



AUTOREFERAT

Dr Joanna Brzeszczyńska

**Katedra Biofizyki Molekularnej
Instytut Biofizyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki**

➔ **Łódź, 2021**

SPIS TREŚCI

	Str.
1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego	4
4.3. Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład cyklu publikacji jednotematycznych osiągnięcia naukowego oraz uzyskanych wyników wraz ze wskazaniem potencjału ich wykorzystania	6
4.3.1. Wprowadzenie	6
4.3.2. Cel naukowy badań	12
4.3.3. Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe	12
4.3.4. Znaczenie wyników wraz z możliwościami ich wykorzystania oraz podsumowanie prac i wnioski końcowe	30
5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej	32
5.1. Działalność naukowa przed doktoratem oraz w trakcie doktoratu	32
5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora	33
5.3. Podsumowanie dorobku naukowego oraz wskaźniki bibliometryczne	41
5.4. Współpraca z ośrodkami międzynarodowymi w zakresie prowadzonych projektów naukowych	43
5.5. Udział w projektach badawczych	44
5.6. Nagrody	45
5.7. Informacja o wystąpieniach na międzynarodowych konferencjach naukowych z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie oraz przewodniczenie sesji na konferencjach naukowych i udział w komitetach organizacyjnych	46
5.8. Członkostwo w komitetach redakcyjnych czasopism oraz informacja o recenzowaniu artykułów naukowych	47
5.9. Członkostwo w towarzystwach naukowych	47
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę	47
6.1. Działalność dydaktyczna	47
6.1.1. Działalność dydaktyczna na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ	47
6.1.2. Działalność dydaktyczna na uczelniach zagranicznych	48
6.1.3. Opieka nad pracami doktorskimi	48
6.2. Działalność popularyzująca naukę	49
7. Zagraniczne staże naukowe i szkolenia	49
8. Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej	49
9. Bibliografia	50

1. Imię i nazwisko

Joanna Brzeszczyńska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 1995 Magister biologii - dyscyplina: biofizyka**
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki.
Tytuł pracy magisterskiej: „*Badania śluzu żółdkowego człowieka w różnych stanach chorobowych*”.
Kierujący pracą: prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński, Zakład Badań Struktury Biopolimerów, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki.
- 1999 Doktor nauk biologicznych - dyscyplina: biofizyka**
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki.
Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badanie zmian w strukturze komponentów erytrocytów wywołanych przez stres oksydacyjny*”.
Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński, Zakład Badań Struktury Biopolimerów, Katedra Biofizyki Molekularnej, Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki.
Recenzenci: prof. dr hab. Zofia Józwiak, Katedra Termobiologii (obecnie Katedra Biofizyki Medycznej), Uniwersytet Łódzki.
prof. dr hab. Tadeusz Sarna, Zakład Biofizyki, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1994 – 1995** Pracownik naukowo-techniczny, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego.
- 1995 – 1999** Doktorant, Studia Doktoranckie, Katedra Biofizyki Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego.
- 2000 – 2003** Clinical Research Associate, Dział Naukowy d/s Badań Klinicznych, Merck, Sharp and Dohme (MSD), Warszawa.
- 2004 – 2006** Urlop macierzyński.
- 2006 – 2008** Research Associate and Teaching Fellow, School of Life Sciences, Heriot-Watt University, Edynburg, Wielka Brytania.
- 2008 – 2009** Urlop macierzyński.
- 2009 –
obecnie** Adiunkt, Katedra Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.
- 2009 – 2012** Post-doctoral Research Fellow, Tissue Injury and Repair Group, Medical Research Centre for Regenerative Medicine, Division of Health Sciences, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.
- 2013 – 2018** Senior Research Fellow, Tissue Injury and Repair Group, Medical Research Centre for Regenerative Medicine, Division of Health Sciences, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.
- 2017 – 2018** Senior Research Fellow, Hepatology Laboratory, Division of Health Sciences, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.
- 2018 –
obecnie** Senior Research Fellow and Research Project Coordinator, Institute of Biomedical and Environmental Science (IBEHR), University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania.

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 219 ust. 1. pkt 2b Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 6 powiązanych tematycznie publikacji naukowych pod wspólnym tytułem:

„Mechanizmy molekularne zaniku mięśni w sarkopenii i kacheksji nowotworowej oraz potencjał aplikacyjny indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w badaniach przedklinicznych”.

4.2. Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

Listę publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgłoszonego we wniosku habilitacyjnym, wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi i opisem mojego wkładu w powstanie prac zamieszczono w Tabeli 1. Artykuły te mają charakter wieloautorski. Liczbę współautorów w publikacji warunkuje wielośrodkowy charakter prac klinicznych wymagających dostarczenia materiału biologicznego do badań, doboru kohort zgodnie ze standardami definicji badanych patofizjologii oraz opracowania danych klinicznych, a także ścisłego nadzoru medycznego nad procedurami klinicznymi.

Zgłoszony cykl publikacji jest wynikiem mojej pracy w międzynarodowych zespołach badawczych ze współautorami z uczelni z Wielkiej Brytanii, USA, Szwajcarii, Holandii, Korei Południowej, Chin i Niemiec oraz z koncernów farmaceutycznych: Novartis Institute for Biomedical Research (Szwajcaria/USA) i Boehringer Ingelheim Pharma GmbH (Niemcy).

Publikacje zaprezentowano tematycznie i oznaczono symbolami **H1-H6**. Kopie prac zawarto w Załączniku 4, a oświadczenia współautorów, określające ich wkład w każdym z artykułów w Załączniku 5. W czterech pracach (**H1-H4**) jestem pierwszym autorem, a w pracach (**H5 i H6**) drugim. W publikacjach **H3 i H4** jestem także autorem korespondencyjnym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* (JCR).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **34,236 (39,051 w roku 2020)**. Łączna liczba punktów MNiSW równa jest **750** (według ostatniego wykazu MNiSW z roku 2020¹), liczba cytowań wg. bazy *Web of Science* wynosi **96**, a wg. bazy *Scopus* równa jest **99** (stan na dzień 17.08.2021). Wartości te dotyczą danych z wyłączeniem autocytowań.

Tabela 1. Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zgłoszonego we wniosku habilitacyjnym wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi i opisem mojego udziału w ich powstanie. Dane dotyczące wskaźników IF pochodzą z *Journal Citation Reports* z bazy Clarivate (<https://jcr.clarivate.com/>).

H1	<p>Brzeszczyńska J, Johns N, Schilb A, Degen S, Degen M, Langen R, Schols A, Glass DJ, Roubenoff R, Greig CA, Jacobi C, Fearon KCh, Ross JA. (2016). Loss of oxidative defense and potential blockade of satellite cell maturation in the skeletal muscle of patients with cancer but not in the healthy elderly. <i>AGING (Albany NY)</i>. 8 (8):1690-1702.</p> <p>IF₍₂₀₁₆₎ = 4,867, IF₍₂₀₂₀₎ = 5,682, MNiSW = 140 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 21 (<i>Web of Science</i>) i 21 (<i>Scopus</i>)</p> <p><i>Badania do publikacji H1 przeprowadziłam w ramach projektu, którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą (Rozdział 5.5.). Mój wkład w powstanie pracy polegał na: (i) opracowaniu koncepcji badań oraz ich międzyzespołowej koordynacji, (ii) wykonaniu największej części doświadczalnej w tym: izolacji oraz ilościowej analizie białka metodą Smitha, izolacji RNA oraz jego ocenie za pomocą mikrospektrofluorymetru NanoDrop, ocenie integralności wyizolowanego RNA</i></p>
-----------	--

¹ Wykaz czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów stanowiący załącznik do Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 18 grudnia 2019 r. ogłoszonego na podstawie art. 267 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1668, z późn. zm.).

	<p>techniką czipową (Bioanalyzer 2100), ilościowej analizie ekspresji genów (qRT-PCR), identyfikacji i walidacji genów referencyjnych metodą geNorm, kompleksowej optymalizacji warunków reakcji qRT-PCR w biopsjach mięśni szkieletowych badanych kohortów zgodnie z wytycznymi MIQE, (iii) opracowaniu danych (obliczenia i analiza, wykonanie tabel i rycin oraz ocena merytoryczna wyników), (iv) przeglądzie literatury i napisaniu manuskryptu. Jako pierwszy autor pracy współuczestniczyłam również w prowadzeniu korespondencji z redaktorem oraz w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 65%.</p>
H2	<p>Brzeszczyńska J, Meyer A, McGregor R, Schilb A, Degen S, Tadini V, Johns N, Langen R, Schols A, Glass DJ, Roubenoff R, Ross JA, Fearon KCH, Greig CA, Jacobi C. (2018). Alterations in the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> regulation of muscle regeneration in healthy ageing and the influence of sarcopenia. <i>Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle</i>. 9 (1):93-105.</p> <p>IF₍₂₀₁₈₎ = 10,754, IF₍₂₀₂₀₎ = 12,910, MNiSW = 200 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 26 (Web of Science) i 26 (Scopus)</p> <p><i>Badania do publikacji H2 wykonałam w ramach projektu, którego byłam kierownikiem i głównym wykonawcą (Rozdział 5.5.). Mój wkład w powstanie pracy polegał na: (i) opracowaniu koncepcji badań i ich międzypolowej koordynacji, (ii) wykonaniu największej części doświadczalnej pracy w tym: izolacji białka oraz jego ilościowej ocenie metodą Smitha, izolacji RNA oraz jego jakościowej i ilościowej ocenie za pomocą mikrospektrofluorymetru NanoDrop, ocenie integralności wyizolowanego RNA techniką czipową (Bioanalyzer 2100), kompleksowej optymalizacji warunków reakcji qRT-PCR w biopsjach mięśni szkieletowych badanych kohortów zgodnie z wytycznymi MIQE, ilościowej analizie ekspresji genów (qRT-PCR), identyfikacji i walidacji genów referencyjnych metodą geNorm, ilościowej ocenie wydzielanych cytokin zgodnie z protokołem RayBio® Human Cytokine Array G4000; (iii) opracowaniu wyników (obliczenia, przygotowanie tabel i rycin), (iv) przeglądzie literatury oraz napisaniu manuskryptu. Jako pierwszy autor publikacji współuczestniczyłam również w prowadzeniu korespondencji z redaktorem czasopisma i w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na 65%.</i></p>
H3	<p>Brzeszczyńska J,[#] Brzeszczyński F, Samuel K, Morgan K, Morley SD, Plevris JN, Hayes PC. (2020). Validation of reference genes for gene expression studies by RT-qPCR in HepaRG cells during toxicity testing and disease modelling. <i>Cells</i>. 9 (3):770-790.</p> <p>IF₍₂₀₂₀₎ = 6,600, MNiSW = 140 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 2 (Web of Science) i 2 (Scopus)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy polegał na: (i) opracowaniu koncepcji badań i wykonaniu największej części doświadczalnej, w tym: współudziale w prowadzeniu hodowli komórek HepaRG i wykonaniu dominującej części eksperymentów na tej linii komórkowej – izolacji RNA oraz jego jakościowej i ilościowej ocenie metodą spektrofluorymetryczną (mikrospektrofluorymetr NanoDrop), ocenie integralności wyizolowanego RNA z wykorzystaniem techniki czipowej (Bioanalyzer 2100), ilościowej analizie ekspresji genów (qRT-PC), identyfikacji i walidacji genów referencyjnych metodą geNorm; kompleksowej optymalizacji warunków reakcji qRT-PCR w komórkach HepaRG zgodnie z wytycznymi MIQE, (ii) opracowaniu danych (analiza statystyczna, interpretacja), (iii) ocenie merytorycznej wyników, przygotowaniu tabel i rycin, (iv) przeglądzie literatury i napisaniu manuskryptu. Jako pierwszy autor publikacji i autor korespondencyjny byłam również odpowiedzialna za przygotowanie odpowiedzi na recenzję oraz korektę pracy po recenzjach. Mój udział procentowy szacuję na 70%.</i></p>
H4	<p>Brzeszczyńska J,^{#,2} Brzeszczyński F, Hamilton DF, McGregor RA, Simpson HRW. (2020). Role of microRNA in muscle regeneration and diseases related to muscle dysfunction in atrophy, cachexia, osteoporosis & osteoarthritis. <i>Bone & Joint Research</i>. 9 (11):798-807.</p>

² Wyróżnienie autorskie (Author Feature) dla Joanny Brzeszczyńskiej w czasopiśmie Bone & Joint Research (Vol. 9, No. 11): <https://online.boneandjoint.org.uk/bjr/author-feature#:~:text=Author%20Feature%20-%20Bone%20and%20Joint%20Research.%20Dr,November%202020%20issue%20of%20Bone%20%26%20Joint%20Research%3A>

	<p>IF₍₂₀₂₀₎ = 5,853, MNiSW = 100 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 3 (<i>Web of Science</i>) i 4 (<i>Scopus</i>)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy polegał na: (i) opracowaniu koncepcji artykułu i wyborze metodyki analizy danych literaturowych, (ii) dominującej roli w przeglądzie literatury oraz napisaniu manuskryptu. Jako pierwszy autor publikacji i autor korespondencyjny byłam również odpowiedzialna za przygotowanie odpowiedzi na recenzję oraz korektę pracy po recenzjach. Mój udział procentowy szacuję na 75%.</i></p>
H5	<p>Liu J, Brzeszczyńska J, Samuel K, Black J, Palakkan A, Anderson RA, Gallagher R, Ross JA. (2015). Efficient episomal reprogramming of blood mononuclear cells and differentiation to hepatocytes with functional drug metabolism. <i>Experimental Cell Research</i>. 338 (2):203-13.</p> <p>IF₍₂₀₁₅₎ = 3,378, IF₍₂₀₂₀₎ = 3,905, MNiSW = 100 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 23 (<i>Web of Science</i>) i 23 (<i>Scopus</i>)</p> <p><i>Mój wkład polegał na: (i) przygotowaniu planu badań i wykonaniu części eksperymentów, w tym: hodowli komórek iPSCs oraz ich różnicowaniu do endodermy i hepatocytów, reprogramowaniu ludzkich fibroblastów i komórek krwi do komórek iPSCs z zastosowaniem episomalnych wektorów, wyizolowaniu RNA i jego ocenie za pomocą mikrospektrofluorymetru NanoDrop oraz techniki czipowej (Bioanalyzer 2100), ilościowej analizie ekspresji genów (qRT-PCR) w badanych próbach, identyfikacji i walidacji genów referencyjnych metodą geNorm, kompleksowej optymalizacji warunków reakcji qRT-PCR w badanych komórkach zgodnie z wytycznymi MIQE, (ii) współudziale w interpretacji wyników, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzjach. Mój udział procentowy szacuję na: 40%.</i></p>
H6	<p>Meier F,[†] Freyer N,[†] Brzeszczyńska J, Knöspel F, Armstrong L, Lako M, Greuel S, Damm G, Ludwig-Schwellinger E, Deschl U, Ross JA, Beilmann M, Zeilinger K. (2017). Hepatic differentiation of human iPSCs in different 3D models: A comparative study. <i>International Journal of Molecular Medicine</i>. (40):1759-1771.</p> <p>IF₍₂₀₁₇₎ = 2,784, IF₍₂₀₂₀₎ = 4,101, MNiSW = 70 pkt Liczba cytowań (bez autocytowań) = 21 (<i>Web of Science</i>) i 23 (<i>Scopus</i>)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy i wykonaniu części eksperymentów, w tym: hodowli i wyselekcjonowaniu linii komórek iPSCs do ich różnicowania w systemach 3D, różnicowaniu iPSCs w hodowlach 2D, wyizolowaniu i ocenie RNA za pomocą mikrospektrofluorymetru NanoDrop oraz techniki czipowej (Bioanalyzer 2100), ilościowej analizie ekspresji genów (qRT-PCR) we wszystkich badanych próbach, identyfikacji i walidacji genów referencyjnych metodą geNorm, kompleksowej optymalizacji warunków reakcji qRT-PCR zgodnie z wytycznymi MIQE, analizie sekrecji mocznika oraz białek za pomocą testu ELISA we wszystkich badanych próbkach. Wraz z pierwszymi autorami współuczestniczyłam w analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na: 35%.</i></p>

[#] Autor korespondencyjny.

[†] W publikacji H6 dwóch autorów (Meier F oraz Freyer N) wspólnie pełnią rolę pierwszego autora.

4.3. Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład cyklu publikacji jednotematycznych oraz uzyskanych wyników wraz ze wskazaniem potencjału ich wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

Przeprowadzone przeze mnie badania dotyczyły analizy mechanizmów molekularnych uczestniczących w rozwoju atrofii mięśniowej, wywołanej sarkopenią i kacheksją nowotworową (H1-H2). Są to znacząco różne stany patofizjologiczne o odrębnej etiopatogenezie.

Sarkopenię definiuje się jako związany z wiekiem zespół charakteryzujący się spadkiem masy i funkcji mięśniowej (siły mięśniowej i sprawności fizycznej) (1,2). Rozróżnia się dwie postaci sarkopenii – pierwotną i wtórną. Sarkopenia pierwotna rozwija się samoistnie bez wpływu współistniejących stanów chorobowych (3,4), podczas gdy do rozwoju sarkopenii wtórnej przyczynia się brak aktywności ruchowej, nieprawidłowe odżywianie oraz inne przewlekłe stany chorobowe, m.in. niewydolność nerek lub serca, cukrzyca czy choroby układu kostnego (1,2). Obecnie podstawowe kryterium diagnozy stanowi niska siła mięśniowa oraz zmniejszona ilość lub/i jakość mięśni. Dodatkowym parametrem jest utrata sprawności fizycznej, która określa stopień nasilenia choroby (1).

