jest procedurą bardziej inwazyjną.

Mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej w literaturze anglojęzycznej, były nazywane przez różnych autorów jako: adipose – derived stem /stromal cells (ASCs); adipose – derived adult stromal cells (ADAS); adipose – derived stromal cells (ADSCs); adipose mesenchymal stem cells (AdMSCs); processed lipoaspirate cells (PLA); and adipose tissue - mesenchymal stem cells (AT-MSCs). Ostatnio, *International Fat Applied Technology Society* ogłosiła oficjalną nazwę tych komórek macierzystych jako: “adipose -

derived stem cells” (ASCs), którą definiuje się jako heterogenną populację multipotencjalnych, adherentnych komórek, izolowanych z tkanki tłuszczowej. Dowiedziono, że komórki te, podobnie jak BM-MSCs, różnicują się do komórek linii mezodermalnej (chondrocyty, osteocyty, mioocyty, adipocyty) oraz linii ektodermalnej (neurony) (6,9).

Przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowaliśmy badania, w których wykazaliśmy, że ASCs mają zdolność różnicowania się w kierunku funkcjonalnych hepatocytów, a precyzyjnie w komórki hepato-(hepatocyto-) podobne (*hepatic – like cells*) (Banaś A, et., *Hepatology*, 2007, 46(1): 219-228 *Web of Science: Highly cited paper, 260 times cited na dzień: 12.07.2016*) (10). Hepatocyty wygenerowane *in vitro* z autologicznych komórek macierzystych pacjenta, mogą stanowić alternatywę dla przeszczepu wątroby i wsparcie dla funkcji wątroby w oczekiwaniu na przeszczep. Paradoksalnie, wykorzystanie ludzkich hepatocytów *in vitro* niesie ze sobą trudności, z uwagi na fakt, że komórki te są wyjątkowo wymagające pod względem prowadzenia hodowli długoterminowych. Tymczasem, komórki hepatocytopodobne wygenerowane z komórek macierzystych doskonale „radzą sobie” w warunkach hodowlanych. W naszym przypadku, proces ich różnicowania trwał 5 tygodni (10). Wygenerowane *in vitro* hepatocytopodobne komórki, pod wpływem zastosowania protokołu różnicującego *in vitro*, wykazały ekspresję markerów hepatocytów i ich funkcje (10).

Mysząc o stworzeniu skutecznej terapii przy użyciu komórek macierzystych należy wziąć pod uwagę wiele istotnych czynników:

- źródło komórek macierzystych, a w związku z tym, możliwość ich pozyskania w dużych ilościach, bez uszczerbku na zdrowiu dawcy/pacjenta
- szybkość i łatwość pobrania, izolacji i namnażania komórek macierzystych *ex vivo*
- potencjał komórek macierzystych; zdolność (predysponowanie) do różnicowania się w kierunku linii docelowej (w tym przypadku hepatocytów)
- potencjał parakryny (troficzny) komórek macierzystych, który może mieć znamienne znaczenie terapeutyczne w warunkach *in vivo* po transplantacji
- krótki protokół różnicujący, symulujący warunki *in vivo*, w celu jak najszybszego uzyskania funkcjonalnych komórek hepatocytopodobnych
- odkrycie specyficznych markerów / markera powierzchniowego, w celu wysortowania odpowiedniej homogennej sub-populacji komórek macierzystych, przed protokołem różnicującym i / lub transplantacją. Wówczas byłoby możliwe wyselekcjonowanie komórek o największej predyspozycji w kierunku linii komórek docelowych (w tym przypadku hepatocytów), jak również wyeliminowanie ryzyka niekontrolowanego różnicowania
- wykorzystanie technik inżynierii tkankowej, w tym biokompatybilnego polimeru jako rusztowania (*scaffold*), do hodowania w warunkach 3D, w celu wygenerowania fragmentów tkanki wątrobowej (*liver devices*)
- sprawdzenie zgodności tkankowej w przypadku przeszczepów allogenicznych

- sprawdzenie mechanizmu działania i wykluczenie długoterminowych negatywnych skutków działania i niekontrolowanego różnicowania komórek macierzystych *in vivo* po transplantacji

Wiele z tych obszarów jest eksplorowanych przez naukowców. Wciąż jednak jest dużo niewiadomych, choćby: fizjologiczna rola komórek mezenchymalnych czy mechanizmy działania komórek mezenchymalnych po transplantacji.

Stosunkowo niedawno doniesiono, że MSCs stymulują endogenne mikrośrodowisko poprzez produkcję czynników troficznych (*secretome*); w tym czynników wzrostu i różnicowania komórek oraz interleukin. Czynniki te są atraktantami dla potencjalnych progenitorów/komórek macierzystych gospodarza, co w konsekwencji prowadzi do regeneracji tkanek przez lokalne, jak i napływające komórki. Zdolność do parakrynnego działania i regeneracji uszkodzonych tkanek wydaje się mieć większe znaczenie w medycynie regeneracyjnej niż inkorporacja MSCs w miejscach docelowych i ich różnicowanie. Postulowano, że MSCs mogą produkować spektrum bioaktywnych czynników, stymulujących procesy proliferacji i różnicowania, jak również migrację innych asystujących komórek (fibroblasty, komórki epi- i endotelialne) do miejsca uszkodzenia (12). MSCs dostarczają czynników ochronnych i / lub wspomagających, zdolnych do hamowania apoptozy, zwłóknienia i zapalenia oraz stymulowania angiogenezy (13). Co więcej, czynniki te mogą tłumić lokalną odpowiedź immunologiczną, poprzez modulację komórek T i B oraz indukowanie ekspresji przeciwzapalnych czynników, takich jak interleukina 10 (IL-10), antagonist receptoru interleukiny 1 (IL-1RA, *interleukin 1 – receptor antagonist*), prostaglandyna E2 (PGE2, *prostaglandin E2*) (14-15).