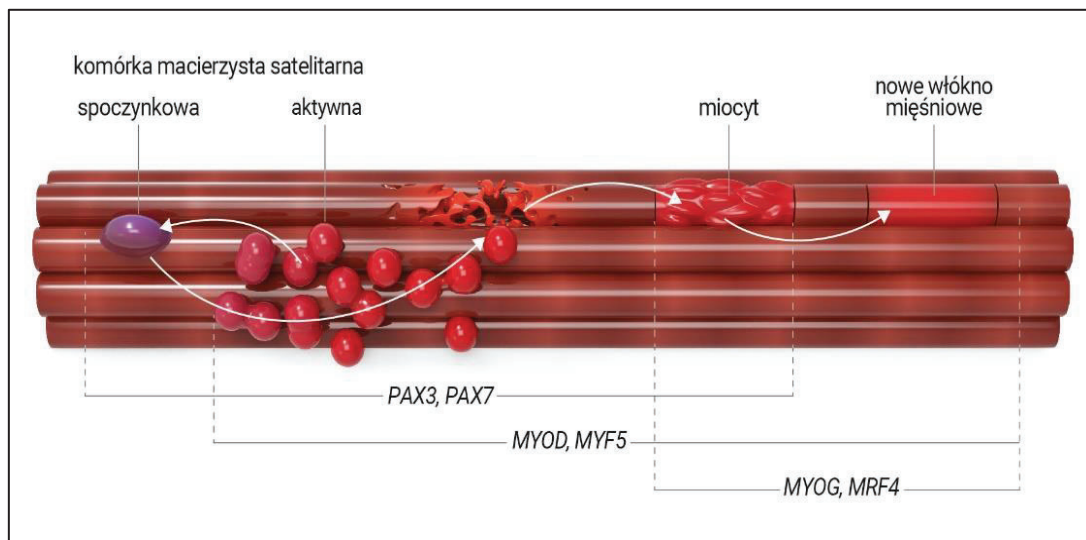
Kacheksja (wyniszczenie) natomiast definiowana jest jako nieodwracalny proces utraty masy mięśniowej z towarzyszącą utratą tkanki tłuszczowej lub bez niej (5). Ten wieloczynnikowy zespół zaburzeń metabolicznych związany jest głównie z rozwojem choroby nowotworowej (6). Należy jednakże podkreślić, iż pacjenci z chorobą nowotworową to pacjenci często powyżej 70 roku życia, u których spadek masy mięśniowej może być wywołany już wcześniej na skutek rozwoju sarkopenii pierwotnej lub wtórnej. Ponadto, różne formy terapii przeciwnowotworowej (chemioterapia, radioterapia, chirurgia, terapia celowana) również mają istotny wpływ na rozwój atrofii mięśniowej (7). Czynniki te mogą powodować odmienny przebieg procesu zaniku mięśni u indywidualnego pacjenta z chorobą nowotworową i sarkopenię w takich przypadkach uznaje się za najważniejszą cechę fenotypową procesu wyniszczenia (8).

W ostatnich latach nastąpił istotny postęp w zrozumieniu molekularnych mechanizmów prowadzących do utraty masy mięśni szkieletowych. Tym niemniej różnice pomiędzy złożonymi mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw redukcji masy mięśniowej osób z kacheksją lub sarkopenią wciąż nie są w pełni poznane. Dotychczasowe badania również nie przyniosły jednoznacznych wyników, wskazujących na różnice w funkcjonowaniu mechanizmów kontrolujących procesy zdrowego starzenia i sarkopenii. Wynika to zarówno z ogromnej złożoności tych mechanizmów, jak również z braku standaryzacji modeli doświadczalnych (8) (H4) oraz ich systematycznej analizy *in vivo* w mięśniach szkieletowych osób z wyniszczeniem i/lub sarkopenią (9). Znacząca większość opublikowanych prac w tej dziedzinie została wykonana na modelach komórkowych *in vitro* lub na modelach zwierzęcych, a wyniki tych eksperymentów nie zawsze znajdują potwierdzenie w badaniach klinicznych na biopsjach mięśni człowieka, chociażby ze względu na niewielką liczbę istniejących badań oceniających te same geny u zwierząt i ludzi. Dlatego intensyfikacja badań, uwzględniających analizy wielu genów/białek, odgrywających centralną rolę w procesach molekularnych związanych ze specyficzną patofizjologią atrofii określonego typu mięśnia szkieletowego może dostarczyć wielu nowych informacji w tym zakresie oraz przynieść oczekiwane rozwiązania terapeutyczne (8) (H1-H2).

Dotychczasowe wyniki wskazują, że w patogenezie sarkopenii i kacheksji uczestniczą analogiczne mechanizmy, a ich aktywacja w obrębie mięśni szkieletowych (np. stan zapalny, apoptoza, autofagia), jak i w środowisku ogólnoustrojowym (np. niedobór składników odżywczych, bezruch), może być bezpośrednią przyczyną osłabienia i zaniku tkanki mięśniowej (10).

Jedną z podstawowych cech mięśni szkieletowych jest ich zdolność do regeneracji w odpowiedzi na uszkodzenie mechaniczne (np. uraz) lub procesy chorobowe. Kluczową rolę w procesie miogenicznej regeneracji odgrywają komórki satelitarne (ang. *muscle satellite cells*, *mSCs*), których aktywność jest niezbędnym czynnikiem kształtującym i utrzymującym prawidłową homeostazę tkanki mięśniowej (11). W pierwszym etapie regeneracji, uszkodzony mięsień zaczyna wydzielać cytokiny i czynniki wzrostu. Dochodzi również do akumulacji komórek stanu zapalnego, m.in makrofagów

wydzielających czynnik $TNF\alpha$ (ang. *Tumor Necrosis Factor*), który stymuluje regenerację uszkodzonych włókien mięśniowych. Następstwem tych procesów jest etap aktywacji i proliferacji *mSCs*, regulowany przez sekwencyjną ekspresję miogenicznych czynników regulatorowych (ang. *myogenic regulatory factors, MRF*) (**Rycina 1**) oraz grupę mięśniowo-specyficznych cząsteczek microRNA, np. miR-1, miR-206, miR-133a i miR-486 (**H4**). Różnice w synchronizacji złożonych procesów wymagających zaangażowania nie tylko *mSCs* i mioblastów, ale także i komórek zapalnych, mogą mieć odmienny wpływ na przebieg miogenezy w sarkopenii i kacheksji.



Rycina 1. Schemat miogenezy z wyróżnieniem markerów molekularnych typowych dla każdego etapu procesu różnicowania. W odpowiedzi na uszkodzenie mięśni, nieaktywne (spoczynkowe) komórki satelitarne ekspresyjnie *PAX7* i *PAX3* ulegają aktywacji i wchodzi w cykl komórkowy. Miogeniczne czynniki regulacyjne (MRF): (a) pierwotne czynniki regulacyjne *MYOD* i *MYF5* charakteryzują wczesny etap miogenezy oraz profil proliferujących (aktywnych) komórek progenitorowych, tzw. prekursorów miogenicznych – mioblastów; (b) wtórne czynniki regulacyjne *MYOG* i *MRF4* charakteryzują późny etap miogenezy i całkowicie zróżnicowany miocyt. W kolejnym etapie miocyty łączą się z istniejącymi uszkodzonymi włóknami mięśniowymi lub łączą się razem tworząc nowe włókna mięśniowe (**H4**). Źródło: opracowanie własne (adaptacja z pracy **H4**).

Nadmierna produkcja $TNF\alpha$ oraz aktywacja szlaku $NF-\kappa B$ (ang. *Nuclear Factor Kappa B*), uważane są za czynniki patologiczne, prowadzące do zaniku mięśni (12). Wcześniejsze badania Guttridge i in. (2000) (13) przeprowadzone na modelu mysich komórek mięśniowych C2C12 dowiodły, że $TNF\alpha$ w wyniku aktywacji szlaku $NF-\kappa B$ hamuje proces różnicowania mioblastów poprzez dezaktywację czynnika regulacyjnego *MyoD*. Badania i ich meta-analizy wykazały, że rozwój stanów zapalnych w obrębie mięśnia hamuje bezpośrednio tworzenie nowych włókien mięśniowych oraz ich odbudowę poprzez negatywną regulację ekspresji genu *MEF2C* (ang. *Myocyte Enhancer Factor 2C*), wspomagającego miogeniczne czynniki regulacyjne MRF (13–15). Ścieżka *MEF2C* posiada ponadto kluczowe znaczenie dla prawidłowej homeostazy metabolicznej i kontroli całkowitej masy ciała (16).

Ważnymi czynnikami wywołującymi atrofię mięśniową są cytokiny $TNF\alpha$, IL-6, IL-8 i IL-1, uznane za czynniki proteolityczne, bezpośrednio odpowiedzialne za katabolizm mięśni w kacheksji (17) i procesie starzenia (18,19). Nadmierna ich produkcja związana jest również z aktywacją stresu oksydacyjnego (ang. *oxidative stress, OS*) i generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach mięśniowych oraz w ich mikrośrodowisku. Następstwem wysokiej aktywności RFT są oksydacyjne uszkodzenia składników komórkowych, wzrost wewnątrzkomórkowego $[Ca^{2+}]$ oraz aktywacja kaskad sygnalizacyjnych apoptozy, autofagii i procesów starzenia. Z tych powodów wysoki poziom RFT można za czynnik etiologiczny lub wzmagający zanik mięśni w procesie fizjologicznego starzenia,

sarkopenii oraz kacheksji. Ponadto, generowane na drodze procesów zapalnych RFT poprzez mechanizmy sygnalizacyjne typu redoks mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów miogenicznych (20) oraz w potranslacyjnych mechanizmach modulacji ekspresji białek przyczyniając się do dysfunkcji mięśni (21). Należy jednak uwzględnić, iż zarówno prozapalne szlaki molekularne jak i szlaki związane z produkcją RFT w mikrośrodowisku mięśni mogą być regulowane niezależnie i mogą mieć oddzielny lub synergiczny wpływ na funkcje oraz potencjał regeneracyjny mięśni.

Czynnikami sygnalizującymi akumulację wewnątrzkomórkowych RFT są m.in. *SOD2* (ang. *Superoxide Dismutase*), *NRF2* (ang. *Nuclear Erythroid-2-p45-Related Factor-2*) oraz *HSPA1A* (ang. *Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A*), które regulują homeostatyczne procesy w mięśniach i uruchamiają zwiększoną ekspresję enzymów antyoksydacyjnych. *SOD2* jest kluczowym genem chroniącym komórki przed RFT. Wzrost ekspresji *SOD2* wywoływany jest wieloma stresogennymi czynnikami, m.in. cytokiną TNF α . Szlak sygnałowy *NRF2*, odpowiada natomiast za regulację ekspresji wielu genów o działaniu cytoprotekcyjnym, np. *GCLM* (ang. *Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit*) oraz *GCLC* (ang. *Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit*) (22). Modulacja sygnalizacji genu *NRF2* odgrywa istotną rolę w ochronie komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi poprzez rozkład RFT oraz stabilizację potencjału oksydoredukcyjnego tkanki. Ponadto *NRF2* posiada funkcje przeciwdziałania cytokinom i mediatorom zapalnym: COX-2 (ang. *cyclooxygenase-2*) oraz iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*), bezpośrednio lub pośrednio oddziaływującym ze szlakami NF- κ B i MAPK (23). *HSPA1A* jest natomiast genem kodującym jedno z pięciu białek opiekuńczych z rodziny Hsp70, chroniących komórki przed utratą ich funkcji i śmiercią. Wzrost ekspresji *HSPA1A*, wywołany akumulacją nieprawidłowych białek oraz OS, wiąże się z działaniem antyapoptycznym oraz przeciwzapalnym i prowadzi do zmniejszenia ilości cytokin IL-6 i IL-8 (24). Można więc uznać, że zachwianie homeostatycznych procesów w tkance mięśniowej uruchamia kaskadę patologicznych zmian prowadzących do rozwoju atrofii.

Istotną rolę w atrofii mięśniowej odgrywają procesy degradacji białek mięśni szkieletowych poprzez system lizosomalny (szlak autofagii) lub proteosomalny (szlak ubikwityna-proteasom, UPP). Aktywacja UPP poprzez kierowaną TNF α aktywację szlaku NF- κ B, prowadzi do degradacji białek wewnątrzkomórkowych. Badania modelu kacheksji u myszy szczepu Apc^{Min/+} (model raka jelita grubego) wykazały ponadto zależną od IL-6 utratę masy mięśniowej, skorelowaną z podwyższonym poziomem sygnalizacji STAT-3 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) oraz szlaku NF- κ B, co również pozostaje w związku z proteosomalną degradacją białek zależną od UPP (25). Autofagia natomiast jest jednym z mechanizmów adaptacyjnych, który zapewnia podaż energii i składników budulcowych w komórce. Jak dowiedziono, autofagia jest procesem ściśle skoordynowanym z rozwojem stresu oksydacyjnego, a jego inicjacja aktywuje przeciwutleniający czynnik transkrypcyjny *NRF2* (23). Z tej perspektywy synergię działania RFT, jako tzw. „cząsteczek alarmujących” wewnątrz komórki, z aktywacją procesu autofagii rozważyć należy jako „mechanizm ratunkowy” komórek, umożliwiający im jednoczesne przezwyciężenie stresu oksydacyjnego (usunięcie uszkodzeń oksydacyjnych) oraz niedoboru energii i elementów budulcowych w celu utrzymania prawidłowej homeostazy. Z drugiej strony, proces autofagii może być również odpowiedzialny za śmierć komórki, gdyż jego dysfunkcja prowadzi do zmian w „przełączeniu” odpowiedzi komórkowej z adaptacji na stres i przeżycie (autofagia) na destrukcję i zniszczenie (apoptoza) (H1-H2). Stąd też intensywność procesu autofagii może zadecydować o jego życiodajnym lub śmiertelnym charakterze w procesie degeneracji mięśni. Sugeruje się, że niepożądanym efektem oksydacyjnych mechanizmów zaangażowanych w procesy degeneracji mięśni jest dysfunkcja autofagii, świadcząca o nadmiernej indukcji procesów

związanych z generowaniem RFT (23,26,27). Jednakże liczba badań *in vivo* na biopsjach mięśni szkieletowych człowieka, bezpośrednio wskazujących na korzystny lub szkodliwy wpływ autofagicznej degradacji białek, jest ograniczona.

Na podstawie wyników dotychczasowych badań można wnioskować, że zespół synergistycznie działających mechanizmów molekularnych odgrywa decydującą rolę w indukcji, przebiegu i nasileniu procesu atrofii mięśniowej. Wskazuje to na potrzebę prowadzenia badań i pogłębionych analiz działania wielu genów uczestniczących w różnych szlakach molekularnych w jednym typie mięśnia szkieletowego u ludzi (**H1-H2**). Badania tego typu, mające na celu wykazanie różnic w mechanizmach atrofii mięśniowej w różnych stanach patofizjologicznych, są bardzo rzadkie i niezwykle trudne do przeprowadzenia ze względu na duże trudności w uzyskaniu materiału do badań z jednorodnych grup pacjentów. Wymagają one: (i) spójności w wyborze grup kontrolnych, (ii) stosowania się do standaryzowanych definicji wyniszczenia i/lub sarkopenii (**H1-H2**) oraz (iii) stosowania wysokich standardów w analizach ekspresji genów zgodnie z wytycznymi MIQE (ang. *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), zapewniającymi wiarygodną interpretację wyników badań oraz ich powtarzalność (9,28) (**H3**). Wytyczne MIQE zawierają minimalne wymagania stanowiące podstawę do standaryzacji eksperymentów RT-qPCR (ang. *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*) oraz opisują kryteria gwarantujące właściwą krytyczną ocenę ich wyników, na podstawie których badacze mogą sprawdzić, czy analiza genów, począwszy od zaprojektowania badania do analizy danych i interpretacji wyników, została przeprowadzona prawidłowo oraz czy spełnia ona standardy zapewniające powtarzalność wyników (28).

Intensywność prac nad molekularnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za zachwianie homeostazy tkankowej mięśni przyczyniła się w ostatnich latach do rozwoju badań klinicznych koncentrujących się na opracowaniu strategii farmakologicznych w leczeniu atrofii. Dotychczasowe doniesienia podkreślają jednak brak potwierdzonej skuteczności i bezpieczeństwa działania testowanych związków farmakologicznych w II i III fazie badań klinicznych (29). Przykładem jest, testowany w dwóch różnych modelach eksperymentalnych, związek farmakologiczny bortezomib, będący wybiórczym inhibitorem szlaku UPS, który nie przyniósł oczekiwanych efektów zapobiegania rozwojowi kacheksji (30). Podobnie niskocząsteczkowy związek greliny (anamorelin), zmniejszający produkcję cytokin TNF α i IL-6, testowany u osób z kacheksją wykazał się marginalnym efektem działania oraz wysoką cytotoksycznością podczas długotrwałego stosowania. W konsekwencji lek ten został wycofany przez Europejską Agencję Leków (EMA) (31). Badany w ostatnich latach u chorych z kacheksją związek anaboliczny SARMs, który jest selektywnym modulatorem receptora androgenowego (ang. *selective androgen receptor modulators, SARMs*) oraz stymuluje wzrost i poprawia strukturę i funkcję mięśni (32–34), wykazywał jednocześnie znaczną hepatotoksyczność i kardiotoxycyzność (35). Należy podkreślić, że testowanie leków (szczególnie tych o działaniu cytotoksycznym) z udziałem starszych pacjentów onkologicznych skutkuje poważnymi efektami ubocznymi związanymi z upośledzeniem funkcji wielu organów, co w konsekwencji ma także negatywny wpływ na zdolności regeneracyjne mięśni szkieletowych.

Uwzględniając problemy wynikające z testowania wymienionych wyżej związków w badaniach przedklinicznych na modelach zwierzęcych (29), jak również trudności wynikające z ograniczonych możliwości prowadzenia badań z udziałem chorych z kacheksją lub sarkopenią, rozwiązaniem może być wdrożenie technologii komórek iPSCs (ang. *induced pluripotent stem cells*) (praca **H5** i **H6**).

iPSCs należą do grupy komórek pluripotencjalnych, które można otrzymywać z wyspecjalizowanych komórek somatycznych w wyniku procesu reprogramowania. Odkrycie

mechanizmu reprogramowania, za które w roku 2012 Shinya Yamanaka otrzymał Nagrodę Nobla, stanowi przełom w pozyskiwaniu pluripotencjalnych komórek macierzystych człowieka (36). Proces ten polega na cofnięciu w rozwoju dojrzałych komórek organizmu, np. komórek krwi lub fibroblastów, do etapu pluripotencjalnych komórek macierzystych poprzez wprowadzenie czterech genów. Są to geny regnulujące utrzymanie stanu pluripotencji komórkowej, *OCT3/4* (ang. *Octamer-binding Transcription Factor 4*), *SOX2* (ang. *RY-Box Transcription Factor 2*), *KLF4* (ang. *Kruppel like factor 4*) oraz gen promujący podziały komórkowe *c-MYC* (ang. *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*). Pozyskane w ten sposób komórki iPSCs posiadają właściwości embrionalnych komórek macierzystych zarówno pod względem profilu ekspresji genów jak i morfologii tworzących się kolonii oraz mogą być zróżnicowane w dowolne komórki organizmu (praca **H5**).

Technologia iPSCs przyczynia się do ogromnego postępu w medycynie. Umożliwia ona bowiem doskonalenie badań nad skutecznością i bezpieczeństwem nowych środków farmakologicznych potrzebnych dla efektywnej terapii np. zaniku mięśni. Komórki iPSCs są narzędziem, które może zrewolucjonizować obecne podejście do projektowania, syntezy i testowania nowych związków farmakologicznych w przedklinicznych modelach *in vitro* (37) (praca **H5** i **H6**). Technologia iPSCs uwzględnia bowiem specyficzny profil genetyczny indywidualnego pacjenta, który może mieć wpływ na zmiany farmakokinetyczne i farmakodynamiczne testowanych leków. Aspekt ten jest szczególnie istotny w przypadku opracowywania terapii dla pacjentów onkologicznych i starszych osób, narażonych na zdarzenia niepożądane, gdyż niesie ze sobą obiecujące perspektywy rozwoju terapii spersonalizowanych. Co więcej, iPSCs eliminują problemy natury etycznej, związane z prowadzeniem badań toksykologicznych na modelach zwierzęcych. Umożliwiają one także pozyskiwanie miogennych komórek progenitorowych, co niewątpliwie otwiera nowe możliwości leczenia stanów patofizjologicznych mięśni szkieletowych (38).

Pomimo ogromnego postępu w tej dziedzinie, strategię przeszczepu komórek miogennych pochodzących z iPSCs wydają się wciąż być odległą przyszłością. Spowodowane to jest brakiem: (i) protokołów pozyskiwania komórek iPSCs warunkujących bezpieczeństwo ich klinicznego stosowania oraz (ii) protokołów różnicujących, które mogą zapewnić potencjał samoodnowy miogennych komórek progenitorowych generowanych *in vitro* (39). Czynniki ograniczającymi opracowanie tzw. produktu zaawansowanej terapii medycznej (ang. *Advanced Therapy Medicinal Product, ATMP*) z ludzkich komórek iPSCs są liczne wymagania związane z bezpieczeństwem zastosowania tej technologii (praca **H5**). Wymogi te dotyczą m.in.: (i) wyeliminowania czynników odzwierzęcych w procesie otrzymywania i różnicowania komórek iPSCs, (ii) optymalizacji procesu reprogramowania poprzez zastąpienie metody wykorzystującej wirusy bezpiecznymi metodami nieintegracyjnymi, (iii) niskiej wydajności pozyskiwania komórek iPSCs (praca **H5**) oraz (iv) niskiej skuteczności procesów różnicowania (39–41).

W moich badaniach (eksperymentalne prace **H1**, **H2**, **H3**, **H5** i **H6**) zajęłam się powyższymi zagadnieniami i przeprowadziłam dwukierunkową analizę. Pierwszym kierunkiem moich badań było zidentyfikowanie czynników leżących u podstaw badanych patofizjologii mięśni szkieletowych (sarkopenii i kacheksji) oraz fizjologicznego procesu starzenia w celu ich potencjalnego wykorzystania do opracowania nowych interwencji terapeutycznych, skierowanych na zapobieganie i aktywne przeciwdziałanie atrofii mięśniowej. Drugim kierunkiem moich badań było opracowanie procedur pozyskiwania stabilnych linii iPSCs i ich różnicowania, na skalę umożliwiającą ich szerokie zastosowanie w badaniach nad stratyfikacją bezpieczeństwa leków, m.in. do efektywnej terapii zaniku mięśni.

4.3.2. Cel naukowy badań

Głównym celem naukowym moich badań było **określenie profilu molekularnego mięśni szkieletowych u pacjentów w zaawansowanym wieku z sarkopenią pierwotną i kacheksją nowotworową ze wskazaniem potencjału aplikacji indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w przedklinicznych badaniach leków.**

Realizacja tego celu wymagała przeprowadzenia następujących szczegółowych badań:

1. Zidentyfikowanie różnic w profilu molekularnym tkanki mięśniowej.
2. Określenie zmian w jej aktywności miogenicznej.
3. Zidentyfikowanie mechanizmów odpowiedzialnych za hamowanie procesów regeneracyjnych w badanych mięśniach szkieletowych.
4. Ocena zaburzeń homeostazy tkankowej pozwalającej określić jaki typ mechanizmów przeważa w mięśniach o określonej patofizjologii.
5. Zidentyfikowanie szlaków molekularnych, których zmiana aktywności umożliwiałaby określenie różnic w fenotypach mięśnia szkieletowego fizjologicznie starzejącego się organizmu i mięśnia szkieletowego w stanach patofizjologicznych.
6. Odtworzenie różnic pomiędzy populacją młodych i starzejących się komórek mięśni w badaniach *in vitro*, w tym w szczególności:
 - a. określenie zmian w fenotypie sekrecyjnym starzejących się komórek mięśniowych,
 - b. zbadanie wpływu mikrośrodowiska komórek mięśni na ich aktywność miogeniczną oraz procesy wskazujące na zachodzące w nich zmiany patologiczne.
7. Opracowanie uproszczonej i pozbawionej czynników ryzyka metody pozyskiwania ludzkich komórek iPSCs na skalę wystarczającą dla ich praktycznego zastosowania w badaniach nad stratyfikacją bezpieczeństwa leków, np. dla efektywnej terapii zaniku mięśni.
8. Opracowanie modelu metabolicznie funkcjonujących organoidów dla potrzeb badań farmakologicznych z zastosowaniem technik (3D) inżynierii tkankowej.
9. Równoległe przeprowadzenie krytycznej analizy i weryfikacji wszystkich etapów ilościowego oznaczenia poziomu ekspresji genów z pełnym zachowaniem wytycznych MIQE, gwarantujących utrzymanie wysokiej jakości prowadzonych badań.

4.3.3. Szczegółowe omówienie prac stanowiących osiągnięcie naukowe

Główną płaszczyznę rozważań w pracach **H1**, **H2** i **H4** stanowiły zagadnienia dotyczące molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój wybranych stanów patofizjologicznych mięśni szkieletowych człowieka: kacheksji nowotworowej i sarkopenii. Badania te zostały zainicjowane dzięki programowi naukowemu, w ramach którego otrzymałam stypendium naukowe przyznane mi w drodze konkursu przez The Daphne Jackson Trust oraz fundację The Leverhulme Trust (Wielka Brytania) (Rozdział 5.5.). Program, w którym pełniłam funkcję kierownika, umożliwił mi rozwinięcie badań biomedycznych we współpracy z międzynarodowym ekspertem w dziedzinie atrofii mięśniowej prof. Kennethem Fearonem. Projekt zrealizowałam w Tissue Injury and Repair Group, Centre for Regenerative Medicine, Division of Health Sciences na University of Edinburgh w Edynburgu, w Wielkiej Brytanii w zespole, którego kierownikiem był prof. James Ross.

W ramach tego projektu przeprowadziłam kompleksowe badania *in vivo* i *in vitro* złożonych interakcji pomiędzy różnymi szlakami molekularnymi aktywowanymi, w tym samym typie mięśnia szkieletowego człowieka, podczas fizjologicznego starzenia się organizmu (prace **H1** i **H2**) oraz w atrofiach mięśniowych o różnej etiologii: kacheksji nowotworowej (praca **H1**) i sarkopenii (praca

H2). Należy podkreślić, że badania tego typu z udziałem pacjentów z kacheksją i sarkopenią należą do rzadkości ze względu na trudności wynikające z doboru jednorodnych grup pacjentów.

Modele badawcze i grupy pacjentów

Materiałem badawczym we wszystkich analizach *in vivo* (prace **H1** i **H2**) były biopsje tkanki mięśniowej pobranej z mięśnia czworogłowego uda osób dorosłych zakwalifikowanych do 4 różnych grup eksperymentalnych na podstawie szczegółowych kryteriów klinicznych:

- (i) Pacjenci w wieku **63-82 lat** z nowotworem (stadium II-III) górnego odcinka przewodu pokarmowego oraz stwierdzoną kacheksją (praca **H1**). Kacheksję zdiagnozowano na podstawie 5% utraty masy ciała zgodnie z konsensusem opublikowanym przez Fearon i in. (2011) (5).
- (ii) Pacjenci w wieku **62-80 lat** z nowotworem (stadium II-III) górnego odcinka przewodu pokarmowego ze stałą masą mięśniową (praca **H1**).
- (iii) Zdrowi dawcy w podeszłym wieku **75-83 lat** zakwalifikowani do badania na podstawie kryteriów klinicznych opublikowanych przez Greig i in. (1994) (42) (prace **H1** i **H2**).
- (iv) Pacjenci w wieku **75-85 lat** ze stwierdzoną sarkopenią (praca **H2**). Sarkopenię pierwotną zdiagnozowano na podstawie analizy DEXA zgodnie z kryteriami ustalonymi przez Baumgartner i in. (1998) (4).
- (v) Grupę kontrolną stanowili zdrowi dawcy w średnim wieku **40-65 lat** (prace **H1** i **H2**).

Ponad połowa pacjentów z chorobą nowotworową była w wieku powyżej 70 roku życia. Utrata mięśni w tej grupie mogła więc być spowodowana także zaawansowanym procesem starzenia, co zostało uwzględnione przy interpretacji wyników.

W celu dokładnego oszacowania masy mięśniowej i wykluczenia sarkopenii u zdrowych dawców w podeszłym wieku, każdy starszy uczestnik badania został poddany analizie DEXA. Jej wykonanie było niezbędną procedurą, gdyż zmiany fizjologiczne mięśni wiążące się z procesem starzenia rozpoczynają się po 40 roku życia i nasilają po 65 roku, kiedy to definiuje się starość fizjologiczną. Manifestuje się ona m.in. osłabieniem aktywności ruchowej oraz redukcją masy mięśni, w wyniku chronicznego uszkodzenia włókien mięśniowych.

Materiałem badawczym w analizach *in vitro* były hodowle ludzkich mioblastów linii hsKMC, *Cook Myosite*, pochodzących z mięśni szkieletowych dawców w szerokim przedziale wiekowym (**17-83 lat**) (praca **H2**).

Wprowadzenie do badań modelu komórkowego *in vitro* wymagało zachowania dużej ostrożności, szczególnie w kontekście bezpośredniego porównywania wyników z modelem *in vivo*. Niemniej jednak model *in vitro* dzięki jednolitej populacji komórkowej stanowił ważny aspekt badawczy, pozwalający na odtworzenie niektórych różnic pomiędzy młodymi a starzejącymi się mięśniami, a co za tym idzie na szersze zrozumienie mechanizmów molekularnych procesu regeneracji mięśni podczas ich starzenia się. Analiza wyników uzyskanych *in vitro* (praca **H2**) została zaprezentowana dla dwóch grup wiekowych dawców komórek mięśniowych:

- (i) młodszych w wieku **17-51 lat** oraz
- (ii) starszych w wieku **69-83 lat**.

Dokonana kategoryzacja spełnia warunki umożliwiające stworzenie modelu komórkowego *in vitro* o cechach odzwierciedlających związaną z wiekiem utratę tkanki mięśniowej (43).

Wszystkie procedury badawcze zostały zatwierdzone przez komisje etyczne w NHS Lothian i Maastricht University Hospital oraz były zgodne ze standardami Deklaracji Helsińskiej.

Wyniki moich badań zaprezentowane w pracach **H1** i **H2** koncentrują się na analizie 23 markerów molekularnych (na poziomie transkryptu lub/i białka) i dotyczą złożonych interakcji mechanizmów molekularnych istotnych dla: (i) procesu zapalnego i stresu oksydacyjnego w mięśniu szkieletowym, (ii) aktywności miogenicznej komórek mięśniowych, (iii) ich zdolności do obrony antyoksydacyjnej oraz adaptacji do stresu komórkowego, jak również (iv) utrzymywania aktywnych procesów apoptozy i autofagii.

Badania ekspresji wielu genów różnych szlaków molekularnych i sygnalizacyjnych dostarczyły cennych danych, które analizowane zgodnie z wytycznymi MIQE (praca **H3**) dały obraz zmian w profilu molekularnym tkanki mięśniowej, zarówno w procesie jej fizjologicznego starzenia się, jak i w wybranych patofizjologiach atrofii mięśniowych.

Listę analizowanych markerów molekularnych na poziomie genów lub/i białka zamieszczono w Tabeli 2.

Tabela 2. Markery różnych szlaków molekularnych i ich funkcja. Opis funkcji przedstawiono na podstawie informacji z bazy danych ludzkiego genomu (GDB, <http://www.gdb.org>).

Gen lub białko	Pełna nazwa w j.ang.	Funkcja
<i>PAX3</i>	<i>Paired box trascription factor 3</i>	Proliferacja i różnicowanie mSC oraz miogeneza embrionalna
<i>PAX7</i>	<i>Paired box trascription factor 7</i>	Proliferacja i różnicowanie mSC
<i>MYOD</i>	<i>Myogenic determination factor 1</i>	Aktywacja i proliferacja mioblastów
<i>MYF5</i>	<i>Myogenic regulatory factor 5</i>	Aktywacja i proliferacja mioblastów
<i>MEF2C</i>	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>	Wspomaganie miogenezy/przebudowa włókien
<i>MYOG</i>	<i>Myogenin</i>	Różnicowanie końcowe komórek mięśniowych
<i>TNNT1</i>	<i>Troponin T1</i>	Regulacja skurczu mięśni
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>	Prozapalna
<i>TNFα</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	Prozapalna
<i>Il-1</i>	<i>Interleukin-1</i>	Prozapalna
<i>Il-6</i>	<i>Interleukin-6</i>	Prozapalna
<i>Il-8</i>	<i>Interleukin-8</i>	Prozapalna
<i>p38MAPK</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Produkcja cytokin/odpowiedź na stres komórkowy/apoptoza
<i>HSPA1</i>	<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A</i>	Antyapoptotyczna/aktywacja proteolizy nieprawidłowo złożonych białek/hamowanie powstawania agregatów białek
4-HNE	4-hydroxynonenal	Stres oksydacyjny
<i>p16^{ink4a}</i>	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>	Starzenie komórkowe
<i>BAX</i>	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>	Apoptoza
<i>BCL2</i>	<i>BCL2 Apoptosis Regulator</i>	Antyapoptotyczna
<i>NRF2</i>	<i>Nuclear erythroid-2-p45-Related Factor-2</i>	Przeciwutleniająca/ochronna
<i>SOD2</i>	<i>Superoxide Dismutase</i>	Przeciwutleniająca/ochronna
<i>GCLM</i>	<i>Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit</i>	Przeciwutleniająca/ochronna
<i>P62/SQSTM1</i>	<i>Sequestosome 1</i>	Autofagia
Beklin 1	<i>Coiled-Coil Myosin-Like BCL2-Interacting Protein</i>	Autofagia

Szczególnie istotnym kryterium uzyskania rzetelnych i powtarzalnych wyników w ilościowych analizach ekspresji genów we wszystkich moich pracach eksperymentalnych była właściwa standaryzacja procedury RT-qPCR oraz zweryfikowany dobór genów referencyjnych (ang. *Reference Genes, RGs*) zgodny z wytycznymi MIQE (28). Dlatego też równoległe z badaniami w pracach **H1**, **H2**, **H5** i **H6** dokonaliśmy krytycznej analizy wszystkich etapów ilościowego oznaczenia poziomu ekspresji genów metodą RT-qPCR, a publikacja **H3** stanowi ich ważne metodologiczne uzupełnienie.

Uzasadnieniem włączenia pracy **H3** jest zawarte w niej szczegółowe wyjaśnienie stosowanej przez nas procedury doboru genów referencyjnych oraz kryteriów gwarantujących wiarygodną interpretację wyników i wysoką jakość badań biomedycznych. W pracy tej dowiedliśmy, że „klasyczne” geny referencyjne, tzn. GAPDH (ang. *Glyceralde- hyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) oraz 18S (ang. *18S Ribosomal RNA Subunit*), powszechnie stosowane jako kontrole endogenne, nie spełniają warunków wymaganych do przeprowadzenia prawidłowej normalizacji danych otrzymanych metodą RT-qPCR w naszych eksperymentach. Znaczącym osiągnięciem pracy **H3** jest wykazanie po raz pierwszy wpływu hepatotoksyn (o różnym mechanizmie działania) na zmiany ekspresji RGs oraz udowodnienie, że nieprawidłowy dobór tych genów zmienia znacząco wyniki ekspresji markerów istotnych dla metabolizmu testowanych związków farmakologicznych (markery wątroby: ALB, HNF4A, CYP3A4, CYP1A2). Dzięki temu praca **H3** dostarcza ważnych informacji na temat standaryzacji badań niezbędnych do stratyfikacji bezpieczeństwa i skuteczności leków w modelowych badaniach *in vitro*.

Należy podkreślić, że w przypadku badań na dużą skalę, a w szczególności badań *in vivo* umożliwiających precyzyjną selekcję fenotypów pożądaných dla potrzeb badań klinicznych (prace **H1** i **H2**) lub badań *in vitro* skupiających się na stratyfikacji cytotoksyczności leków (praca **H3**), jako najlepszą strategię normalizacyjną zaleca się stosowanie średnich wartości ekspresji kilku stabilnych genów zidentyfikowanych za pomocą algorytmu geNorm (44). Zastosowanie tego algorytmu opisaliśmy szczegółowo w pracy **H3**, a procedurę tę zastosowaliśmy do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej danych uzyskanych z eksperymentów RT-qPCR w pracach **H1**, **H2**, **H3**, **H5** i **H6**.