Celem moich badań po uzyskaniu stopnia doktora było sprawdzenie, czy mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (ASCs) dorosłego człowieka mają potencjał terapeutyczny *in vivo*? Wyróżniłam także cele szczegółowe:

**A).** Czy niezróżnicowane komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ASCs) mają potencjał terapeutyczny po transplantacji do myszy Balb/c *nude*, z uszkodzeniem wątroby wywołanym przez czterochlorek węgla (CCl<sub>4</sub>)? (**Publikacja 1, 4**)

**B).** Czy można stworzyć krótki i efektywny protokół różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs), w kierunku hepatocytów? (**Publikacja 2, 4, 5**)

**C).** Czy wyróżnicowane *in vitro* w krótkim protokole, hepatocyty (precyzyjniej: komórki hepatocytopodobne; *hepatic – like cells*) z komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs), posiadają potencjał terapeutyczny po transplantacji do myszy Balb/c *nude*, z uszkodzeniem wątroby wywołanym przez czterochlorek węgla (CCl<sub>4</sub>)? (**Publikacja 2**)

**D).** Czy komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ASCs) wykazują potencjał parakryny? To znaczy, czy produkują biologicznie aktywne czynniki wzrostu i różnicowania komórek (*growth factors, GFs*) / cytokiny/ interleukiny w warunkach *in vitro*? (**Publikacja 1, 3**)

#### **Cel naukowy:**

**A).** Czy nieodróżnicowane komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ASCs) mają potencjał terapeutyczny po transplantacji do myszy Balb/c *nude*, z uszkodzeniem wątroby wywołanym przez czterochlorek węgla (CCl<sub>4</sub>)? (**Publikacja 1, 4**)

#### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Aby sprawdzić, czy ASCs wykazują właściwości terapeutyczne i mają zdolność regeneracji uszkodzonej wątroby, przeszczepialiśmy nieodróżnicowane, komórki macierzyste ASCs do myszy z ostrą niewydolnością wątroby, wywołaną czterochlorkiem węgla (CCl<sub>4</sub>). Do wszystkich eksperymentów *in vivo* zostały użyte 6-tygodniowe samice myszy z niedoborem odporności *Balb/c nude mice*. Zastosowaliśmy model ostrej niewydolności wątroby, podczas którego pojawił się stres oksydacyjny i martwica hepatocytów. Czterochlorek węgla został podany dootrzewnowo (*intraperitoneal, i.p.*), w jednej dawce (100µl oliwy zawierającej 10µl CCl<sub>4</sub>/20g masy ciała). Po upływie 24 godzin po podaniu CCl<sub>4</sub>, dokonano transplantacji nieodróżnicowanych ASCs, w ilości 1,5 x 10<sup>6</sup> komórek/ ciało myszy (0,2 ml zawiesiny komórek wstrzyknięto przez żyłę ogonową - *tail vein, i.v.*). Dwadzieścia cztery godziny po transplantacji ASCs, po 24 godzinach od transplantacji ASCs myszy uśmiercono i pobrano surowicę krwi do oceny parametrów biochemicznych. Pobrano również fragmenty wątroby myszy, do analiz patomorfologicznych i immunohistochemicznych. Myszy, którym nie przeszczepiono komórek macierzystych ASCs, miały poważne uszkodzenia wątroby. Parametry biochemiczne, takie jak stężenia : aminotransferazy alaninowej – (ALT, *alanine transaminase* / GPT, *glutamic pyruvic transaminase*), aminotransferazy asparaginianowej (AST, *aspartate aminotransferase* /GOT, *glutamic oxaloacetic transaminase*), kwasu moczowego (UA, *uric acid*), fosfatazy zasadowej (ALP, *alkaline phosphatase*) i amoniaku uległy znacznemu wzrostowi u myszy z uszkodzeniem wątroby, w porównaniu ze zdrowymi. W grupie myszy z uszkodzeniem wątroby, i którym przeszczepiono komórki macierzyste ASCs, uzyskaliśmy bardzo interesujące i zaskakujące wyniki. Po transplantacji ASCs, zaobserwowano istotny statystycznie spadek wartości wszystkich wyżej wymienionych parametrów (z wyjątkiem ALP, której poziom zmniejszył się w sposób nieistotny statystycznie), co sugerowało działanie terapeutyczne komórek macierzystych na uszkodzenie wątroby. Stężenie UA, będącego markerem stresu oksydacyjnego, znacząco statystycznie zmniejszyło się w stosunku do stężenia u myszy z uszkodzoną wątrobą i osiągnęło poziom kontroli, czyli taki jak u myszy zdrowych. Podobnie stężenie amoniaku po transplantacji ASCs, osiągnęło poziom jak u myszy zdrowych. Warto wspomnieć, że zaobserwowaliśmy wyraźne różnice w tkance



wątroby (barwienie hematoksyliną i eozyną, H&E) pomiędzy dwiema grupami mysz. W przypadku myszy, którym nie przeszczepiono ASCs, widoczne było uszkodzenie wątroby, spowodowane martwicą i zwyrodnieniem hepatocytów. Natomiast u myszy po transplatacji ASCs zaskakujące było to, że tkanka wątroby wyglądała podobnie jak zdrowa, bez wyraźnych zmian patomorfologicznych. Obserwacje te potwierdzono wynikami obniżonego stężenia ALT/GPT oraz AST/GOT u myszy po transplatacji komórek macierzystych. Barwienie immunohistochemiczne wykazało, że ludzkie komórki macierzyste ASCs, znakowane przeciwciałami ludzkiego kompleksu układu zgodności tkankowej typu I (HLA-1, *human leukocyte antigen type 1*), były obecne w różnych rejonach tkanki wątroby myszy, takich jak miąższ wątroby, naczynia krwionośne i drogi żółciowe, co wskazuje na migrację ASCs do uszkodzonej wątroby i ich wpływie na poprawę jej funkcji. Potwierdziliśmy obecność ASCs w wątrobie myszy również w badaniach bioluminescencji *in vivo*, które wykazały migrację ludzkich komórek ASCs do uszkodzonej czterochlorkiem węgla wątroby. W celu oceny, jak długo utrzymuje się efekt, wykonaliśmy analizę kinetyczną. Poziom GPT/ALT i amoniaku był monitorowany przez 120 godzin u myszy po transplatacji i utrzymywał się znacząco niższy niż u myszy bez transplatacji przez 24 godziny, po czym obniżył się do poziomu takiego jak u myszy zdrowych i utrzymywał się aż do końca pomiarów. Oznacza to, że efekt terapeutyczny utrzymuje się, a nie jest przejściowy.