W klinicznych badaniach *in vivo* (prace **H1** i **H2**) ranking testowanych RGs (za pomocą algorytmu geNorm) wykazał, że największą stabilność ekspresji w ludzkiej tkance mięśniowej wykazują dwa geny – *SDHA* (ang. *Succinate Dehydrogenase Complex, Subunit A*) oraz *CYCI* (ang. *Cyclin D1*). Dlatego też zostały one uznane za wystarczające dla prawidłowej normalizacji danych RT-qPCR w analizach porównawczych ekspresji genów w biopsjach mięśni zdrowych dawców w podeszłym wieku, pacjentów z chorobą nowotworową i grupą kontrolną osób w średnim wieku (praca **H1**). Natomiast do przeprowadzenia analiz porównawczych ekspresji genów w biopsjach mięśni zdrowych osób w podeszłym wieku, pacjentów z sarkopenią i osób z grupy kontrolnej w średnim wieku wyselekcjonowaliśmy zestaw 3 genów referencyjnych: *SDHA*, *CYCI* i *GAPDH*, które charakteryzowały się najwyższą stabilnością w rankingu testowanych RGs (praca **H2**). Wyniki w pracach **H1** i **H2** dowodzą, że *SDHA* i *CYCI* są najbardziej stabilnymi genami referencyjnymi w analizowanych grupach badanych pacjentów. Powszechnie stosowane geny referencyjne *HPRT* (ang. *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*), β -*Actin* (ang. *Beta-Actin*), *18S* i *GAPDH* natomiast, charakteryzowały się mniejszą stabilnością ekspresji w naszych badaniach i dlatego nie zostały przez nas wyselekcjonowane do przeprowadzenia prawidłowej normalizacji danych RT-qPCR. Warto jednak zaznaczyć, że aczkolwiek „klasyczny” gen referencyjny GAPDH został przez nas uwzględniony w zestawie genów referencyjnych wybranych do przeprowadzenia analiz porównawczych zarówno w biopsjach mięśni w badaniach *in vivo* (praca **H2**), jak i w modelowych badaniach *in vitro* (praca **H3**), nie spełniał on jednak warunków wymaganych przez MIQE do przeprowadzenia prawidłowej normalizacji danych RT-qPCR jako pojedyncza kontrola endogenna. Moje wyniki wskazują na duże znaczenie właściwego wyboru RGs do normalizacji danych i konieczność uwzględnienia zmienności w ich ekspresji, wywołanej warunkami eksperymentalnymi (np. wpływ czynników patofizjologicznych, fizjologicznego starzenia lub testowanych leków) we wszystkich badanych próbach wchodzących w skład eksperymentu, nawet jeśli eksperyment dotyczy tylko jednego typu badanej tkanki lub komórek. Przedstawione wyniki mogą też

mieć szczególne znaczenie dla przyszłych badań w kontekście standardów metodologicznych zgodnych z wytycznymi MIQE. Większość bowiem opublikowanych dotychczas danych RT-qPCR analizujących poziomy ekspresji genów w mięśniach szkieletowych normalizowano z wykorzystaniem pojedynczych kontroli endogennych, którymi najczęściej były β -Actin, HPRT, 18S czy GAPDH (45–47).

Celem badań zaprezentowanych w pracy **H1** było określenie molekularnych różnic w aktywności miogenicznej i zdolności regeneracyjnej mięśni szkieletowych w zaawansowanym procesie fizjologicznego starzenia się organizmu ludzkiego oraz w procesie nowotworowym z wyszczególnieniem stanu patofizjologicznego kacheksji nowotworowej. Szczególnie ważnym wynikiem badań było wykazanie, że upośledzenie wydolności kluczowych systemów przeciwutleniających w mięśniach szkieletowych jest czynnikiem predysponującym do hamowania procesu miogenezy i rozwoju atrofii mięśniowej (kacheksji) w chorobie nowotworowej. Zgodnie z naszą wiedzą, są to jedne z nielicznych badań *in vivo*, prezentujących zmiany w aktywności miogenicznej mięśni szkieletowych, wywołanej przez chorobę nowotworową - w tym kacheksję - oraz przez zaawansowany proces starzenia się mięśni.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że upośledzenie procesu regeneracji włókien mięśniowych jest ściśle związane ze stanem zapalnym. Zgodnie z naszymi oczekiwaniami, zarówno profil jak i poziom ekspresji genów kodujących prozapalne cytokiny TNF α i IL-6 różniły się w badanych grupach, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi (48,49). W mięśniach szkieletowych osób w podeszłym wieku (zarówno zdrowych jak i chorych na nowotwór górnego odcinka przewodu pokarmowego) gen TNF α wykazywał silną ekspresję, podczas gdy ekspresja genu IL-6 była istotnie podwyższona jedynie w mięśniach pacjentów onkologicznych. W tej grupie, zwiększonej ekspresji genów obu cytokin (TNF α i IL-6) towarzyszyła wzrostowa tendencja aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Podwyższony poziom C-reaktywnego białka CRP (ang. *C Reactive Protein*) w surowicy krwi stwierdziliśmy natomiast jedynie u ok. 30% pacjentów z chorobą nowotworową. Obserwacje te potwierdzają doniesienia innych autorów (50) i prowadzą do wniosku, że białko CRP nie jest miarodajnym markerem klinicznym kacheksji nowotworowej.

Zwiększona produkcja cytokin prozapalnych była czynnikiem pobudzającym aktywację mSCs zarówno w mięśniach zdrowych osób w podeszłym wieku jak i osób z chorobą nowotworową.

W mięśniach szkieletowych zdrowych osób w podeszłym wieku stwierdziliśmy aktywację spoczynkowych komórek mSCs ekspresyjną geny PAX3 i PAX7 oraz zachowaną zdolność miogeniczną na wszystkich etapach miogenezy wraz ze znaczącym wzrostem ekspresji genu TNF α (mediatora reakcji zapalnej). Zwiększona ekspresja TNF α była skorelowana z aktywnością miogeniczną i potencjałem regeneracyjnym komórek mięśniowych. Nie była jednak ona związana z aktywacją szlaku NF- κ B bezpośrednio zaangażowanego w hamowanie procesu miogenezy. Wyniki te sugerują, że podczas fizjologicznego starzenia się mięśni szkieletowych dzięki zachowanej właściwej równowadze pomiędzy populacją komórek zapalnych i miogennych oraz synchronizacji procesów zapalnych i naprawczych, proces pouszkodzeniowej regeneracji włókien mięśniowych zostaje utrzymany. Dlatego też w tym przypadku proces zapalny można uznać za mechanizm sprzyjający miogenezie, a TNF α za czynnik troficzny stymulujący proliferację komórek mSCs. Niemniej jednak, ekspozycja na utrzymujący się chroniczny stan zapalny może być także czynnikiem uruchamiającym mechanizmy odpowiedzialne za zakłócenie procesów proliferacji i różnicowania starzejących się mioblastów. Hipotezę tę poddaliśmy weryfikacji w pracy **H2**.

Zwiększoną ekspresję genów *PAX3* i *PAX7* stwierdziliśmy również w mięśniach szkieletowych pacjentów onkologicznych ze stałą masą ciała. Wykazaliśmy, że komórki satelitarne aktywowane w wyniku uszkodzenia mięśnia dzielą się i różnicują w mioblasty o fenotypie charakteryzującym się podwyższoną ekspresją genów *PAX7/MYF5/MYOD*. Supresja ekspresji markera *MYOG* oraz redukcja ekspresji genów *MYF5/MYOD* wykazała jednak destabilizację procesu regeneracji mięśni. Brak aktywności *MYOG* skutkuje bowiem zablokowaniem miogenezy oraz utratą zdolności odbudowania struktury mięśnia. Wynik ten sugeruje także supresję genów kodujących strukturalne białka mięśniowe (np. miozyny).

Nie zaobserwowaliśmy natomiast istotnego wzrostu ekspresji genu *PAX7* (czynnika transkrypcyjnego odgrywającego ważną rolę w utrzymaniu populacji komórek mSCs) w mięśniach szkieletowych pacjentów onkologicznych z kacheksją. Stwierdziliśmy ponadto supresję genów *MYOD* i *MYOG*. Wyniki te mogą wskazywać na niewystarczającą aktywację komórek mSCs lub nawet jej brak w uszkodzonych włóknach mięśniowych tych pacjentów i dowodzą, że występuje u nich poważne upośledzenie zdolności regeneracyjnych spowodowane m.in. wyczerpaniem funkcji miogenicznych.

Otrzymane wyniki pozwoliły na sformułowanie konkluzji, że wzrost poziomu ekspresji cytokin prozapalnych *IL-6* i *TNF α* w uszkodzonych mięśniach pacjentów z chorobą nowotworową jest kluczowym czynnikiem uczestniczącym w zaniku mięśni. Wykazaliśmy bowiem, że zmiany te powiązane ze wzrostową tendencją aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego *NF- κ B* mają istotny wpływ na zaburzenie procesu różnicowania mioblastów poprzez hamowanie aktywności transkrypcyjnej genu *MYOD*. Dlatego też, u pacjentów z chorobą nowotworową, upośledzenie aktywności miogenicznej na jej wczesnych etapach należy uznać za ważny wskaźnik zmian patologicznych, świadczących o zaburzeniach równowagi pomiędzy procesem zapalnym i procesem regeneracji tkanki mięśniowej. Biorąc pod uwagę, że aktywacja tego mechanizmu występuje przed zdiagnozowaniem klinicznego stanu wyniszczenia, można go więc również uznać za wskaźnik prognozujący rozwój kacheksji nowotworowej. Jak dotąd nie podjęto prób testowania związków farmakologicznych mających na celu przeciwdziałanie utracie aktywności miogenicznej mięśni szkieletowych u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową.

Zwiększona ekspresja cytokin prozapalnych *IL-6* i *TNF- α* jest także czynnikiem wzmagającym uwalnianie reaktywnych form tlenu (RFT), które po osiągnięciu cytotoksycznego poziomu mogą aktywować szlaki kataboliczne prowadzące do poważnej degeneracji mięśni. Bardzo istotnym aspektem naszych badań było więc określenie stanu równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej tkanki mięśniowej badanych kohort oraz różnic między nimi.

W dostępnej literaturze brak jest jednoznacznych doniesień na temat stanu obrony antyoksydacyjnej mięśni szkieletowych osób z chorobą nowotworową (50). Nie ma także rozstrzygających danych dotyczących zależności pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną, a typem czy stadium nowotworu (51,52). Z tego względu nasze badania, w których wykazaliśmy zahamowanie ekspresji genów *NRF2*, *SOD2*, *GCLM* i *HSPA1A* obrony komórkowej w mięśniach pacjentów z nowotworem górnego odcinka przewodu pokarmowego (stadium II-III), stanowią ważny wkład literaturowy w tej dziedzinie. Stwierdziliśmy między innymi, że średnio zaawansowany i zaawansowany proces nowotworowy ma istotny wpływ na indukcję patologicznych procesów degeneracyjnych w mięśniach szkieletowych, a supresja ww. genów występuje nie tylko u osób z kacheksją nowotworową, lecz również i u osób ze stałą masą ciała.

W odróżnieniu od pacjentów onkologicznych, w biopsjach mięśni zdrowych osób w porównywalnym wieku stwierdziliśmy wysoki poziom ekspresji mRNA dla tych samych genów obrony komórkowej oraz istotnie niższy poziom 4-hydroksynonenalu (4-HNE, ang. *4-hydroxynonenal*), który jest ważnym markerem stresu oksydacyjnego. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi badaniami (53) oraz dowodzą, że kompensacyjny wzrost aktywności przeciwutleniającej tkanki mięśniowej jest mechanizmem odpowiedzi adaptacyjnej na zwiększający się stres oksydacyjny podczas starzenia się organizmu. Świadczył o tym wzrost poziomu 4-HNE, który najwyraźniej skutkowało pobudzeniem ekspresji genów antyoksydacyjnych.

Wykazana przez nas supresja ekspresji genów obrony komórkowej w mięśniach pacjentów onkologicznych wskazuje na aktywację mechanizmów komórkowych bezpośrednio zaangażowanych w patofizjologię atrofii mięśniowej, co sugeruje nowe możliwości dla rozwoju odpowiednich terapii.

Nasze wyniki jednoznacznie wskazują, że w biopsjach mięśni pacjentów onkologicznych (zarówno tych z kachekcją nowotworową jak i ze stałą masą ciała) zostaje uruchomiona kaskada mechanizmów mających istotny wpływ na degenerację mięśni szkieletowych poprzez ich oksydacyjne uszkodzenia i destabilizację miogenezy. Warto podkreślić udział 4-HNE oraz RFT w dezaktywacji genów obrony komórkowej. Przy zbyt dużym stężeniu 4-HNE powstaje bowiem nadmierna ilość S-koniugatów z glutationem, które hamują ich ekspresję. Generowane RFT uczestniczą ponadto w dezaktywacji enzymów macierzy mitochondrialnej, m.in. SOD2. Przedstawiony w pracy **H1** związek pomiędzy supresją kluczowych genów obrony komórkowej i wzrostem poziomu 4-HNE wskazuje jednoznacznie, iż patogeneza choroby nowotworowej wiąże się z naruszeniem równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej i wzmożonym toksycznym działaniem RFT, które bezpośrednio mogą być odpowiedzialne za redukcję poziomu transkryptów mRNA dla genów *MYOD* i *MYF5* (54). Co istotne, akumulacja wysokich stężeń 4-HNE może wpływać regulacyjnie na tempo proliferacji komórek mięśniowych, a wysokie stężenia RFT na aktywację białka p38 kinazy MAPK, która posiada właściwości hamowania procesu proliferacji i różnicowania mioblastów (**H2**). Supresja genów *NRF2* i *HSPA1*, kontrolujących procesy zapalne, przyczynia się natomiast do aktywacji szlaku *TNF α /NF- κ B*, który w naszych badaniach uznaliśmy za ważną ścieżkę hamowania aktywności transkrypcyjnej genu *MYOD*. Udowodniony wcześniej związek pomiędzy zahamowaniem ekspresji *NRF2*, a indukcją mediatora reakcji zapalnych iNOS i apoptozą (55,56), pozwala postulować, że aktywacja szlaku *TNF α /NF- κ B/iNOS* jest istotnym czynnikiem nie tylko negatywnie oddziałującym na regulację ekspresji genów miogenicznych, ale i aktywnie zaangażowanym w apoptotyczną redukcję komórek miogennych, co razem prowadzi do silnej destabilizacji procesu miogenezy.

Uzyskane wyniki dowodzą, że przewlekły proces zapalny i stres oksydacyjny spowodowany procesem nowotworowym prowadzi do istotnego wzrostu ekspresji proapoptotycznego genu *BAX* oraz poziomu 4-HNE, który sprzyja uwalnianiu z błony mitochondrialnej cytochromu c i aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy, jak również do supresji genu *HSPA1* przeciwdziałającego apoptozie. Dysproporcja pomiędzy zredukowanym poziomem ekspresji *MYOD* i wzrostem aktywności *BAX* zwraca uwagę na zachwianie równowagi pomiędzy proliferacją populacji komórek mięśniowych i ich śmiercią. Indukcja apoptozy ma miejsce przed zdiagnozowaniem klinicznego stanu kacheksji nowotworowej i wskazuje, że destabilizacja homeostatycznych procesów w tkance mięśniowej jest ważnym mechanizmem hamującym proliferację, różnicowanie i odbudowę mięśni, co w efekcie prowadzi do ich zaniku i rozwoju kacheksji.

Autofagia oprócz apoptozy okazała się także mieć znaczący wpływ na homeostazę mięśni szkieletowych badanych grup pacjentów. Należy zaznaczyć, że złożone interakcje między tymi

procesami powodują, że zaburzenie tylko jednego z nich może odgrywać ważną rolę w rozwoju atrofi mięśniowej.

W naszych badaniach stwierdziliśmy istotnie niższy poziom ekspresji uznanych markerów aktywacji autofagii – białek p62 i Bekliny 1 – w biopsjach pobranych z mięśnia szkieletowego zdrowych osób w podeszłym wieku. W tkance prawidłowej zdrowych osób białko p62 rozpoznaje autofagosomy i pośredniczy w ich degradacji poprzez wiązanie się z modyfikatorami ubikwityny należącymi do białek LC3 (57). Po zamknięciu się autofagosomu i jego fuzji z lizosomem, białko p62 jest degradowane wraz z innymi białkami. Dlatego też spadek ekspresji białka p62 świadczy o aktywnym procesie autofagii. Wykazaliśmy jednocześnie, że silna indukcja ekspresji genu *P62* była skorelowana z wysokim poziomem ekspresji *NRF2*, który podtrzymuje aktywnie proces autofagii (23), przeciwdziałając tym samym wewnątrzkomórkowej akumulacji nieprawidłowo pofałdowanych białek. Można więc wnioskować, że indukcja autofagii w procesie fizjologicznego starzenia się mięśni chroni je przed apoptozą pełniąc jednocześnie rolę mechanizmu „ratunkowego”, który umożliwia komórkom przezwycięzenie OS i usunięcie nieprawidłowych białek. Świadczy o tym istotny wzrost ekspresji genu *HSPA1*, jak również wykazany w pracy **H2** związek między jego antyapoptycznym działaniem i istotną aktywacją ekspresji genu *BCL2*. Warto również podkreślić rolę białek z rodziny HSP70 (w tym białko kodowane przez gen *HSPA1*) w promowaniu autofagii poprzez stabilizację lizosomów. Praca **H1** dostarcza więc jednoznacznych dowodów na to, że w komórkach mięśniowych zdrowych osób w podeszłym wieku, aktywacja procesów adaptacyjnych hamujących apoptozę (wzrost aktywności przeciwutleniającej i autofagii) jest ważnym mechanizmem obronnym zapewniającym utrzymanie homeostazy tkankowej. W roku ukazania się naszej pracy, opublikowane zostały badania przeprowadzone na modelu myszy geriatrycznej, w których wykazano, że dysfunkcja autofagii może mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie komórek miogenicznych (27). Można więc przypuszczać, że zakłócenie autofagii w starzejących się mięśniach szkieletowych człowieka jest potencjalnym czynnikiem wpływającym na upośledzenie funkcji miogenicznych i zdolności regeneracyjnych mięśni szkieletowych.

Istotnie wyższy poziom ekspresji białek p62 i Bekliny 1 stwierdziliśmy natomiast w mięśniu szkieletowym osób z chorobą nowotworową w porównaniu ze zdrowymi osobami w podeszłym wieku. Wynik ten dowodzi, że w mięśniach tych pacjentów na skutek dysfunkcji autofagosomu (upośledzenie ostatniej fazy autofagii) dochodzi do nadmiernej agregacji lub autofagosomalnej akumulacji białka p62/SQSTM1. W konsekwencji prowadzi to do zwiększonej degradacji białek mięśni szkieletowych, akumulacji cytotoksycznych metabolitów oraz uszkodzonych organelli i w efekcie do gwałtownego upośledzenia funkcji mięśni. Zaburzenie autofagii (wzrost poziomu białka p62) może również deregulować proliferację komórek mięśniowych lub stymulować ich śmierć (13–15, 24). Wskazuje to na istotną rolę upośledzenia autofagii w procesach indukcji apoptozy i destabilizacji miogenezy, co dodatkowo potwierdza diskutowany powyżej związek pomiędzy wzrostem aktywności genu *BAX* i supresją genów *HSPA1* i *MYOD*.