### **Omówienie wykorzystania wyników:**

Jako pierwsi wykazaliśmy potencjał terapeutyczny *in vivo*, ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs). Po transplatacji do myszy z niewydolnością wątroby, znacząco poprawiły się parametry takie jak stężenia: ALT/GPT, AST/GOT, UA i amoniaku. Badania patomorfologiczne ujawniły, że tkanka wątroby u myszy po transplatacji nie ma zmian patologicznych i wygląda podobnie, jak ta z grupy kontrolnej. Wykazaliśmy, że komórki migrują do miejsca uszkodzenia, inkorporują się do tkanki wątroby oraz poprawiają jej funkcje. Wszystkie zebrane wyniki mają istotne znaczenie, w kontekście przyszłych terapii leczenia niewydolności wątroby, co zainicjowało wiele badań klinicznych (16). Jednakże, wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych w regeneracji wątroby wymaga przeprowadzenia licznych długoterminowych badań, zapewniających bezpieczeństwo pacjenta i powodzenie terapii. Obecnie na stronie: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) widnieją 204 badania kliniczne wykorzystujące komórki mezenchymalne z różnych źródeł do terapii chorób wątroby, w tym przy użyciu ASCs (2 badania kliniczne w toku i 2 badania kliniczne zakończone). Interesujący i nadal nie do końca odkryty, jest mechanizm działania ASCs, poza różnicowaniem się w miejscu uszkodzenia i fuzją z hepatocytami gospodarza. W oparciu o nasze obserwacje postulowaliśmy parakryne oddziaływanie komórek macierzystych (dane poniżej w punkcie D).

## **Cel naukowy:**

**B).** Czy można stworzyć krótki i efektywny protokół różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs), w kierunku hepatocytów? (**Publikacja 2, 4, 5**)

## **Syntetyczne omówienie wyników:**

Kolejnym celem było zmodyfikowanie i skrócenie protokołu różnicowania komórek macierzystych ASCs w kierunku hepatocytów. Idealny protokół, to taki, w którym przeprowadza się możliwie jak najmniejszą liczbę manipulacji *in vitro*. Niekontrolowane różnicowanie i tworzenie potworniaków (teratom) *in vivo* jest związane z pluripotencją komórek macierzystych. Jednakże, im bardziej ukierunkowane są komórki macierzyste, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo niekontrolowanego różnicowania. Dlatego też naszym celem było stworzenie krótkiego i efektywnego protokołu różnicującego. Protokół skróciliśmy bazując na dotychczasowej wiedzy o rozwoju płodowym wątroby u myszy. W naszych badaniach skróciliśmy protokół z 35 dni (10) do 13 dni. Protokół został wzbogacony o wstępną trzy-dniową inkubację komórek z aktywiną A i czynnikiem wzrostu fibroblastów 4 (FGF4) - czynnikami wydzielanymi przez serce i przegrodę poprzeczną mezenchymy (STM, *septum transversum mesenchyme*) podczas rozwoju wątroby. W kolejnym etapie różnicowania oprócz FGF1+FGF4+HGF (czynnik wzrostu hepatocytów)+onkostatyny M i deksametazonu, dodaliśmy do protokołu: amid kwasu nikotynowego, dimetylosulfotlenek (DMSO, *dimethyl sulfoxide*) oraz ITS (insulina, transferyna, selen). Przy użyciu zmodyfikowanego protokołu, uzyskaliśmy funkcjonalne hepatocyty (precyzyjnie hepatocytopodobne komórki, *hepatic-like cells*) w krótszym czasie. W celu sprawdzenia jakości powstałych hepatocytów, wykonaliśmy analizy real-time PCR dla albuminy oraz 2,3-dihydroksygenazy tryptofanowej (TDO2, *tryptophan 2,3-dioxygenase*) i czynnika transkrypcyjnego FOXA2 /HNF3 (forkhead / *hepatocyte nuclear factor 3 beta*) – markerów typowych dla hepatocytów. Wykazaliśmy ekspresję albuminy metodą immunofluorescencji oraz jej produkcję do medium w dniach 3, 6 i 9 procesu różnicowania, jak również zdolność wychwytywania LDL (*low density lipoproteins*) oraz zdolność magazynowania glikogenu.

## **Omówienie wykorzystania wyników:**

Wygenerowane *in vitro* w krótkim czasie funkcjonalne komórki hepatocytopodobne są niezwykle atrakcyjnym narzędziem do wykorzystania w przyszłych terapiach niewydolności wątroby. Mogą one być wygenerowane z autologicznych komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej pacjenta i stanowić wsparcie dla funkcji wątroby w oczekiwaniu na przeszczep, a nawet być jego alternatywą. Już od 6-go dnia procesu

różnicowania zaobserwowano zdolność komórek hepatocytopodobnych do wytwarzania albuminy. Pre-różnicowanie komórek macierzystych *in vitro* zmniejsza ryzyko niekontrolowanego różnicowania po transplantacji. Ponadto, takie wygenerowane hepatocyty, mogą być wykorzystane w przyszłości razem z technologiami inżynierii tkankowej w badaniach nad stworzeniem „sztucznej wątroby” (*BAL, bioartificial liver*). Markery i funkcje komórek uzyskane w tym protokole w krótszym czasie, przyczyniają się do skrócenia procedury terapeutycznej w przyszłości, jak również zredukowanego zużycia czynników wzrostu i różnicowania komórek, a tym samym obniżenia kosztów terapii. Krótki protokół różnicowania może mieć także niezwykle cenne znaczenie w badaniach nad metabolizmem leków i analizami toksykologicznymi.

#### **Cel naukowy:**

**C).** Czy wyróżnicowane *in vitro* w krótkim protokole, hepatocyty (precyzyjniej: komórki hepatocytopodobne; *hepatic – like cells*) z komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs), posiadają potencjał terapeutyczny po transplantacji do myszy Balb/c *nude*, z uszkodzeniem wątroby wywołanym przez czterochlorek węgla (CCl<sub>4</sub>)? (**Publikacja 2**)

#### **Syntetyczne omówienie wyników:**

Opisane powyżej komórki hepatocytopodobne wygenerowane *in vitro* w krótkim 13-dniowym protokole różnicującym były wszczepiane do myszy z uszkodzeniem wątroby, wywołanym czterochlorkiem węgla (CCl<sub>4</sub>). Do wszystkich eksperymentów *in vivo* zostały użyte 6-tygodniowe samice myszy z niedoborem odporności *Balb/c nude mice*. Zastosowaliśmy jak wyżej model ostrej niewydolności wątroby, podczas którego pojawia się stres oksydacyjny i martwica hepatocytów.

Czterochlorek węgla został podany dootrzewnowo (*intraperitoneal, i.p.*), w jednej dawce (100µl oliwy zawierającej 10µl CCl<sub>4</sub>/20g masy ciała). Po upływie 24 godzin po podaniu CCl<sub>4</sub>, komórki hepatocytopodobne transplantowano myszom, w ilości 1,5 x 10<sup>6</sup> komórek / ciało myszy (0,2ml zawiesiny komórek wstrzyknięto przez żyłę ogonową - *tail vein, i.v.*). Dwadzieścia cztery godziny po transplantacji ASCs, myszy uśmiercono i pobrano surowicę krwi do oceny parametrów biochemicznych. Pobrano również fragmenty wątroby myszy, do analiz patomorfologicznych i immunohistochemicznych. Stężenia parametrów biochemicznych, takich jak ALT/GPT, AST/GOT, UA, oraz amoniaku znacznie obniżyły się w grupie myszy, którym przeszczepiono komórki hepatocytopodobne, w porównaniu do grupy kontrolnej - myszy z uszkodzoną wątrobą bez transplantacji tychże komórek. Przy pomocy barwienia H&E zaobserwowano zdecydowanie większe uszkodzenie wątroby u myszy bez transplantacji. Z kolei u myszy po transplantacji komórek hepatocytopodobnych,

tkanka wątroby w rejonach nie martwiczych wykazywała mniej zmian zwyrodnieniowych hepatocytów i mniej degradacji.

#### **Omówienie wykorzystania wyników:**

Wygenerowane w 13 dni, morfologicznie i funkcjonalnie gotowe komórki hepatocytopodobne wykazują właściwości terapeutyczne *in vivo*, po transplantacji do organizmu myszy z ostrą niewydolnością wątroby. Po transplantacji, komórki te wpływają na obniżenie wartości: ALT/GPT, AST/GOT, UA oraz amoniaku, co oznacza regenerację funkcji wątroby. Pre-różnicowane komórki hepatocytopodobne po transplantacji mogą dalej dojrzewać w mikrośrodowisku wątroby i wspierać jej funkcje. Kliniczne zastosowanie komórek hepatocytopodobnych wyróżnicowanych z komórek macierzystych tkanki tłuszczowej wymaga jednak przeprowadzenia szeregu szczegółowych badań, które zapewnią bezpieczeństwo pacjenta i ogólne powodzenie terapii.

#### **Cel naukowy:**

**D).** Czy komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ASCs) wykazują potencjał parakryny? To znaczy, czy produkują biologicznie aktywne czynniki wzrostu i różnicowania komórek (*growth factors, GFs*) / cytokiny/ interleukiny w warunkach *in vitro*? (**Publikacja 1, 3**)

#### **Syntetyczne omówienie wyników:**

W celu sprawdzenia, czy ASCs wydzielają do medium biologicznie aktywne czynniki wzrostu, dokonaliśmy analizy ilościowej i jakościowej profilu cytokin/czynników wzrostu i różnicowania komórek. Analizę przeprowadziliśmy w porównaniu z ludzkimi fibroblastami (*normal human dermal fibroblasts; NHDFs*) oraz ludzkimi komórkami macierzystymi ze szpiku kostnego (BM-MSCs). Zaobserwowaliśmy, że ASCs produkują statystycznie znacznie więcej biologicznie aktywnych czynników niż BM-MSCs, w tym interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 8 (IL-8), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*), czynnika wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*) oraz białka chemotaktycznego monocytów typu 1 MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*) – czynników odpowiedzialnych za stymulację regeneracji hepatocytów; antagonisty receptora interleukiny 1 (IL-1RA) – czynnika immunosupresyjnego; czynnika wzrostu kolonii granulocytów (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – czynników stymulujących hematopoezę. Jako pierwsi opublikowaliśmy dane wskazujące na to, że ASCs różnią się pod względem wydzielania biologicznie aktywnych czynników od BM-MSCs. Opisałiśmy również inne czynniki produkowane zarówno przez BM-MSCs, jak i ASCs, takie

jak: naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*VEGF, vascular endothelial growth factor*), który był produkowany i wydzielany zarówno przez ASCs jak i przez BM-MSCs w przeciwieństwie do fibroblastów, które go nie produkowały. Inne aktywne czynniki były produkowane przez mezenchymalne komórki macierzyste z tkanki tłuszczowej (ASCs) jak również ze szpiku kostnego (BM-MSCs), takie jak: interleukina 7 (Il-7), interleukina 10 (Il-10), interleukina 15 (Il-15), interleukina 17 (Il-17), interleukina 12p40 (Il-12p40), interleukina 12p70 (Il-12p70), białko indukowane przez interferon (*IP-10, interferon gamma induced protein 10*), białko zapalne makrofagów 1 alfa (*MIP-1alfa, macrophage inflammatory protein 1 alfa*), białko zapalne makrofagów 1 beta (*MIP-1beta, macrophage inflammatory protein 1 beta*), eotaksyna, fraktalina i epidermalny czynnik wzrostu (*EGF, epidermal growth factor*). Co ciekawe, zaobserwowaliśmy różnice w produkcji interleukin oraz czynników wzrostu i różnicowania komórek przez ASCs, w zależności od dawcy. Można zatem wnioskować, iż ASCs różnią się pomiędzy dawcami nie tylko potencjalnością i profilem markerów powierzchniowych, jak donoszą dane literaturowe, ale także potencjałem troficznym. Takie spostrzeżenia wydają się być niezmiernie istotne w kontekście stworzenia skutecznej zindywidualizowanej terapii niewydolności wątroby.

#### **Omówienie wykorzystania wyników:**

Podsumowując, unikalne właściwości ASCs, takie jak zdolność do proliferacji, różnicowania w wyspecjalizowane komórki oraz wydzielania czynników troficznymi, w połączeniu z ich migracją do miejsc naprawy, sprawia, że ten rodzaj mezenchymalnych komórek macierzystych jest doskonałym narzędziem do technik inżynierii tkankowej w medycynie regeneracyjnej. Odkrycie faktu, że mezenchymalne komórki macierzyste produkują czynniki troficzne, było przełomowe, gdyż dzięki niemu możemy poznać i zweryfikować mechanizm działania mezenchymalnych komórek macierzystych *in vivo*. Do tej pory postulowano, że komórki te mogą różnicować się *in vivo* w docelowe komórki wyspecjalizowane, bądź ulegać fuzji z komórkami docelowymi i tym samym wpływać na naprawę funkcji i regenerację narządów. Obecnie wiemy, że poprzez produkcję aktywnych molekuł, które stymulują regenerację hepatocytów i wykazują działanie przeciwzapalne, komórki mezenchymalne z tkanki tłuszczowej mogą wspierać funkcje wątroby i tym samym mieć działanie terapeutyczne *in vivo*. Odkrycie troficznej aktywności ASCs, prawdopodobnie wyjaśnia terapeutyczny potencjał niezróżnicowanych ASCs, który opisaliśmy w rozdziale A.