Zgodnie z naszą wiedzą, publikacja **H1** jest pierwszą pracą przedstawiającą interakcje złożonych procesów molekularnych prowadzących do degeneracji mięśni i ich możliwy wpływ na przebieg miogenezy u osób z chorobą nowotworową i stwierdzoną kacheksją oraz u zbliżonych wiekowo osób zdrowych. Wskazanie konsekwencji aktywacji lub/i supresji badanych markerów sugeruje nowe możliwości opracowania odpowiedniej terapii. Wykazaliśmy, że niepożądanym efektem procesów fizjologicznego starzenia się mięśni szkieletowych jest przewlekły stan zapalny oraz stres oksydacyjny o niskim nasileniu, w wyniku którego dochodzi do aktywacji mechanizmów

odpowiedzi adaptacyjnej (proces regeneracji mięśni, system obrony komórkowej i autofagii), umożliwiających utrzymanie masy i funkcji mięśni na poziomie właściwym dla badanej grupy osób zdrowych w starszym wieku.

Upośledzenie mechanizmów adaptacyjnych w wyniku choroby nowotworowej u osób w podeszłym wieku pośredniczy w powstawaniu zmian fenotypowych mięśni. Nasze wyniki jednoznacznie wskazują, że w mięśniach pacjentów z nowotworem (stadium II-III) górnego odcinka przewodu pokarmowego ze stabilną masą ciała zachodzą istotne zmiany molekularne, które wyprzedzają kliniczny stan kacheksji nowotworowej. Świadczy o tym zaburzenie homeostazy tkankowej wywołane zahamowaniem szlaków obrony komórkowej oraz upośledzeniem miogenezy, jak również indukcją apoptozy i dysfunkcją autofagii. Różnice w ekspresji genów wczesnego etapu miogenezy pomiędzy grupą chorych ze stabilną masą ciała oraz osób z kacheksją wskazują na istotną rolę wyczerpywania się funkcji miogenicznych w patogenezie kacheksji.

Praca **H2** stanowi kontynuację badań molekularnych mechanizmów regulujących procesy komórkowe w starzejących się fizjologicznie mięśniach szkieletowych, których destabilizacja może w konsekwencji przyczynić się do rozwoju sarkopenii pierwotnej. Biopsje mięśniowe w obu badanych kohortach pobierano od osób powyżej 75 roku życia, co umożliwiło zdefiniowanie i odróżnienie fenotypu zmian związanych z fizjologicznym procesem starzenia od fenotypu zmian charakterystycznych dla sarkopenii. Najważniejszym wynikiem analizy porównawczej przeprowadzonej w pracy **H2**, stanowiącym wkład w rozwój wiedzy na temat sarkopenii, jest wykazanie po raz pierwszy w klinicznych badaniach *in vivo* molekularnych zmian w aktywności miogenicznej mięśni szkieletowych wynikających bezpośrednio z sarkopenii pierwotnej.

Badania procesów regeneracyjnych wykazały, że w porównaniu z mięśniami zdrowych osób w podeszłym wieku (bez sarkopenii), mięśnie szkieletowe osób ze zdiagnozowaną sarkopenią, charakteryzują się znacznie niższym poziomem ekspresji genu *PAX7*, który pełni ważną funkcję w utrzymaniu populacji komórek mSCs. Biorąc pod uwagę, że proces miogenezy regulowany jest m.in. przez redukcję poziomu ekspresji genu *PAX7* i wzrost aktywności transkrypcyjnej miogenicznych czynników regulacyjnych *MYOD* i *MYF5*, sugerować można, że w mięśniach pacjentów z sarkopenią, komórki satelitarne znajdują się w stanie mitotycznego uśpienia. Świadczy o tym brak istotnej ekspresji genu *MYOD* i *MYF5* przy utrzymanej aktywności *PAX7* (58). Rozważyć również należy utratę zdolności proliferacyjnych starzejących się komórek. Brak istotnej ekspresji genu *MYF5* może ponadto powodować zmianę miogenicznego przeznaczenia mSCs i prowadzić do niepożądanego różnicowania się mSCs w kierunku adipocytów i fibroblastów (59). Należy jednak podkreślić, że poziom ekspresji badanych genów miogenicznych może zależeć również od populacji komórek satelitarnych uchwycionych w chwili pomiaru biopsji mięśniowych.

Aktywacja programu różnicowania komórek mięśniowych zależy również od ścieżki *MEF2C*, która choć nie wykazuje aktywności miogenicznej, posiada kluczowe znaczenie dla prawidłowej regeneracji i odbudowy włókien mięśniowych poprzez utrzymywanie ekspresji genu *MYOD* (16). Nasze wyniki wykazały supresję *MEF2C* w obu badanych grupach dostarczając tym samym ważnych informacji wskazujących, że zablokowanie tej ścieżki sygnałowej w mięśniach zdrowych osób w podeszłym wieku przyczynia się do nieprawidłowej regeneracji i odbudowy włókien mięśniowych. Konsekwencją tego jest powolna, lecz sukcesywna redukcja ich rozmiaru i jakości. Supresję genu *MEF2C* uznać więc można za wskaźnik patologicznych zmian w mięśniach szkieletowych zdrowych osób w podeszłym wieku, będących potencjalnym czynnikiem ryzyka rozwoju sarkopenii.

W przypadku sarkopenii nie mogliśmy jednak stwierdzić, w jakim stopniu pozytywne zmiany w ekspresji genu *MYOG* odzwierciedlają rzeczywisty stan terminalnego zróżnicowania miocytów i powstania funkcjonalnych włókien mięśniowych *in vivo*. Na podstawie uzyskanych wyników można jednak postulować, że mięśnie szkieletowe pacjentów z sarkopenią charakteryzują się zaburzeniem aktywności miogenicznej komórek mięśniowych oraz wadliwą regeneracją mięśni.

Włączenie do badań analiz *in vitro* na modelu komórkowym umożliwiło wskazanie istotnych zmian, prowadzących do uruchomienia sekwencji szlaków sygnałowych wpływających na aktywność miogeniczną mięśni szkieletowych w procesie ich starzenia się. Wykazaliśmy, że proces terminalnego zróżnicowania miogenicznego jest znacznie opóźniony w kulturach komórkowych pochodzących od starszych dawców (69-83 lat). Świadczyła o tym nie tylko istotnie obniżona ekspresja markerów funkcjonalnych miotub miogenina (*MYOG*) i troponina T1 (*TNNT1*), ale również i niższy wskaźnik tworzących się nowych włókien mięśniowych (ang. *fusion index*). Komórki, pochodzące od starszych dawców, charakteryzowały się także istotnie niższą ekspresją *MYOD*, którego spadek aktywności znacząco spowalnia proces zróżnicowania oraz niską ekspresją markera *MEF2C*, odpowiedzialnego za prawidłowy proces zróżnicowania (60).

Badania *in vitro* wykazały jednoznacznie, że przyczyną hamowania miogenezy oraz tworzenia funkcjonalnych miotub są zmiany w starzejących się komórkach mięśniowych. Stwierdziliśmy, że w procesie starzenia dochodzi do nabywania przez komórki tzw. fenotypu sekrecyjnego (ang. *senescence-associated secretory phenotype, SASP*), którego istotą jest zwiększone wydzielanie do środowiska czynników o zróżnicowanych funkcjach autokrynych i parakrynych. Zaliczane do nich są m.in. cytokiny prozapalne, które mogą inicjować sygnały promujące proces starzenia otaczających komórek, jak również przyczyniać się do zwiększenia stanu zapalnego. W warunkach *in vitro*, po 48 godzinach zróżnicowania mioblastów pochodzących od starszych dawców, dochodziło do istotnego wzrostu sekrecji cytokin prozapalnych *TNF α* , *IL-1*, *IL-6* i *IL-8*. Zmiany te są powiązane z akumulacją jądrowego czynnika transkrypcyjnego *NF- κ B* w mikrośrodowisku starzejących się komórek mięśniowych, który może pełnić funkcję regulatora rozwoju *SASP* (61). W związku z tym na szczególną uwagę zasługuje aktywacja szlaku sygnalizacyjnego kinazy białkowej p38 MAPK, która pobudza aktywność transkrypcyjną *NF- κ B* oraz indukuje fenotyp sekrecyjny starzejących się komórek mięśniowych, niezależnie od aktywacji szlaków odpowiedzi na uszkodzone DNA (62). Co istotne, p38 MAPK jest uznaną ścieżką sygnałową, która reguluje proces proliferacji i zróżnicowania mioblastów poprzez modulację aktywności transkrypcyjnej *MYOD* (63–65). Nasze wyniki wykazały, że w komórkach starszego dawcy (83 lat) wzrost poziomu fosforylowanej kinazy białkowej P-p38 utrzymywał się w trakcie całego procesu ich zróżnicowania i korelował nie tylko z istotną redukcją białka *MYOD*, ale również ze znacząco niższą ekspresją markerów funkcjonalnych miotub (*MYOG* i *TNNT1*). W mioblastach młodszego dawcy (17 lat) stwierdziliśmy natomiast efekt odwrotny, tzn. gwałtowny spadek ekspresji białka P-p38 we wczesnym etapie zróżnicowania oraz silną indukcję ekspresji *MYOD* i tym samym miogeniny i troponiny. Należy podkreślić, że kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK) mają zdolność do indukcji białka p16^{Ink4a}, markera procesów starzenia komórkowego. W naszych badaniach stwierdziliśmy zależną od wieku dawcy mioblastów korelację pomiędzy wzrostem poziomu tego białka, a wzrastającą ekspresją ww. cytokin przy utrzymanym wysokim poziomie kinazy p38 MAPK. Są to interesujące wyniki, gdyż zgodnie z doniesieniami na temat starzenia komórkowego (66) dowodzą, że stare mioblasty, charakteryzujące się dużą zawartością białka p16^{Ink4a}, posiadają mocno ograniczoną zdolność do proliferacji. Można więc wnioskować, że wraz z rozwojem *SASP* dochodzi do nagromadzenia się białka p16^{Ink4a} w mioblastach pochodzących od osób starszych (69-83

lat), w wyniku czego proces ich proliferacji jest znacznie spowolniony, a efektem tego jest niższy poziom białka MYOD w porównaniu z różnicowaniem się mioblastów pochodzących od osób młodszych (17-51 lat). Uzasadniając więc aktywację P-p38 MAPK lub indukcję syntezy p16^{ink4a}, praca nasza podkreśla istotną rolę tych białek w ograniczaniu potencjału proliferacyjnego mioblastów oraz promowaniu fenotypu komórek starych.

Aktywacja szlaku p16^{ink4a}, a w szczególności p38 MAPK, świadczy również o indukcji stresu oksydacyjnego i akumulacji czynników stresogennych (cytokiny i RFT) w mikrośrodowisku starzejących się komórek mięśniowych. Zmiany te powiązane są z aktywacją białka SOD2 (54), co potwierdziły także nasze badania *in vitro*. Dowiedliśmy, że pomimo kompensacyjnej aktywacji systemów obronnych, rozwój fenotypu sekrecyjnego SASP wraz z toksycznym działaniem RFT i sygnalizacją szlaków p38, p16^{ink4a} jest mechanizmem odpowiedzialnym za zakłócenie proliferacji i różnicowania starzejących się mioblastów. Efektem niepożądanym zachodzących zmian jest opóźnienie terminalnego różnicowania i obniżenie jakości regenerujących się mięśni.

Badania *in vivo* i *in vitro* w pracach **H1** i **H2** wskazują jednoznacznie, że przyczyną obniżenia jakości regenerujących się włókien mięśniowych w starszym wieku jest ich stała ekspozycja na utrzymujący się chroniczny stan zapalny, który powoduje wzrost poziomu RFT, sprzyjając tym samym rozwojowi procesu starzenia komórkowego i związanego z nim fenotypu SASP. Natomiast gdy starzejące się komórki mięśniowe tracą zdolności regeneracyjne, przechodzą transformację sprzyjającą ich degeneracji i zanikowi. W zależności od warunków, stan zapalny, w szczególności cytokina TNF α , mogą odgrywać podwójną rolę w procesie starzenia się mięśni. Z jednej bowiem strony, jak sugerują nasze badania *in vivo*, TNF α jest ważnym czynnikiem troficznym, inicjującym stabilny proces miogenicznej regeneracji (prace **H1** i **H2**), zapewniając tym samym zachowanie homeostazy tkankowej oraz prawidłowe funkcjonowanie starzejących się mięśni. Z drugiej strony, jak z kolei sugerują nasze badania *in vitro*, stan zapalny wraz ze wzrostem ekspresji TNF α można uznać za czynnik będący bezpośrednią przyczyną degeneracji, a nawet śmierci komórek mięśniowych (13).

W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w badaniach mięśni zdrowych osób w podeszłym wieku, w mięśniach osób z sarkopenią pierwotną nie stwierdziliśmy aktywacji procesów zapalnych (istotnego wzrostu ekspresji TNF α i IL-6). Wynik ten skłonił nas do konkluzji, że występowanie chronicznych procesów zapalnych, związanych ze starzeniem się mięśni ma miejsce przed zdiagnozowaniem klinicznego stanu sarkopenii. W momencie zdiagnozowania atrofii, tkanka mięśniowa zmieniona przez liczne procesy poprzedzające ten stan już charakteryzuje się zwłóknieniami, których powstawanie doprowadza do supresji cytokin TNF α i IL-6. Dlatego też, w przypadku sarkopenii, zaburzenia aktywności miogenicznej na jej wczesnych etapach mogą być spowodowane m.in. deficytem TNF α w mikrośrodowisku tkanki mięśniowej. Brak aktywnych procesów zapalnych, upośledzenie zdolności regeneracyjnych komórek mięśniowych oraz zwłóknienia zmniejszające sprawność mięśni można więc uznać za zmiany fenotypowe charakteryzujące mięśnie osób z sarkopenią.

Potencjalnymi czynnikami sprzyjającymi powstawaniu profibrotycznych zmian fenotypowych w tkance mięśniowej oprócz stanów zapalnych i RFT są również aktywacja fenotypu sekrecyjnego SASP (67) oraz zaburzenia zdolności regeneracyjnych mięśni (68,69). Pomimo, że celem badań opisanych w pracy **H2** nie była analiza procesu fibrozy, odniesienie wyników moich badań *in vitro* do ww. danych literaturowych i w tym kontekście stwierdzony wpływ starzenia komórkowego (aktywacja SASP wraz z sygnalizacją p38 oraz p16^{ink4a}) na zachwianie zdolności regeneracyjnych mięśni można rozważyć jako potencjalny czynnik sprzyjający rozwojowi fibrozy. Zwłóknienia w sarkopenii mogą być ponadto

wynikiem nieprawidłowego różnicowania się komórek mSC np. w miofibroblasty, na co wskazuje wykazany przez nas brak ekspresji genu *MYF5* oraz upośledzenie zdolności miogenicznej *in vivo* (59). Można więc założyć, że utrzymujące się przewlekłe zmiany w mikrośrodkowisku starzejących się mięśni, jak również wadliwe cykle ich regeneracji, prowadzą do powstawania coraz słabszych włókien mięśniowych o zredukowanych rozmiarach, predysponujących mięsień do coraz większych uszkodzeń i tworzenia zwłóknień. Z tego względu istnieje konieczność badań umożliwiających opracowanie strategii terapeutycznych przeciwdziałających powstawaniu zwłóknienia mięśni w trakcie ich starzenia.

Wskaźnikiem zmian patologicznych wynikających bezpośrednio z sarkopenii pierwotnej jest także redukcja ekspresji genu *SOD2*, związanego z regulacją poziomu RFT oraz genu *GCLM*, wskazująca na hamowanie syntezy GSH i zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej. Na uwagę zasługuje także nadmierna ekspresja genu *HSPA1A*, wywołana nagromadzeniem nieprawidłowo zwiniętych białek (tzw. misfolding proteinowy) i indukcją wewnątrzkomórkowego stresu (24). Otrzymane wyniki wskazują więc, że stres komórkowy, związany z dezaktywacją lub obniżoną aktywnością szlaków obrony komórkowej oraz akumulacją nieprawidłowych białek, może być potencjalnym szlakiem indukcji i/lub progresji sarkopenii. Czynniki te ponadto mogą negatywnie wpływać na proces miogenezy, która jak sugerują nasze wyniki, w mięśniach pacjentów z sarkopenią ulega upośledzeniu poprzez utratę aktywności miogenicznej komórek mięśniowych.

Badania moje dowodzą także, że w sarkopenii pierwotnej istotnie wyższa aktywność genu *HSPA1A* skorelowana z aktywacją genu *BCL2* prowadzi do blokowania mitochondrialnego szlaku apoptozy. Natomiast brak aktywacji proapoptotycznego genu *BAX* oraz akumulacja nieprawidłowych białek przyczyniać się może do indukcji autofagii jako mechanizmu kompensacyjnego. Hipoteza ta wymaga głębszej analizy i weryfikacji, zwraca jednak uwagę na ważny aspekt możliwych skutków ubocznych autofagicznej degradacji białek w sarkopenii. Szczegółowe badania związku między apoptozą i autofagią, mogą dostarczyć dodatkowych danych umożliwiających odróżnienie fenotypu starzejących się fizjologicznie zdrowych mięśni od fenotypu mięśni z sarkopenią.

W odróżnieniu od kacheksji nowotworowej (praca **H1**), sarkopenia charakteryzuje się brakiem apoptozy i aktywacją genów *NRF2*, *HSPA1A* i *BCL2*, które są wrażliwe na zmiany stanu redoks komórki i promują adaptacyjne procesy komórkowe w atroficznych włóknach mięśniowych (praca **H2**). Przyszłe badania mogą być pomocne w dalszej weryfikacji zidentyfikowanej różnicy pomiędzy patofizjologią kacheksji i sarkopenii w kohortach o większej liczebności pacjentów.