Spis pozostałych prac powstałych w tej tematyce (PO UZYSKANIU TYTUŁU DOKTORA):

Ochiya T., Yamamoto Y., **Banas A.**: Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation* 2010 ; 79 (2): 65-73. (IF: **3,069** / MNiSW: **32**)

Katsuda T., Kurata H., Tamai R., **Banas A.**, Ishii T., Ishikawa S., Ochiya T.: *The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease.*

W: Christ B., Oerlecke J., Stockp. (ed.) *Animal Models for Stem Cell Therapy*. New York: Springer, 2014: 57-67 (Methods in Molecular Biology. ISSN: 1064-3745; 1213). (IF:-/MNIW:5)

**Banas A.:** *Komórki macierzyste – perspektywy i zagrożenia* (praca redakcyjna) *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego*. 2010, 8: 117-127 (IF: - /MNIW: 6)

Kocan B., Maziarz A., Tabarkiewicz J., **Banas-Zabczyk A.:** The variety of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their unique properties as a background of their regenerative potential. (*Cellular and Molecular Biology w recenzji*)

#### Piśmiennictwo:

1. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow 2002 *Nature*; 418: 41–49.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
3. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al., Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol*. 2004, 83:733-738.
4. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM,. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reprod*. 2004; 19:1450-1456.
5. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7:211-228.
6. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295
7. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005; 129(1):118-29.
8. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24:1294-301.
9. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE., neurogenic differentiation of murine and human adipose – derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 294:371-379.
10. Banas A, et., al. Adipose tissue - derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 2007, 46(1): 219 – 228.
11. Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, Ochiya T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* 2013; 13(10-11):1637-53.
12. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010; 5(2):103-10.
13. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and anti-apoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109(10):1292-8.
14. Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, Maeda T, Kajino Y, Iwai S, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskelet*

Disord. 2015; 16: 236.

15. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem. 2006; 98(5):1076-84.

16. Squillaro T., Peluso G and Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. Cell Transplantation 2016, 25: 829-848.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

### 5.1. Szczegółowe zestawienie liczbowe opublikowanych prac oraz wskaźników punktowych. Indeks Hirsha oraz liczba cytowań

	Cykl publikacji (osiągnięcie naukowe)			Pozostały dorobek			Łączny dorobek		
	liczba prac	IF	KBN/ MNIŚW	liczba prac	IF	KBN/ MNIŚW	liczba prac	IF	KBN/ MNIŚW
<b>Artykuły oryginalne opublikowane w recenzowanych czasopismach posiadających "impact factor"</b>	<b>2</b>	<b>10.058</b>	<b>39</b>	<b>6</b>	<b>22.26</b>	<b>129</b>	<b>8</b>	<b>32.318</b>	<b>168</b>
Prace poglądowe w czasopismach z "impact factor"	1	4,422	40	5	11,714	121	6	16.136	161
Prace poglądowe w czasopismach bez "impact factor"	1	---	2	3	---	10	4	---	12
Rozdziały w podręcznikach międzynarodowych	1	---	5	2	---	12	3	---	17
Autorstwo podręcznika/ monografii	---	---	---	1	---	5	1	---	5
<b>SUMA</b>	<b>5</b>	<b>14,48</b>	<b>86</b>	<b>17</b>	<b>33.974</b>	<b>277</b>	<b>22</b>	<b>48.454</b>	<b>363</b>

**Liczba cytowań: 772** Web of Science /**850** Scopus (24.05.2016)

**Indeks Hirscha: 11** Web of Science /**10** Scopus (24.05.2016)

Sumaryczny Impact Factor (punkty MNIŚW)	Bez uwzględnienia artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe	Z uwzględnieniem artykułów stanowiących główne osiągnięcie naukowe
<b>Całkowity</b>	33.974 (277)	48.454 (363)
<b>Po doktoracie</b>	10.016 (128)	24.496 (214)
<b>Przed doktoratem</b>	23.958 (149)	23.958 (149)

## 5.2. Omówienie innych osiągnięć naukowych po doktoracie

### 5.2.1. Badanie wpływu pola elektromagnetycznego *in vitro* na biologię mezenchymalnych komórek macierzystych

Poza badaniami dotyczącymi głównego osiągnięcia naukowego, zajmowałam się kilkoma innymi pracami. Obecnie w pracowni dysponujemy innowacyjną aparaturą, dzięki której mamy możliwość stymulowania komórek w warunkach *in vitro* polem elektromagnetycznym o różnych częstotliwościach. Mamy kilka projektów w toku. Naszym celem jest zbadanie, jaka częstotliwość, natężenie pola elektromagnetycznego oraz czas stymulacji wpływa na różnicowanie komórek w kierunku danej linii docelowej. Wraz z moim zespołem opublikowaliśmy w tym roku przegląd wszystkich osiągnięć badawczych, w których traktowano *in vitro* ludzkie komórki mezenchymalne (izolowane z różnych źródeł) polem elektromagnetycznym. Wiemy z literatury, że pole elektromagnetyczne o odpowiednio dobranych parametrach może wpływać stymulująco na różnicowanie komórek macierzystych w kierunku chondrocytów i osteocytów. Wiemy również, że istnieją takie jakości pola elektromagnetycznego, które wywołują stres oksydacyjny i zmiany patologiczne w komórkach, w tym nowotwory. W naszym kolejnym projekcie badamy, jaka częstotliwość, jakość pola elektromagnetycznego oraz czas stymulacji, indukuje trwałe zmiany w epigenomie, genomie i proteomie komórek macierzystych. Wykorzystując technikę spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), zaobserwowaliśmy interesujące zmiany w strukturze lipidów, białek i kwasów nukleinowych, jakie pojawiły się pod wpływem stymulacji polem elektromagnetycznym o jednakowych parametrach ale w różnych przedziałach czasowych (publikacja w przygotowaniu). Jako, że różne grupy naukowo-badawcze stosują w swoich eksperymentach różne zakresy wartości natężenia i częstotliwości pola, tak więc dane literaturowe dotyczące tego tematu nie są jednoznaczne, naszym celem w dalszej perspektywie jest dobranie takich warunków hodowli i parametrów pola elektromagnetycznego (częstotliwość, natężenie oraz czas stymulacji), które nie będą mieć negatywnego wpływu na biologię komórek macierzystych, a które będą wspierać proces różnicowania. Przy współpracy z zespołem prof. Takahiro Ochiya, izolujemy egzosomy, produkowane przez ASCs, pod wpływem stymulacji polem elektromagnetycznym o odpowiednich parametrach i badamy obecne w nich miRNA. Wiemy, że egzosomy to wyrafinowana forma dystrybucji miRNA w organizmie człowieka i może mieć olbrzymi wpływ na indukowanie procesów zarówno regeneracji jak i patogenezy pod wpływem czynników środowiskowych.



Spis prac powstałych w w/w tematyce:

Maziarz A., Kocan B., Bester M., Budzik S., Cholewa M., Ochiya T., and **Banas A.** *How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts.* Stem Cell Research & Therapy 2016; 7:54 (1-12) (IF: **3,368** / MNiSW: **35**)

Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, **Banas A** and Ochiya T (2009). Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. *Methods in Molecular Biology*, 487:83-92 (IF: - / MNiSW: **5**)

Kocan B, Łach K, Cebulski J, **Banas – Zabczyk A.** *The molecular composition alterations induced by EMF in adipose-derived stem cells: FT-IR spectroscopy analysis.* (w przygotowaniu)

### **5.2.2. Analiza porównawcza komórek macierzystych izolowanych z nasierdziowej oraz podskórnej tkanki tłuszczowej izolowanej od dorosłego człowieka.**

Ponadto koordynuję badania, w których analizujemy i porównujemy profile mikroanalizy elementarnej, profilu białkowego, genetycznego i epigenetycznego, jak również potencjał różnicujący komórek macierzystych izolowanych z nasierdziowej i podskórnej tkanki tłuszczowej człowieka. Chcemy sprawdzić w jakim stopniu różnią się profile tych komórek izolowanych z różnych źródeł od tego samego pacjenta i czy ma to przełożenie na ich potencjał różnicujący, a w przyszłości na rozwój terapii po zawale mięśnia sercowego.

### **5.2.3. Wpływ pola elektromagnetycznego *in vitro* na różnicowanie komórek macierzystych**

Jest to projekt, w którym wykorzystujemy „rusztowania” (*scaffolds*) i badamy, jak ASCs różnicują się w chondrocyty i osteocyty po wpływie mikrośrodowiska różnicującego, obecności rusztowania, jak również stymulacji polem elektromagnetycznym o odpowiednio dobranych parametrach. Naszym celem jest dobranie takich warunków pola elektromagnetycznego, które będą optymalne dla procesu różnicowania ASCs w komórki chrząstki i kości. Produkcja różnorodnych czynników biologicznie aktywnych przez ASCs ma istotne znaczenie w kontekście medycyny regeneracyjnej, dlatego zamierzamy zbadać wpływ pola elektromagnetycznego na potencjał troficzny ASCs.

### **5.2.4. Wpływ pola elektromagnetycznego na kiełkowanie roślin.**

Wraz z zespołem Katedry Biofizyki Uniwersytetu Rzeszowskiego, prowadzimy wspólny projekt, w którym badamy zmiany w ekspresji genów w rzodkiewce (*Raphanus sativus*), wywołane stymulacją jej nasion stałym i zmiennym polem elektromagnetycznym w dwóch przedziałach czasowych: 3- i 12 minut. Dotychczas, wykazaliśmy znaczący wpływ na

szybkość i indeks kiełkowania (GRI, *germination rate index*), długość siewek i korzenia. Obecnie badamy zmiany na poziomie ekspresji wybranych genów pod wpływem stymulacji polem elektromagnetycznym.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

Małgorzata Konefał-Janocha, **Agnieszka Banaś**, Mariusz Bester, Damian Bocak, Sylwia Budzik and Marian Cholewa. *The effect of stationary and variable electromagnetic fields on germination and early growth of radish (Raphanus sativus)*. (Bioelektromagnetyka w recenzji)

Sylwia Budzik, **Agnieszka Banaś**, Mariusz Bester, Damian Bocak, Małgorzata Konefał-Janocha, Andrzej Nowrot and Marian Cholewa. *True magnetic field shape generated by systems for application in Biology and Medicine*. *Journal of Electromagnetic Waves and Applications* (w recenzji)

### 5.2.5. Poczucie koherencji życiowej studentów biorących udział w warsztatach

#### relaksacyjnych YES!+ (youth empowerment seminar)

Swoje zainteresowania naukowe, jak również osobiste, od samego początku działalności kierowałam ponadto, na zagadnieniach związanych z wpływem różnych czynników na utrzymanie zdrowia i homeostazy. Mając na uwadze obecnie bardzo istotny problem społeczny, jakim jest przewlekły stres, przeprowadziliśmy badania ankietowe młodzieży przed i po udziale w programie YES!+ (youth empowerment seminar plus). YES!+ to trwający 6 dni specjalny program grupowy, prowadzony przez wyszkolonego trenera, polegający na wykonywaniu odpowiednio dobranych zestawów ćwiczeń, technik oddechowych, jogi, oraz technik „mindfulness”. Poziom koherencji życiowej studentów przed i po programie mierzyliśmy testem SOC29 – jest to teoria salutogenezy ogłoszona przez Arona Antonovsky’ego. Przedstawia ona propozycję kompleksowego podejścia do problemu zdrowia w aspektach psycho↔bio↔społecznym. Jej centralnym pojęciem jest dość uniwersalna właściwość osobowościowa nazwana „poczuciem koherencji” (*sense of coherence*) – definiowana jako „ogólna orientacja, wyrażająca, w jakim stopniu człowiek ma dojmujące, trwałe, choć dynamiczne przekonanie o przewidywalności środowiska wewnętrznego i zewnętrznego oraz o tym, że z dużym prawdopodobieństwem sprawy przyjmą tak pomyślny obrót, jakiego można oczekiwać na podstawie racjonalnych przesłanek” (Antonovsky). W naszych badaniach wykazaliśmy, że program ten znacząco wpłynął na poziom poczucia zrozumiałości, zaradności i sensowności – czyli poczucia koherencji życiowej u studentów.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

**Banas A.**, Petela E. *Psychosomatic effects of stress – positive effects of relaxation techniques*. W: Zych B., Barnaś E. (ed.) *The individual Model of the Care over Mother and Child*. Rzeszów : Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, 2013 : 183-194. ISBN: 978-83-7338-883-3 (IF: - / MNiSW: 5)

**Banas A.**, Kocan B., Jakubczyk P., Majchrowski K. Sense of coherence (SOC29) in students after 6 day of stress release program (SKY). (w przygotowaniu)