Włączenie do badań modelu komórkowego *in vitro* umożliwiło wskazanie istotnych zmian fenotypu sekrecyjnego SASP starzejących się komórek mięśniowych, który wraz z uruchomieniem sekwencji szlaków sygnałowych p38, p16^{ink4a} i RFT ma wpływ na spowolnienie procesu miogenezy oraz pogorszenie zdolności proliferacyjnych starzejących się komórek, co wpływa na obniżenie jakości regenerujących się mięśni. Wspólna analiza *in vivo* i *in vitro* wykazała aktywację zarówno patologicznych (stan zapalny, stres oksydacyjny, procesy starzenia komórkowego) jak i adaptacyjnych (aktywacja miogenezy, systemów obronnych i autofagii) procesów komórkowych w starzejących się mięśniach (prace **H1** i **H2**). Niektóre spośród tych mechanizmów funkcjonują także i w sarkopenii. W oparciu o nasze badania postulujemy jednak, iż zaburzenie procesów adaptacyjnych (głównie miogenezy i systemów obronnych) jest podstawą rozwoju sarkopenii. Przeprowadzone badania umożliwiły zidentyfikowanie szlaków molekularnych (szlak aktywności miogenicznej, systemów obronnych oraz procesów zapalnych), których zmiany w aktywności pozwalają na odróżnienie fenotypu starzejących się fizjologicznie zdrowych mięśni od fenotypu mięśni wykazujących sarkopenię pierwotną (prace **H1** i **H2**).

Liczne doniesienia naukowe wskazują, że ważną rolę w patofizjologii mięśni szkieletowych odgrywają cząsteczki miRNA. Należą one do klasy jednoniciowych krótkich (19-25 nukleotydów), niekodujących, endogennych cząsteczek regulacyjnych. miRNAs wchodzi w skład kompleksu rybonukleoproteinowego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który blokuje swoiście translację mRNA docelowego genu. Regulatorowa funkcja dojrzałych cząsteczek miRNA ma więc istotne znaczenie dla rozwoju, różnicowania i degeneracji mięśni, czego dowodem są liczne poziomy kontroli w procesie biogenezy miRNA.

miRNA są uznanymi modulatorami aktywacji (miR-195, miR-497), proliferacji (miR-133, miR-27) i różnicowania (miR-206, miR-1, miR-486) satelitarnych komórek macierzystych w mięśniach szkieletowych (70,71). Ich nieprawidłową ekspresję stwierdzano w rozwoju atrofii mięśniowej o zróżnicowanym podłożu patofizjologicznym (72). Mogą one także pełnić funkcje cząsteczek sygnałowych, pośredniczących w komunikacji międzykomórkowej pomiędzy różnymi narządami (73). Pojawiły się również sugestie, że miRNA wydzielane przez mięsień do płynów zewnątrzkomórkowych, mogą służyć jako potencjalne biomarkery prognostyczne i terapeutyczne w różnych stanach atrofii mięśni (74).

Najnowszą wiedzę na temat regulatorowej roli specyficznych cząsteczek miRNA w rozwoju atrofii mięśniowej podsumowano w publikacji **H4**. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują na udział odrębnych cząsteczek miRNA, które mają negatywny wpływ na aktywność miogeniczną oraz potencjał regeneracyjny mięśni w sarkopenii i kacheksji. W sarkopenii wyodrębniono cząsteczki miR-29, miR-125b, miR-143-3p i let-7, upośledzające proces miogenezy poprzez zahamowanie szlaków IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor 1*) i CDK6 (ang. *cyclin-dependent kinase*), co prowadzi do zwiększonej śmiertelności mioblastów związanej z aktywacją procesów starzenia komórkowego z udziałem białka p16^{Ink4a} i zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1 (75). Natomiast w patofizjologii mięśni związanej z kacheksją, na szczególną uwagę zasługuje miR-27. Zmiany w ekspresji miR-27 w mysim modelu komórkowym upośledzają proces miogenezy poprzez supresję genu *Mef2C* i zwiększenie aktywności genu *Mstn* (ang. *myostatin*), pełniącego rolę inhibitora proliferacji i różnicowania się mioblastów (76).

Istotne znaczenie mają badania kliniczne mające na celu potwierdzenie udziału cząsteczek miRNA w rozwoju atrofii mięśniowej, gdyż mogą one stanowić podstawę do opracowania nowych metod diagnostycznych i prognostycznych (77–79). W szczególności pomiary ekspresji miR-21, wydzielanego przez nowotwór w różnych okresach rozwoju choroby, mogą potwierdzić rolę tej cząsteczki jako biomarkera prognozującego kachektyczny zanik mięśni poprzez aktywację receptora TLR7/8, bezpośrednio indukującego apoptozę mioblastów (77).

Ważnym wnioskiem wynikającym z dokonanego przeglądu literatury jest wykazanie braku zgodnych i jednoznacznych konkluzji dotyczących roli specyficznych cząsteczek miRNA w zdrowym i atroficznym mięśniu. Praca **H4** zwraca także uwagę na konieczność standaryzacji komórkowych i zwierzęcych modeli doświadczalnych stosowanych w przedklinicznych badaniach atrofii mięśni człowieka, w celu wykluczenia czynników mających wpływ na rozbieżność i interpretację otrzymywanych wyników. Należą do nich: (i) różnorodność badanych gatunków, (ii) zróżnicowany wiek badanych zwierząt oraz (iii) fizjologiczne i kinematyczne różnice w narządzie ich ruchu.

Istotnym przesłaniem pracy **H4** jest także wskazanie nowych kierunków rozwoju przyszłych badań miRNA. Podkreślono w niej konieczność rozwoju badań długookresowych, określających przebieg zmian w ekspresji miRNA wraz z postępowaniem procesu zaniku mięśni, co umożliwiłoby wyodrębnienie cząsteczek będących przyczyną procesu atrofii. Większość dotychczasowych badań

odzwierciedla bowiem konsekwencje, a nie przyczynę zaniku mięśni, gdyż skupiają się one głównie na analizie ekspresji specyficznych cząsteczek miRNA w mięśniu atroficznym w porównaniu z mięśniem zdrowym.

Dla uzyskania pełnego obrazu roli miRNA w regulacji ekspresji i funkcji genów, konieczne jest także dokładne poznanie mechanizmów kontrolujących biogenezę miRNA. W szczególności, zrozumienie roli białek wiążących RNA (ang. *RNA-binding proteins*), jako czynników kontrolujących proces przetwarzania i deregulacji miRNA, przyczynić się może do głębszego poznania regulatorowych funkcji tych cząsteczek w atrofii mięśniowej.

Dokonany w pracy **H4** przegląd danych literaturowych wyraźnie wskazuje na konieczność potwierdzenia profili ekspresji poszczególnych cząsteczek miRNA w badaniach materiału pobranego od pacjentów z atrofią mięśniową, w celu określenia regulatorowej roli specyficznych cząsteczek miRNA o znaczeniu klinicznym w kacheksji lub sarkopenii.

Opracowanie nowych metod terapeutycznych spowalniających rozwój atrofii mięśniowej (29,39) wymaga rozwoju nowych strategii związanych z terapiami komórkowymi i badaniami toksykologicznymi. Ogromne nadzieje wiąże się z innowacyjną technologią komórek iPSCs, która w ostatnich latach wzbudziła zainteresowanie wśród lekarzy i naukowców. W szczególności mając na uwadze (i) wieloorganową dysfunkcję (głównie wątroby) spowodowaną chorobą nowotworową, (ii) wysokie ryzyko śmiertelności pacjentów z kacheksją i sarkopenią oraz (iii) wpływ innych chorób współistniejących i terapii na odpowiedź organizmu na testowany lek, pozyskiwanie komórek pochodzących z iPSCs do określania toksyczności organowej jest narzędziem umożliwiającym stratyfikację ryzyka w podejmowaniu decyzji o wyborze terapii lub w doborze terapii o spersonalizowanym profilu. Wątroba jest jednym z organów najbardziej narażonych na toksyczność leków, dlatego też ocena hepatotoksyczności stanowi podstawę w rozwoju nowych terapii. Ma to szczególne znaczenie w przypadku starszych pacjentów, u których wywołane procesem starzenia upośledzenie czynności wątroby jest czynnikiem powikłań polekowych, utrudniających prowadzenie badań klinicznych.

W tym kontekście istotnym celem drugiego kierunku moich badań było: (i) opracowanie nowych rozwiązań metodycznych łatwego, wydajnego i bezpiecznego pozyskiwania stabilnych linii iPSCs (**H5**) oraz (ii) ich wykorzystanie w opracowaniu modelu *in vitro*, jako narzędzia stosowanego na szeroką skalę w przedklinicznych testach cytotoxyczności leków (prace **H5** i **H6**). Badania zawarte w pracy **H5** prowadziłam jako główny wykonawca projektu Dr Hadwen Trust (Wielka Brytania) (Rozdział 5.5.). Ich ważnym założeniem było opracowanie modelu komórkowego, który mógłby zastąpić rutynowo stosowane modele zwierzęce w badaniach przesiewowych leków oraz w testowaniu ich bezpieczeństwa. Szczególnym osiągnięciem tych badań jest opracowanie wydajnego protokołu otrzymywania stabilnych linii iPSCs z łatwo dostępnego źródła jednojądrzastych komórek krwi obwodowej wraz z możliwością ich wykorzystania w badaniach toksykologicznych.

W pracy **H5** zbadaliśmy wydajność pozyskiwania komórek iPSCs z różnych typów komórek: (i) pierwotnych fibroblastów skóry, (ii) hepatocytów wyizolowanych z wątroby ludzkich płodów, (iii) komórek CD34⁺ otrzymanych z krwi pępowinowej oraz (iv) jednojądrzastych komórek wyizolowanych z krwi obwodowej (ang. *mononuclear cells*, *MNC*). Oceny wydajności procesu reprogramowania dokonaliśmy dla dwóch różnych wektorów episomalnych: (i) OSNLKM, który zapewniał stałą ekspresję czynników reprogramujących *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* (ang. *Nanog homeobox*), *Lin28* (ang. *Lin28 Homolog A*), *Klf4* i *L-Myc* oraz (ii) Epi5TM, który zamiast czynnika *Nanog* zawierał plazmid reprogramujący mp53DD. Warto zaznaczyć, że zastosowane przez nas wektory

episomalne mają przewagę nad wektorami wirusowymi, stosowanymi w innych pracach, gdyż nie integrują do genomu i pozostają w komórce jedynie przez pierwszych kilka cykli komórkowych. Nasza metoda warunkuje więc jedynie przejściową ekspresję kodowanych przez wektory episomalne czynników reprogramujących, a uzyskane kolonie komórek iPSCs pozbawione są cech manipulacji genetycznych i ryzyka mutagenezy. Niemniej metoda ta rzutuje na wydajność reprogramowania (40). W porównaniu z wcześniejszymi doniesieniami (80–82) osiągnęliśmy znacznie większą skuteczność i wydajność procesu reprogramowania: 0.033% dla komórek MNC (65 kolonii pozyskanych z 2×10^5 komórek MNC) oraz 0.148% (148 kolonii pozyskanych z 10^5 komórek) dla komórek CD34⁺ z krwi pępowinowej oraz hepatocytów z wątroby płodowej. Taką wydajność można było osiągnąć dzięki zastosowaniu episomalnego wektora Epi5TM, zawierającego plazmid reprogramujący mp53DD, który zapobiega niekontrolowanemu różnicowaniu komórek iPSCs, zwiększa ich proliferację i chroni przed apoptozą (83,84). Zastosowanie wektora OSNLKM nie przyniosło natomiast pozytywnych wyników w przypadku reprogramowania fibroblastów i komórek CD34⁺. Z praktycznego punktu widzenia, najlepszym i najłatwiej dostępnym źródłem pozyskiwania iPSCs są komórki MNC krwi obwodowej. Natomiast istotną zaletą opracowanego protokołu, umożliwiającą jego szersze zastosowanie m.in. w badaniach cytotoksyczności leków, jest możliwość reprogramowania komórek MNC izolowanych zarówno ze świeżej jak i zamrożonej krwi.

Za innowacyjny wynik tych badań uważam również zoptymalizowanie koktajlu cytokinowego, składającego się z czynnika SCF (ang. *stem cells factor*), cytokiny Flt3L i interleukiny 3 (IL-3) oraz wykazanie jego pozytywnego wpływu na proces reprogramowania komórek iPSCs. Stwierdziliśmy, że optymalizacja koktajlu i synergia działania cytokin wpływają na przyspieszenie i zwiększenie wydajności procesu reprogramowania. Zoptymalizowany koktajl miał szczególne znaczenie w zwiększeniu proliferacji rozmrożonych komórek MNC i CD34⁺, a uzyskane wyniki wykazały większą wydajność reprogramowania niż opisaną w badaniach Park i in. (2012) (85).

Optymalizacja czynników warunkujących złożony proces pozyskiwania iPSCs umożliwiła nam wprowadzenie znacznych uproszczeń w opracowanej metodzie. Ważnym etapem całej procedury jest skrócenie czasu kosztownego procesu generowania iPSCs. Zgodnie z naszą wiedzą, w pracy H5 po raz pierwszy udowodniliśmy możliwość natychmiastowego przesiewania komórek ludzkich po transfekcji i ich zdolność do przekształcania się w komórki iPSCs już po 9-10 dniach od transfekcji. Wcześniejsze doniesienia wskazywały, że proces ten wymaga dłuższego czasu, tzn. 14 dni (86).

Bardzo ważny dla uproszczenia metody okazał się również cykl eksperymentów, które udowodniły, że obecność w medium tzw. czynników wspomagających propagację komórek po transfekcji nie jest niezbędna. Wykazaliśmy, że proces generowania kolonii iPSCs osiągał najwyższą wydajność w warunkach zdefiniowanych, w których powierzchnia naczyń hodowlanych pokryta była tylko matrycelem wspierającym rozwój morfologiczny, proliferację i wzrost komórek bez konieczności dodatkowego wspomagania komórkami odżywczymi, takimi jak MEF (ang. *mouse embryonic fibroblasts*) lub BMSC (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells*). Komórki odżywcze w naszych eksperymentach, szczególnie w przypadku transfekowanych komórek MNC, wpływały negatywnie na proces reprogramowania i istotnie obniżały jego wydajność. Wyniki te wskazują, że komórki odżywcze wytwarzają niezdefiniowane dotychczas czynniki, które mogą mieć negatywny wpływ na powodzenie procesu reprogramowania komórek krwi. Wyeliminowanie składników pochodzenia zwierzęcego ma istotne znaczenie w kontekście pozyskiwania bezpiecznego materiału komórkowego, spełniającego wymagania warunkujące możliwość ich potencjalnego zastosowania w komórkowych terapiach regeneracyjnych.

Istotna dla uproszczenia protokołu okazała się również możliwość prowadzenia hodowli komórek bez konieczności wspomagania jej małymi cząsteczkami, uznanymi ogólnie za czynniki zwiększające skuteczność reprogramowania episomalnego. Należą do nich często stosowany koktajl CHALP, będący zoptymalizowaną mieszaniną niskocząsteczkowych inhibitorów: CHIR99021 (*inhibitor kinazy syntazy glikogenu 3*), HA-100 (*inhibitor kinazy białkowej*), A-83-01 (*inhibitor szlaku Activin/NODAL/TGF- β*), LIF (*inhibitor niekontrolowanych procesów różnicowania i utraty pluripotencji*) oraz PD032590 (*inhibitor szlaku MEK/ERK*). Otrzymane przez nas wyniki dowiodły, że koktajl CHALP, podobnie jak komórki odżywcze, spowalnia proces tworzenia kolonii przez komórki iPSCs i wpływa negatywnie na morfologię kolonii.

Reasumując, szczególnymi zaletami opracowanej przez nas metody pozyskiwania linii iPSCs są: (i) łatwy dostęp do materiału służącego do wyizolowania komórek MNC oraz nieinwazyjny sposób jego pobierania od pacjentów, (ii) skrócony i uproszczony protokół pozyskiwania komórek iPSCs z komórek MNC, (iii) dobra wydajność i wysoka powtarzalność metody oraz (iv) bezpieczeństwo zastosowania pozyskanego materiału dla potrzeb klinicznych.

Istotnym parametrem wpływającym na efektywność hodowli i różnicowania komórek iPSCs do komórek somatycznych jest stopień ich pluripotencji. Ocena fenotypu zreprogramowanych komórek iPSCs wykazała, że wszystkie otrzymane przez nas linie iPSCs, bez względu na źródło ich wygenerowania, posiadały cechy pluripotencjalnych komórek macierzystych i charakteryzowały się wysokim poziomem ekspresji zarówno zewnątrzkomórkowych białek SSEA4, SSEA3, Tra-1-60 i Tra-1-81 jak i wewnątrzkomórkowych markerów pluripotencji *OCT4* i *NANOG*.

Ważnym wynikiem, potwierdzającym możliwość praktycznego zastosowania otrzymanych komórek iPSCs, było wykazanie ich zdolności do różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych, charakteryzujących się ekspresją markerów specyficznych dla ektodermy (ekspresja białka OTX2), mezodermy (synteza czynnika Brachyury) i endodermy (ekspresja białka SOX17). W szczególności tworzenie komórek mezodermy, dzięki bezpiecznej metodzie reprogramowania iPSCs, umożliwia ich wykorzystanie do przekształcenia się w komórki mięśni szkieletowych jako potencjalnego materiału niezbędnego do opracowywania nowych strategii przeszczepu komórek miogennych pochodzących z iPSCs. Należy jednak zaznaczyć, że metody różnicowania z iPSCs miogennych komórek progenitorowych, utrzymujących potencjał samoodnowy *in vitro*, wymagają jeszcze wielu badań, aby mogły znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej.

Istotnym elementem pracy **H5** jest opracowanie modelu aktywnych metabolicznie hepatocytów o dużym potencjale wykorzystania w przedklinicznych testach cytotoksyczności i badaniach przesiewowych leków *in vitro* dla starszych osób z kacheksją lub sarkopenią, u których zmniejszona wydolność wątroby jest czynnikiem zakłócającym prawidłowy metabolizm leków. Badania kliniczne wskazują, że obniżona ekspresja cytochromu CYP3A4 w wątrobie chorych z kacheksją zmniejsza klirens leków, przez co zwiększa ich hepatotoksyczność, szczególnie u pacjentów poddawanych chemioterapii (87,88). W konsekwencji ma to negatywny wpływ na zdolności regeneracyjne mięśni szkieletowych. Warto także podkreślić, iż związana z wiekiem zmniejszona perfuzja tkanek jest odpowiedzialna za upośledzenie transportu leków do narządów docelowych, np. mięśni. CYP3A4 jest najbardziej aktywną izoformą cytochromu P450 biorącą udział w biotransformacji leków przeciwbólowych stosowanych w terapiach onkologicznych (np. opioidy, midazolam) (**H6**), jak również związków przeciwkachektycznych (np. bortezomib, anamorelin). W tym kontekście kliniczny potencjał wykorzystania komórek iPSCs został przez nas udokumentowany wysoką wydajnością ukierunkowanego przekształcenia iPSCs w hepatocyty,

których metaboliczna funkcjonalność była utrzymywana dzięki aktywności izoform CYP3A4 i 1A2 cytochromu P450 oraz ich zdolności do syntezy białek, w tym albuminy, α -1-antytrypsyny i fibrinogenu.

Praca **H5** dostarcza istotnych dowodów wskazujących na możliwości wykorzystania technologii komórek iPSCs na skalę wystarczającą dla ich praktycznego zastosowania w badaniach nad stratyfikacją bezpieczeństwa leków. Znamiennym tego dowodem jest aplikacja, zarówno protokołu reprogramowania iPSCs, jak również ich różnicowania, w moich pracach badawczych dla międzynarodowego konsorcjum StemBANCC (IMI, EFPIA), których celem było m.in. testowanie skuteczności i bezpieczeństwa leków. Warto jednak podkreślić, że testy wykonane w hodowlach 2D (**H5**), nie odzwierciedlają w pełni cytotoxycywności leków w porównaniu do wyników badań *in vivo*. Dlatego też w kolejnym etapie moich prac uwagę poświęciłam hodowlom 3D.

Uzyskując stypendium międzynarodowego konsorcjum StemBANCC (IMI, EFPIA) (Wielka Brytania) (Rozdział 5.5.) uczestniczyłam w badaniach wykorzystujących zaawansowane, nowoczesne techniki inżynierii tkankowej do różnicowania komórek iPSCs w hodowlach 3D. Praca **H6**, której celem było stworzenie metabolicznie funkcjonujących organoidów dla potrzeb badań farmakologicznych, jest ważnym tematycznym i metodologicznym uzupełnieniem pracy **H5**, jak również stanowi wkład w rozwój technik różnicowania komórek iPSCs. Zoptymalizowany przeze mnie w pracy **H5** protokół różnicujący, który umożliwia utrzymywanie komórek w warunkach zdefiniowanych bez stosowania komponentów odzwierzęcych, stanowił podstawę stworzenia metabolicznie dojrzałych hepatocytów w: (i) statycznym systemie mikrosferoidów pozbawionym rusztowań oraz (ii) dynamicznym systemie bioreaktora perfuzyjnego z rusztowaniami adhezyjnymi. Modele te pozwoliły na odtwarzanie mikrośrodowiska *in vivo*, które uwzględnia architekturę komórek 3D, interakcje komórka-komórka i komórka-matryca oraz przepływ substancji odżywczych. Moim wkładem w tym wielośrodowym badaniu było wyselekcjonowanie (spośród kilkudziesięciu linii komórek) linii komórek iPSCs o najwyższym potencjale różnicowania, warunkującym ich skuteczne przekształcanie w hodowlach 3D.

Dowiedliśmy, że obydwa systemy 3D istotnie zwiększają wydajność ukierunkowanego różnicowania iPSCs w hepatocyty, których metaboliczna funkcjonalność w pełni odzwierciedlała profil dojrzałych hepatocytów, tzn. metaboliczną aktywność enzymów P450 (1A2 lub 3A4) oraz długoterminowe stabilne wydzielanie albuminy i produkcję mocznika. Aktywność izoenzymów P450 ulegała istotnej zmianie pod wpływem stymulacji specyficznych substratów lekowych, stosowanych często w terapiach pacjentów onkologicznych: phenacetin (izoenzym 1A2), midazol (izoenzym 3A4) oraz bupropion (izoenzym 2B6). Warto podkreślić, że duża część tego typu badań skupia się na porównywaniu zróżnicowanych komórek w hodowlach 3D z komórkami różnicowanymi w hodowli 2D lub nawet z niezróżnicowanym stanem komórek iPSCs. W naszym badaniu analiza porównawcza zmian w aktywności izoenzymów CYP450, jak również ich czynników transkrypcyjnych, przeprowadzona została w odniesieniu do hepatocytów izolowanych z biopsji ludzkiej wątroby. Umożliwiło to wiarygodną ocenę parametrów reprezentujących metaboliczne funkcje komórek zróżnicowanych w hodowlach 2D oraz 3D. Wykorzystanie pierwotnych hepatocytów, które w pełni pozwalają odtworzyć szlaki biotransformacji lekowej, doprowadziło do wniosku, że hepatocyty otrzymywane w hodowlach 2D odzwierciedlają fenotyp metabolicznie niedojrzałych komórek wątroby płodu. Natomiast generowane w systemach 3D hepatocyty wykazują fenotyp w pełni dojrzałych metabolicznie komórek, pomimo ich znacząco niższej aktywności w porównaniu z izolowanymi pierwotnymi hepatocytami. W ten sposób mogliśmy ocenić, który z opracowanych modeli, posiada największy potencjał praktycznego zastosowania w badaniach przedklinicznych.

Ważnym wnioskiem naszych badań jest wykazanie, że wybór systemu 3D powinien być uzależniony od celu zamierzonej aplikacji pochodzących z iPSCs hepatocytów. Badania nasze jednoznacznie dowodzą, że statyczny model sferoidów, ze względu na łatwość propagacji procesu różnicowania, jest systemem, który powinien znaleźć swoje szerokie zastosowanie w badaniach farmakologicznych, dla których bezwzględnie pożądana jest metaboliczna dojrzałość hepatocytów. Ze względu jednak na utrudniony dopływ tlenu i składników odżywczych do centrum sferoidów, badanie nasze podkreśla konieczność optymalizacji wyników w odniesieniu do rozmiarów komórkowych agregatów. System bioreaktorów, który zapewnia złożoną kontrolę parametrów molekularnych i fizykochemicznych, uznaliśmy natomiast za idealny instrument dla potrzeb złożonych badań procesów fizjologicznych oraz patofizjologicznych różnicowania komórkowego.

Mając na uwadze potrzebę oceny bezpieczeństwa, a w szczególności hepatotoksyczności testowanych leków dla chorych z zanikiem mięśni, w pracy **H6** dostarczyliśmy ważnych informacji na temat innowacyjnych technik inżynierii tkankowej stanowiących podstawę rozwoju i udoskonalania badań w tym zakresie. W szczególności wykazana przez nas istotna ekspresja białek cytochromu P450, zapewnia możliwość oceny szlaków biotransformacji (profil metaboliczny i przewidywanie klirensu wątrobowego), jak również wykrycia toksycznych metabolitów leku, mających negatywny wpływ na inne organy, w tym na zdolności regeneracyjne mięśni szkieletowych. Proponowany system komórkowy może być także przydatny w przewidywaniu ryzyka interakcji lekowych (np. badania potencjału inhibicyjnego). Ma to szczególne znaczenie dla oceny bezpieczeństwa terapii u pacjentów onkologicznych i starszych osób, gdy wdrożenie nowego leku może zaburzać metabolizm innych związków lub być przyczyną zdarzeń niepożądanych.

Alternatywnym modelem komórkowym, opisanym w pracy **H3**, który coraz częściej wykorzystywany jest w przedklinicznych badaniach przesiewowych w kierunku określenia skuteczności i toksyczności leków, jest model surogatowych pierwotnych hepatocytów ludzkich HepaRG-P. Komórki te wykazują właściwości progenitorowych komórek macierzystych, które w trakcie procesu namnażania i różnicowania tworzą wspólną hodowlę cholangiocytów i hepatocytów. Dzięki takim właściwościom, komórki HepaRG mogą być wykorzystywane w modelowych badaniach przedklinicznych, w których niezwykle ważne jest wykluczenie działań ubocznych, np. cholestazy, będącej niepożądaną konsekwencją wielu terapii lekowych (**P13**), w tym również badanego u chorych z kacheksją związku anabolicznego SARMS. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją najważniejszych izoenzymów cytochromu P450 (CYP1A2, 2B6, 2D6, 2E1, 3A4). Dlatego też stanowią one ważną alternatywę dla badań metabolizmu leków oraz roli cytochromu P450, co jest podstawą procesu opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Warto podkreślić, iż ważnym przesłaniem pracy **H3** jest wykazanie konieczności weryfikacji stabilności RGs w przypadku testowania leków z wykorzystaniem modeli komórkowych, które ulegają fenotypowym zmianom w trakcie procesów różnicowania komórkowego.

W świetle poszukiwań rozwiązań aplikacyjnych w doskonaleniu procesów testowania nowych potencjalnych związków farmakologicznych dla chorych z zanikiem mięśni, prace **H3**, **H5** i **H6** stanowią wkład w rozwój nauki w obszarze badań biomedycznych, gdyż nie tylko oferują modele komórkowe o dużym potencjale wykorzystania, lecz także dostarczają ważnych informacji na temat standaryzacji badań niezbędnych do stratyfikacji bezpieczeństwa i skuteczności badanych leków.

4.3.4. Znaczenie wyników wraz z możliwościami ich wykorzystania oraz podsumowanie prac i wnioski końcowe

Znaczenie wyników i możliwości ich wykorzystania oraz wkład w rozwój nauki

W naszych badaniach klinicznych, wykonanych na biopsjach tego samego typu mięśnia szkieletowego, wykazaliśmy po raz pierwszy zmiany w aktywności miogenicznej i potencjale regeneracyjnym mięśnia czworogłowego uda u pacjentów w podeszłym wieku ze zdiagnozowaną sarkopenią i kacheksją nowotworową (prace **H1** i **H2**).

Szczególnym osiągnięciem tych prac, stanowiącym wkład w rozwój badań atrofi mięśniowej, jest:

- (i) analiza porównawcza ekspresji wielu genów wskazująca na różnice w profilu molekularnym tego samego typu mięśnia w fizjologicznym procesie starzenia się organizmu oraz w stanach patofizjologicznych: sarkopenii pierwotnej i kacheksji nowotworowej,
- (ii) zidentyfikowanie szlaków molekularnych oraz zmian w ich aktywności umożliwiających odróżnienie fenotypu starzejących się fizjologicznie zdrowych mięśni od fenotypu mięśni wykazujących sarkopenię.

Wyniki tych badań dostarczają szczegółowej wiedzy o znaczeniu klinicznym i aplikacyjnym dla:

- (i) identyfikacji markerów do stratyfikacji pacjentów dla potrzeb badań klinicznych związanych z atrofią mięśniową,
- (ii) dalszej identyfikacji nowych szlaków molekularnych odpowiedzialnych za rozwój atrofi mięśniowej oraz
- (iii) opracowania interwencji terapeutycznych skierowanych na prewencję utraty masy mięśniowej poprzez zablokowanie specyficznych ścieżek sygnałowych.

Biorąc pod uwagę, że istotnym kryterium uzyskania rzetelnych i powtarzalnych wyników badań biomedycznych jest właściwa standaryzacja procedury RT-qPCR, w tym zweryfikowany dobór genów referencyjnych, znaczącym osiągnięciem pracy **H3** jest wskazanie po raz pierwszy wpływu hepatotoksyn (o różnym mechanizmie działania) na zmiany ekspresji RG oraz udowodnienie, że ich nieprawidłowy dobór zmienia znacząco wyniki ekspresji markerów istotnych dla metabolizmu testowanych związków farmakologicznych. Na uwagę zasługuje również wkład literaturowy pracy przeglądowej **H4**, który polega na wskazaniu istotnych nowych kierunków rozwoju przyszłych badań, np. w celu wyodrębnienia specyficznych cząsteczek miRNA o znaczeniu klinicznym w kacheksji lub sarkopenii.

Uwzględniając natomiast konieczność rozwoju badań nad opracowaniem strategii terapeutycznych zapobiegających lub spowalniających rozwój atrofi mięśniowej, istotnym elementem prac **H5** i **H6** jest ich duży potencjał aplikacyjny. Nowatorski charakter naszych badań, stanowiący wkład w udoskonalenie technik reprogramowania i różnicowania komórek iPSCs, polega na:

- (i) opracowaniu nowych rozwiązań metodologicznych łatwego, wydajnego i bezpiecznego pozyskiwania ludzkich komórek iPSCs na skalę wystarczającą dla ich praktycznego zastosowania w przedklinicznych testach farmakologicznych oraz
- (ii) opracowaniu modelu metabolicznie funkcjonujących organoidów o dużym potencjale wykorzystania w badaniach nad stratyfikacją bezpieczeństwa leków (np. dla efektywnej terapii terminalnie chorych pacjentów z zanikiem mięśni).

Podsumowanie prac

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono że:

1. Fizjologiczny proces starzenia się mięśni szkieletowych jest konsekwencją:
 - a) przewlekłego stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w tkance mięśniowej,
 - b) obniżenia jakości regenerujących się włókien mięśniowych poprzez:
 - nabywanie fenotypu sekrecyjnego SASP oraz uruchomienie sekwencji szlaków sygnałowych p38 oraz p16^{ink4a} odpowiedzialnych za zakłócenie proliferacji i różnicowania mioblastów,
 - wadliwą przebudowę mięśni związaną z supresją ścieżki sygnałowej *MEF2C*,
 - akumulację czynników stresogennych w mikrośrodkowisku komórek mięśniowych oraz ich chroniczne oksydacyjne uszkodzenia.
2. Mięśnie szkieletowe w sarkopenii pierwotnej charakteryzują się:
 - a) brakiem aktywnych procesów zapalnych oraz deficytem *TNF α* w mikrośrodkowisku tkanki mięśniowej, co zwraca uwagę na ważny aspekt tworzenia się zwłóknień,
 - b) upośledzeniem zdolności regeneracyjnej komórek mięśniowych poprzez zakłócenie wczesnego etapu miogenezy (brak istotnej ekspresji genów *MYOD* i *MYF5*) oraz wadliwą przebudową mięśni (supresja genu *MEF2C*),
 - c) nadmierną akumulacją nieprawidłowych białek, indukcją wewnątrzkomórkowego stresu oraz brakiem apoptozy (wzrost ekspresji genów *HSPA1A* i *BCL2*),
 - d) zachowaniem aktywności szlaków molekularnych *NRF2*, *HSPA1A* i *BCL2*, promujących adaptacyjne procesy komórkowe w atroficznych włóknach mięśniowych.
3. Proces nowotworowy górnego odcinka przewodu pokarmowego (stadium II-III) ma istotny wpływ na indukcję zmian molekularnych w mięśni szkieletowym, które poprzedzają kliniczny stan kacheksji. Należą do nich:
 - a) chroniczny stan zapalny wzmagający stres oksydacyjny i uszkodzenia oksydacyjne (wzrost poziomu 4-HNE),
 - b) supresja genów obrony komórkowej (*SOD2*, *NRF2*, *GCLM*, *HSPA1A*), której konsekwencją jest destabilizacja homeostazy mięśni szkieletowych poprzez:
 - redukcję poziomu transkryptów mRNA dla genów *MYOD* i *MYF5* oraz supresję genu *MYOG*, która świadczy o zablokowaniu miogenezy oraz braku zdolności odtwarzania struktury regenerowanego mięśnia,
 - upośledzenie autofagii i indukcję apoptozy, co wskazuje na ważny aspekt udziału obu procesów w destabilizacji miogenezy.
4. Indukcja ww. procesów molekularnych stanowi podstawę rozwoju kacheksji, w której mięśnie szkieletowe charakteryzują się niedoborem lub brakiem aktywacji komórek satelitarnych (mSCs) oraz poważnym upośledzeniem zdolności regeneracyjnych na wszystkich etapach miogenezy, jak również aktywnym procesem apoptozy, nasilającym degenerację tkanki mięśniowej.
5. Stres oksydacyjny, który towarzyszy fizjologicznemu starzeniu się mięśni oraz rozwojowi badanych atrofii mięśniowych:
 - a) aktywowuje mechanizmy odpowiedzi adaptacyjnej (regenerację mięśni, system obrony komórkowej i autofagii) w procesie fizjologicznego starzenia się mięśni, jak również sarkopenii (system obrony komórkowej),

- b) powoduje supresję genów obrony komórkowej w mięśniach pacjentów z nowotworem górnego odcinka przewodu pokarmowego (stadium II-III) zarówno u osób ze stabilną masą ciała jak i z kacheksją.
6. Zastosowanie bezpiecznej i wydajnej procedury reprogramowania komórek iPSCs (**H5**) wraz z możliwością ich różnicowania do metabolicznie dojrzałych hepatocytów w hodowli 3D (**H6**) otwiera nowe możliwości dla poprawy predykcyjnej oceny bezpieczeństwa testowanych leków dla pacjentów z zanikiem mięśni.
 7. Zachowanie właściwej standaryzacji procedury RT-qPCR (**H3**) oraz krytyczna analiza i weryfikacja wszystkich etapów ilościowego oznaczenia poziomu ekspresji genów są kluczowe dla utrzymania wysokiej jakości badań przedstawionych w pracach eksperymentalnych **H1**, **H2**, **H3**, **H5** i **H6**.
 8. Dalsze badania w kohortach o większej liczebności pacjentów z kacheksją i sarkopenią są niezbędne w celu zidentyfikowania dodatkowych różnic pomiędzy badanymi patofizjologiami.

Wnioski końcowe

Wyniki moich badań przeprowadzonych w pracach **H1**, **H2**, **H3**, **H5** i **H6** wskazują na:

1. Istotne różnice w aktywności miogenicznej i potencjale regeneracyjnym mięśnia czworogłowego uda w procesie fizjologicznego starzenia się organizmu oraz rozwoju sarkopenii pierwotnej i choroby nowotworowej (w tym kacheksji) (**H1** i **H2**).
2. Zaburzenia procesów homeostatycznych w mięśniu szkieletowym, które poprzedzają kliniczny stan kacheksji i mają wpływ na destabilizację miogenezy (**H1**).
3. Zmiany w szlakach molekularnych na podstawie których można odróżnić fenotyp starzejących się fizjologicznie mięśni od fenotypu mięśni wykazujących sarkopenię pierwotną (**H2**).
4. Destabilizację miogenezy w procesie starzenia się mięśni w układzie modelowym *in vitro* (**H2**).
5. Możliwości opracowania interwencji terapeutycznych skierowanych na przeciwdziałanie atrofii mięśniowej, m.in. poprzez kontrolę szlaków molekularnych odpowiedzialnych za degenerację mięśni szkieletowych (**H1** i **H2**) oraz wykorzystanie technologii komórek iPSCs dla potrzeb badań farmakologicznych (**H5** i **H6**).
6. Korzyści wynikające z aplikacji statycznego modelu sferoidów w badaniach przedklinicznych bezpieczeństwa leków (**H6**).
7. Konieczność monitorowania zmian ekspresji genów referencyjnych (RGs) w celu zapewnienia wysokiej jakości badań (**H3**).