### 5.2.6. Zmiany w postawie ciała zachodzące wraz z wiekiem

Jako że osobiście interesują mnie techniki radzenia sobie ze stresem, takie jak „mindfulness”, ćwiczenia oddechowe, „body work” i terapia czaszkowo – krzyżowa (*craniosacral*), swoje zamiłowanie przeniosłam na grunt naukowy i wraz ze specjalistami z dziedziny fizjoterapii skoncentrowaliśmy się na pewnych parametrach postawy ciała, na które wpływ mają czynniki wewnętrzne, w połączeniu z czynnikami takimi jak wiek, pozycja siedząca, czy stabilność posturalna. Parametry postawy ciała u wszystkich badanych oceniono za pomocą metody fotogrametrycznej opartej na zjawisku mory projekcyjnej, wykorzystując aparaturę firmy CQ Elektronik System. Co ważne, nasze badania znajdują zastosowanie w praktyce, i tak w przypadku badań na grupie osób starszych, dotyczących zależności pomiędzy krzywiznami przednio-tylnymi a równowagą, oraz zmian zachodzących w postawie ciała wraz z wiekiem, wyniki wskazują na konieczność wdrożenia ćwiczeń reedukacji posturalnej w proces rehabilitacji oraz profilaktyki w grupie osób starszych. Zarówno postawa ciała wpływa na wiele składowych wybranych parametrów życiowych człowieka, jak również parametry postawy ciała ulegają zmianie pod ich wpływem. Czynniki te mogą być modyfikowalne, tak jak przypadku pozycji siedzącej czy obciążenia plecakiem, co można zmieniać i dostosowywać tak, aby warunki dla kręgosłupa były optymalnie ergonomiczne. W przypadku czynników niepodlegających modyfikacji, takich jak zmiany w postawie ciała zachodzące z wiekiem, wyniki badań naukowych pomogą w opóźnieniu zmian degeneracyjnych poprzez terapię celowaną i fizjoprofilaktykę.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

Drzal-Grabiec J., Snela S., Rykala J., Podgorska J., **Banas A.**: *Changes in the body posture of women occurring with age*. BMC Geriatrics 2013; 13 Article Number: 108. (IF:2,000/MNiSW:0)

Drzal-Grabiec J., Snela S., Podgorska-Bednarz J., Rykala J., **Banas A.**: *Examination of the Compatibility of the Photogrammetric Method with the Phenomenon of Mora Projection in the Evaluation of Scoliosis*. Biomed Research International 2014 Article Number: 162108 (poprzedni tytuł: Journal of Biomedicine and Biotechnology) (IF:1,579/MNiSW:30)

### **5.3. Inne osiągnięcia po doktoracie**

#### **5.3.1. Koordynowanie Projektu „Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań**

##### **Innowacyjnych”**

Poza badaniami dotyczącymi głównego osiągnięcia naukowego, pełniłam dodatkowe funkcje organizacyjne. Przede wszystkim, w latach 2011 – 2015 sprawowałam funkcję koordynatora merytorycznego projektu „Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych”, na Wydziale Medycznym Uniwersytetu Rzeszowskiego, w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2007 – 2013, nr umowy UDA-RPPK.01.03.00-18-004/12-00. W tym okresie, wraz z moim zespołem, byłam zaangażowana w koordynowanie wszelkich prac pomiędzy naukowcami, lekarzami, administracją i głównym wykonawcą projektu. Zajmowałam się konsultowaniem projektów pod kątem przyszłego rozmieszczenia laboratoriów naukowych zgodnie z ich profilem badawczym, konsultowaniem i akceptowaniem bieżących adaptacji w projektach funkcjonalno-użytkowych, jak również planowaniem i zamawianiem aparatury naukowo-badawczej.

Projekt jest zakończony i możemy się cieszyć dwoma budynkami, a w nich 17-ma specjalistycznymi laboratoriami naukowo-badawczymi.

#### **5.3.2. Utworzenie Pracowni Biologii Komórek Macierzystych**

Swoje zainteresowania naukowe, od samego początku koncentrowałam na komórkach macierzystych i czynnikach mikrośrodowiska, jakie wpływają na ich biologię, co zaowocowało utworzeniem Pracowni Biologii Komórek Macierzystych, którą kieruję do tej pory. W pracowni tej są prowadzone hodowle komórek do projektów i badań klinicznych jakie w obrębie Wydziału są prowadzone.

#### **5.3.3. Współpraca z zagranicą. Uczestnictwo w programach europejskich, stażach i wyjazdach naukowych po doktoracie**

- **Staż zagraniczny** w ramach współpracy z zespołem prof. Takahiro Ochiya z Division of Molecular and Cellular Medicine, National Cancer Center Research Institute, (NCCRI) 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, 104-0045 Tokyo, Japan. Temat projektu – „ Zmiany epigenetyczne w komórkach macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ASCs) pod wpływem stymulacji polem elektromagnetycznym (EMF) *in vitro*” (5–18.08.2016)

- **Wizyta studyjna** - UR Nowoczesność i przyszłość regionu (NIPR), Projekt współfinansowany przez Unię Europejską, w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Miejsce wizyty - University of Toyama, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Education, 2630 Sugitani Toyama 930 -0194, Japan. (11-20 maja **2015**). Cel wizyty studyjnej: poznanie nowoczesnych technik laboratoryjnych, które będą wykorzystane do badań nad aspektami immunologicznym oraz biochemicznymi patologii ciąży, oraz zagadnienia dotyczące komórek macierzystych z krwi pępowinowej.
- **Staż zagraniczny** - UR Nowoczesność i przyszłość regionu (NIPR), Projekt współfinansowany przez Unie Europejską, w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Szkolenie w ramach wsparcia kadry naukowej. Miejsce stażu - Craniosacral Therapy Educational Trust (CTET) „*The Speech of Embryo*” z prof. Jaap van der Wal oraz Michael Kern. London, UK. (25.05 – 11.06 **2012**).
- **Staż zagraniczny** - ERASMUS Programme – wyjazd pracownika uczelni - „*Uczenie się przez całe życie*” – Miejsce stażu - College of Cranio-Sacral Therapy (CCST), London, UK. (24.04 – 12.05 **2011**). – “*Birth, Babies, Children, Mothers*”

#### **5.3.4. Dalsze plany naukowe**

Ponadto, wraz z lekarzami i naukowcami szpitali klinicznych oraz fizykami, biofizykami i biotechnologami Uniwersytetu Rzeszowskiego rozwijamy medycynę regeneracyjną na Podkarpaciu. Jesteśmy na etapie przygotowań do utworzenia Biobanku komórek mezenchymalnych (grant w recenzji). Inicjujemy prace nad stworzeniem skutecznych terapii między innymi, w rekonstrukcji chrząstek i kości. W związku z tym, chcemy stworzyć optymalne zarówno dla wzrostu komórek macierzystych, jak i zdrowia pacjenta rusztowania (*scaffold*) przy użyciu odpowiednich biopolimerów i drukarki 3D (*bioprinting 3D*), odpowiednie do przyszłych terapii dla pacjentów.

#### **5.4. Omówienie osiągnięć naukowych przed doktoratem**

Jako młody naukowiec, po studiach pracowałam w Katedrze Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierownictwem prof. Aldony Dembińskiej-Kieć. Tam zajmowałam się częścią badań w projektach: DLARFID (*Dietary Lipids as a Risk Factors in Development, QLRT-CT-2001-00183 5th Framework Programme*) oraz LIPGENE (*Food Quality and Safety FOOD-CT-2003-505944, 6<sup>th</sup> Frame work Programme "Diet genomics, and metabolic syndrome: and integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis"*). Badania przy tych projektach miały na celu ocenę wpływu wybranych składników

odżywczych na komórki endotelialne, komórki macierzyste, jak i komórki nowotworowe. W wynikach przedstawiliśmy stymulujący wpływ beta-karotenu na angiogenezę w komórkach endotelialnych *in vitro* i *in vivo*. W badaniach z zastosowaniem mikromacierzy, zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję w grupach genów odpowiedzialnych za procesy reorganizacji macierzy pozakomórkowej, adhezji komórkowej oraz migracji komórek pod wpływem beta-karotenu. Wykazaliśmy również anty-apoptotyczny wpływ beta-karotenu na komórki endotelialne i proapoptotyczny wpływ na linię białaczki monoblastycznej U937.

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

Dembinska-Kiec A., Polus A., Kiec-Wilk B., Grzybowska J., Mikołajczyk M., Hartwich J., Razny U., Szumilas K., **Banas A.**, Bodzioch M., Stachura J., Dyduch G., Laidler P., Zagajewski J., Langman T., Schmitz G.: *Proangiogenic activity of beta-carotene is coupled with the activation of endothelial cell chemotaxis*. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 2005; 1740 (2): 222-239 (IF: **2,382** / MNiSW: **20**)

Bodzioch M., Dembinska-Kiec A., Hartwich J., Lapicka-Bodzioch K., **Banas A.**, Polus A., Grzybowska J., Wybranska I., Dulinska J., Gil D., Laidler P., Placha W., Zawada M., Balana-Nowak A., Sacha T., Kiec-Wilk B., Skotnicki A., Moehle C., Langmann T., Schmitz G.: (Schmitz, G.): *The microarray expression analysis identifies BAX as a mediator of beta-carotene effects on apoptosis*. *Nutrition and Cancer-An International Journal*. 2005; 51 (2): 226-235 (IF: **2,426** / MNiSW: **20**)

W latach 2003-2004 pracowałam w ramach stypendium szkoleniowego Marie Curie – w Laboratorium Farmakologii Zakrzepicy i Miażdżycy, Wydziału Farmakologii, Uniwersytetu w Mediolanie, u profesor Eleny Tremoli. Podczas tego pobytu poznawałam zaawansowane techniki biologii molekularnej i hodowli komórkowych, w projekcie o temacie: „Płytką miażdżycowa, zintegrowane podejście do prewencji choroby - ekspresja receptorów aktywowanych proteazami (PARs) w ludzkich naczyniach krwionośnych”.

W latach 2005 – 2008 otrzymałam prestiżową pozycję naukowca zagranicznego, ufundowaną przez Fundację Promocji Badań nad Rakiem, w Narodowym Instytucie do Badań nad Rakiem w zespole naukowo-badawczym pod kierownictwem profesora Takahiro Ochiya. Głównym tematem moich badań była charakterystyka komórek macierzystych z tkanki tłuszczowej (ASCs), oraz sprawdzenie czy komórki te mają potencjał do różnicowania w kierunku hepatocytów, gdyż wtedy nie było doniesień literaturowych odnoszących się do tego tematu. Opisaliśmy markery powierzchniowe komórek ASCs, wysortowaliśmy homogeną subpopulację CD105<sup>+</sup>ASCs. Marker CD105 (endoglina), to część kompleksu receptora TGF beta (*transforming growth factor beta*), który jest jednym z markerów powierzchniowych komórek mezenchymalnych. Subpopulację CD105<sup>+</sup>ASCs z sukcesem różnicowałam do różnych linii komórek mezenchymalnych oraz do hepatocytów (linii endodermalnej). Zastosowałam 5-tygodniowy protokół *in vitro*, tzw. *HIFC* (*hepatic induction factor cocktail*) (czynnik wzrostu fibroblastów 1 (FGF1) + czynnik wzrostu fibroblastów 4 (FGF4) + czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) przez 3 tygodnie, a następnie: onkostatyna M + deksametazon przez 2 tygodnie, na pokrytych kolagenem typu I szalkach). Wygenerowane *in vitro* hepatocytopodobne komórki wykazały ekspresję markerów i funkcje

hepatocytów. Wyniki uzyskane z analizy transkryptomu i szlaków przekaźnictwa sygnałów przy użyciu mikromacierzy, wykazały podobieństwo komórek hepatocytopodobnych do ludzkich hepatocytów, oraz potwierdziły tezę o różnicowaniu poprzez przejście mezenchymalno-epitelialne (MET; *mesenchymal-to-epithelial transition*).

Spis prac powstałych w w/w tematyce:

**Banas A.**, Teratani T., Yamamoto Y., Tokuhara M., Takeshita F., Quinn G., Okochi H., Ochiya T.: *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes*. Hepatology. 2007; 46 (1): 219-228 (IF: **10,734** / MNiSW: **24**)

**Banas A.**, Yamamoto Y., Teratani T., Ochiya T.: *Stem cell plasticity: Learning from hepatogenic differentiation strategies*. Developmental Dynamics. 2007; 236 (12): 3228-3241 (IF: **3,084** / MNiSW: **24**)

Yamamoto Y\*, **Banas A.\***, Murata S., Ishikawa M., Lim C.R., Teratani T., Hatada I., Matsubara K., Kato T., Ochiya T.: *A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells*. FEBS Journal 2008 ; 275 (6): 1260-1273

\*Equal contribution (IF: **3,139** / MNiSW: **27**)

**Banas A.**, Quinn G., Yamamoto Y., Teratani T., Ochiya T.: *"Stem cells into liver" - Basic research and potential clinical applications*. Tissue Engineering Book Series: Advances In Experimental Medicine And Biology 2006; 585: 3-17 (IF: **0,646** / MNiSW: **10**)

Rzeszów, 11.10.2016

Miejscowość i data

Armienna Banaś-Zsborly

Podpis kandydata

Miejscowość i data

Podpis kandydata