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

5.1. Działalność naukowa przed doktoratem oraz w trakcie doktoratu

W początkowym okresie (1994-1995) mojego zatrudnienia na etacie naukowo-technicznym w Katedrze Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego uczestniczyłam w badaniach zmian strukturalnych w śluzie żołądkowym pacjentów z różnymi stanami chorobowymi, ze szczególnym uwzględnieniem roli patogenu bakteryjnego *Helicobacter pylori* (*H.pylori*). Zagadnienie to było przedmiotem mojej pracy magisterskiej, którą obroniłam w roku 1995 oraz pracy przeglądowej **O1**.

Moje inne zainteresowania naukowe w tym czasie dotyczyły także analizy stresu oksydacyjnego w erytrocytach pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (publikacja **O2**).

Okres studiów doktoranckich (1995-1999) umożliwił mi doskonalenie warsztatu badawczego w zakresie zastosowania technik biofizycznych do oceny zmian reologicznych krwi w badaniach stresu oksydacyjnego, tj. spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (spektroskopia EPR) oraz spektroskopii fluorescencyjnej. W pracy doktorskiej, m.in. analizowałam dynamikę zmian w strukturze hemoglobiny, błony i białek cytosolu erytrocytów w różnych układach modelowych *in vitro* stosując H₂O₂, t-butOH, NO i Fe²⁺ (publikacje **O3 i O4**).

Na mój dorobek naukowy w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora składają się: 1 praca przeglądowa (**O1**), 3 oryginalne prace eksperymentalne (**O2-O4**) oraz 8 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Poniżej przedstawiam zestawienie publikacji, dokumentujących moje osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora:

(i) Zestawienie artykułów naukowych

- O1** Brzeszczyńska J, Gwoździński K. (1997). Charakterystyka stanów chorobowych żołądka. *Acta Universitatis Lodzensis: Folia Biochimica et Biophysica*. 12:17-28.
- O2** Gwoździński K, Janicka M, Brzeszczyńska J, Luciak M. (1997). Changes in red blood cell membrane structure in patients with chronic renal failure, *Acta Biochimica Polonica*. 44 (1):99-108.³
- O3** Brzeszczyńska J, Gwoździński K. (1998). Erythrocyte membrane damage induced by t-butyl hydroperoxide. *Current Topics in Biophysics*. 22 (B):27-32.
- O4** Brzeszczyńska J, Gwoździński K. (1999). t-butylhydroperoxide-induced alterations in erythrocyte components. *Current Topics in Biophysics*. 23 (1):113-118.

(ii) Zestawienie doniesień konferencyjnych

1. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Uszkodzenia błon erytrocytów człowieka przez nadtlenuk wodoru. XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, (9-12 wrzesień, 1997), Katowice.
2. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Zmiany w strukturze błon erytrocytów indukowane przez t-butylowodoronadtlenek. XXXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, (9-12 wrzesień, 1997), Katowice.
3. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Hydrogen peroxide leads to erythrocyte membrane damage. 4th Symposium Free Radicals in Biology and Medicine, (8-10 czerwiec, 1998), Łódź.
4. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Red blood cells damage induced by t-butylhydroperoxide. 4th Symposium Free Radicals in Biology and Medicine, (8-10 czerwiec, 1998), Łódź.
5. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Effect of organic and inorganic peroxide on erythrocyte membrane. *Revista de Farmacia e Biquimica da Universidade de Sao Paulo*. IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, (7-11 wrzesień, 1998), Sao Paulo, Brazylia.
6. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Zmiany w białkach błonowych indukowane przez t-butylowodoronadtlenek. X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biofizycznego, (2-4 wrzesień, 1998), Lublin.
7. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Zmiany w białkach błonowych indukowane przez nadtlenuk wodoru. XXXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, (15-18 wrzesień, 1998), Białystok.
8. Brzeszczyńska J, Gwoździński K. Nitric Oxide - induced oxidative damage in human erythrocyte membrane. SFRR (Europe) Summer Meeting: Antioxidants, Adaptation, Aging, (2-6 lipiec, 1998), Dresden, Niemcy.

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W roku 2003 odbyłam półroczny staż podoktorski w USA na Arizona State University (ASU) w School of Life Sciences w Tempe, AZ. Celem tego pobytu było podniesienie kwalifikacji w prowadzeniu pracy dydaktycznej w anglojęzycznych placówkach akademickich poprzez odbycie licznych kursów szkoleniowych na ASU oraz aktywne uczestnictwo w seminariach naukowych. Pobyt ten umożliwił mi

³ Czasopismo *Acta Biochimica Polonica* posiada IF₁₉₉₇:0,522, IF₂₀₂₀:1,42 oraz 40 pkt MNiSW.

również nawiązanie kontaktu z Natural Science Division, Scottsdale Community College (SCC) w Scottsdale, AZ, gdzie mogłam zapoznać się głębiej z pracą dydaktyczno-naukową w USA.

Moja aktywność naukowa w uczelniach akademickich została wznowiona w 2006 roku, tj. 7 lat po uzyskaniu stopnia doktora (okres ten obejmuje pracę w koncernie farmaceutycznym Merck, Sharp and Dohme (MSD) oraz urlop macierzyński). Od tego czasu pracę naukowo-badawczą realizowałam w kilku zagranicznych instytucjach naukowych w Wielkiej Brytanii: Heriot-Watt University w Edynburgu, University of Edinburgh w Edynburgu oraz University of the West of Scotland w Glasgow (okres ten obejmuje także drugi urlop macierzyński), przy jednoczesnym zachowaniu aktywności naukowej na Uniwersytecie Łódzkim, w którym od roku 2009 jestem zatrudniona w Katedrze Biofizyki Molekularnej na stanowisku adiunkta (1/4 etatu).

W 2006 roku rozpoczęłam pracę w School of Life Sciences (SLS) na Heriot-Watt University w Edynburgu, gdzie zostałam zatrudniona na stanowisku naukowo-badawczym jako Research Associate. Współpracowałam naukowo z zespołem, którego kierownikiem był prof. Jamie Timmons, prowadząc badania nad fizjopatologicznym efektem wpływu treningu fizycznego na organizm człowieka. Badania te pozwoliły mi rozwinąć kompetencje badawcze w zakresie protokołów stosowanych w klinicznych próbach wysiłkowych oraz w obszarze technik laboratoryjnych stosowanych w biologii molekularnej.

Wiedza i doświadczenie zdobyte na Heriot-Watt University umożliwiły mi realizację projektu badawczego dzięki nagrodzie przyznanej przez British Council w ramach British-Polish Young Scientists Programme. Celem tego projektu, którego jednocześnie byłam kierownikiem, było rozwinięcie nawiązanej wcześniej przeze mnie międzynarodowej współpracy, pomiędzy Heriot-Watt University, a Katedrą Medycyny Sportowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (zespół prof. dr hab. Anny Jegier) oraz Katedrą Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego (zespół prof. dr hab. Krzysztofa Gwoździńskiego). Dzięki tej kilkośrodkowej współpracy miałam możliwość kontynuowania moich zainteresowań naukowych w zakresie badań stresu oksydacyjnego, którego źródłem w tym przypadku był fizjologiczny model jednorazowej, intensywnej próby wysiłkowej w badaniach *in vivo* młodych mężczyzn. Badania wykonane w ramach ww. projektu zainicjowały nurt badawczy, który w kolejnych latach zaowocował zdobyciem dwóch grantów badawczych finansowanych przez MNiSW. W obu grantach byłam głównym wykonawcą.

Realizowane badania dowiodły, że fizjologiczny model OS jest istotnym aktywatorem zmian reologicznych krwi, jak również czynnikiem sprzyjającym mobilizacji adaptacyjnych systemów przeciwutleniających w erytrocytach oraz osoczu krwi. Dowiedliśmy, iż indukowane fizjologicznym wysiłkiem zmiany strukturalne erytrocytów korelują z ich przyspieszonym starzeniem się, skracającym długość czasu ich występowania we krwi, korzystnie wpływając na poprawę wydolności układu krążeniowego (publikacje **P1-P4**). Włączenie do badań grupy pacjentów po przebytych zawale mięśnia sercowego wykazało, że program rehabilitacji kardiologicznej z ambulatoryjną formą prób wysiłkowych skutecznie obniża wartości wskaźników stresu oksydacyjnego przyczyniając się do poprawy parametrów biochemicznych i morfologicznych krwi. W konsekwencji, osoby uczestniczące w programach kompleksowej rehabilitacji kardiologicznej osiągają poprawę wydolności układu krążeniowo-oddechowego oraz wydolności fizycznej (publikacje **P5-P6**).

Efektom badań w obu grantach jest cykl **6** publikacji (**P1-P6**), **9** komunikatów zaprezentowanych na konferencjach o zasięgu międzynarodowym oraz **1** pracy opublikowanej jako materiały pokonferencyjne z numerem DOI.

W okresie tym zajmowałam się także analizą porównawczą zmian reologicznych erytrocytów poddawanych stresowi oksydacyjnemu *in vitro* ze zmianami reologicznymi erytrocytów pacjentów dializowanych, chorujących na przewlekłą niewydolność nerek (badania *in vivo*). Badania te dowiodły, że zabieg hemodializy znacząco przyczynia się do powstawania OS oraz utleniania i glikacji białek osocza, jak również do zmian stanu konformacyjnego albuminy oraz integralności błony erytrocytarnej. Wyniki tych prac zostały zamieszczone w cyklu 3 prac doświadczalnych (P7-P9), w których jestem autorem korespondencyjnym.

Ważnym punktem zwrotnym, który przyczynił się do zasadniczego ukierunkowania moich zainteresowań naukowych, było rozpoczęcie w 2009 roku trzyletniego stażu podoktorskiego w Medical Research Centre for Regenerative Medicine mieszczącym się w Division of Health Sciences na University of Edinburgh w Edynburgu w Wielkiej Brytanii w zespole badawczym, którego kierownikiem był prof. James Ross. Zdobywanie stażu podoktorskiego oraz zatrudnienie na stanowisku Postdoctoral Research Fellow wiązało się z przejściem procedur rekrutacyjnych w drodze konkursu na University of Edinburgh. W okresie tym nagrodzona zostałam stypendiami naukowymi (Fellowships), przyznanymi przez Edinburgh and Lothians Health Foundation (2009-2011) oraz The Leverhulme Trust i The Daphne Jackson Trust (2010-2012), na wykonanie badań z zakresu medycyny regeneracyjnej. Prace, które przeprowadziłam w ramach stypendium The Leverhulme Trust, The Daphne Jackson Trust, Dr Hadwen Trust oraz StemBANCC (IMI, EFPIA) zostały opisane szczegółowo w Autoreferacie w rozdziale 4. Nagrody te stały się podstawą do otrzymania przeze mnie stanowiska Senior Research Fellow w Division of Health Sciences na University of Edinburgh w 2013 roku.

Przedmiotem mojej specjalizacji naukowej stały się badania różnych typów komórek macierzystych (tkankowych i pluripotencjalnych) oraz ich aplikacji do badań cytotoksyczności leków. Moje prace badawcze skupiały się na poznaniu molekularnych procesów zaangażowanych w rozwój degeneracji tkanki oraz regulujących aktywność regeneracyjną tkankowych komórek macierzystych *in vivo* i *in vitro*. Biorąc pod uwagę interdyscyplinarny charakter dziedziny jaką jest medycyna regeneracyjna, zdobyłam nowe umiejętności i doświadczenie m.in. w technikach inżynierii tkankowej (3D) oraz nowoczesnej technice biofizycznej ECIS (ang. *Electric Cell-substrate Impedance Sensing*), polegającej na elektrycznym wykrywaniu impedancji komórek i substratów w czasie rzeczywistym. Uczestnictwo w licznych projektach naukowych z zespołami lekarzy różnych specjalizacji oraz grupami badawczymi z kilku Katedr na Uniwersytecie w Edynburgu pozwoliło mi na systematyczne pogłębianie wiedzy klinicznej oraz zdobycie szerokich umiejętności w zakresie biologii medycznej, biotechnologii i embriologii.

Jako stypendysta fundacji Edinburgh and Lothians Health Foundation, zajmowałam się poznaniem molekularnych mechanizmów upośledzenia procesów regeneracyjnych nabłonka rogówki oraz rozwoju metaplastji komórkowej. Wykazałam, iż długotrwałe biobankowanie ludzkich rogówek oka prowadzi do niedoboru (obumierania) limbalnych komórek macierzystych rąbka rogówki (ang. *Limbal Stem Cell, LSC*), upośledzenia ich potencjału regeneracyjnego oraz zmiany w profilu molekularnym terminalnie zróżnicowanych komórek nabłonka. Efektem tych zmian jest rozwój metaplastji komórkowej. Prace moje przyczyniły się także do identyfikacji nowego markera subpopulacji komórek *LSC*. Okazał się nim być gen *LGR5* (ang. *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*), będący czynnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie potencjału komórkowej macierzystości. Wskazana przeze mnie sekwencja ekspresji trzech genów *LGR5/P63 α /ABCG2* warunkowała obecność komórek o prawidłowym fenotypie oraz potencji ich

docelowego różnicowania w nabłonek rogówki, zapewniając tym samym ich kliniczną przydatność. Cykl eksperymentów różnicowania ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (ang. *human Embryonic Stem Cells, hESCs*) w kierunku nabłonka rogówki potwierdził istotną rolę *LGR5* w utrzymaniu funkcji samoodnowy i różnicowania generowanych komórek limbalnych. Model ten ujawnił także, iż rozwój metaplastyki komórkowej w warunkach stresu komórkowego jest wynikiem zahamowania aktywności transkrypcyjnej genu *P63a* (ang. *Protein Coding gene TP63*), którego upośledzenie prowadzi do transróżnicowania komórkowego lub apoptozy, zaburzając proces regeneracji (publikacje **P10** i **P11**).

Nabytą wiedzę i doświadczenie z zakresu prac z hESCs wykorzystałam także do opracowania zoptymalizowanych warunków hodowli komórek prapłciowych (ang. *primordial germ cells, PGC*), które naśladowały naturalne środowisko embrionalnych komórek rozrodczych. Badania te realizowałam w ramach projektu finansowanego przez Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) we współpracy z Roslin Institute w The Royal (Dick) School of Veterinary Studies na University of Edinburgh. Analiza szlaków sygnałowych wykazała, że w warunkach hodowli *in vitro* synergia aktywacji czynnika wzrostu FGF2 (ang. *Fibroblast Growth Factor*), insuliny i aktywiny A, jest czynnikiem niezbędnym do podtrzymania samoodnowy komórek PGC, jak również do zachowania potencji odpowiadającej embrionalnym komórkom rozrodczym. Badania te stanowiły podstawę dla opracowania strategii biobankowania i edycji genów pozyskiwanych komórek PGCs (publikacja **P12**).

Współpraca z Hepatology Laboratory w Centre for Liver and Digestive Disorders na University of Edinburgh, jak również aktywny udział w realizacji projektu finansowanego przez Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), stanowiły dla mnie doskonałą platformę rozwoju naukowego w zakresie zastosowania modeli *in vitro* w badaniach cytotoksyczności leków. Model do badań stanowiły opisane w pracy **H3** progenitorowe komórki HepaRG-P. Dynamikę hepatotoksycznego działania leków analizowałam wykorzystując pomiary impedancji małych sygnałów techniką ECIS. Umożliwiają one ocenę zmian strukturalnych i funkcjonalnych błony komórkowej, aktywności komórek, ich morfologii, adhezji i właściwości złącz międzykomórkowych typu *tight junction* w czasie rzeczywistym. Zdobyłam również doświadczenie w stosowaniu prototypowych podłoży polimerowych 2D zawierających nanocząstki NPS1 i NPS2, które znacząco przyczyniają się do zwiększenia funkcjonalnej aktywności zróżnicowanych komórek HepaRG. Wykonana przeze mnie kompleksowa analiza ekspresji genów charakteryzująca mechanizm cytotoksycznego działania hepatotoksyn oraz procesu różnicowania HepaRG-P została opisana w publikacjach **P13-P14**.

We współpracy z zespołem klinicznym z Centre for Liver and Digestive Disorders na University of Edinburgh uczestniczyłam aktywnie w realizacji klinicznego projektu EndoVESPA - H2020-ICT-24-2015 (GA: 688592), finansowanego przez Komisję Europejską. Cele badawcze tego projektu skupiały się na określeniu potencjalnych korzyści wynikających z zastosowania dwugłowicowych kapsuł endoskopowych w badaniach pacjentów zgłaszanych do oceny endoskopowej przewodu pokarmowego. Technologia endoskopii kapsułowej znajduje główne zastosowanie w ocenie patologii jelita cienkiego. W realizacji tego badania wykorzystana została moja wiedza z zakresu analizy biostatystycznej do opracowania uzyskanych danych klinicznych. Analizy te m.in. wykazały, że poziom trafności oceny diagnostycznej przy zastosowaniu kapsuł dwugłowicowych wzrósł o 14.7%. Od strony klinicznej wynik ten zapewniał znacząco lepszą

wykrywalność zmian patologicznych i miał bezpośredni wpływ na osiągnięcie bardziej skutecznych wyników leczenia (publikacja **P15**).

Efektorem prac prowadzonych na University of Edinburgh jest cykl **12** publikacji (**H1-H6** oraz **P10-P15**), **6** komunikatów oraz **4** prac opublikowanych jako materiały pokonferencyjne z numerem DOI.

Od grudnia 2018 roku rozpoczęłam pracę w projekcie BREATH (*Border and Regions Airways Training Hub*) w ramach konsorcjum INTERREG V-A United Kingdom-Ireland (Ireland-Northern Ireland-Scotland) na stanowisku koordynatora programu naukowego. Funkcja ta wymaga ode mnie doskonalenia umiejętności w nadzorowaniu wybranych zadań badawczych we współpracy z placówkami naukowymi stowarzyszonymi w projekcie BREATH. Problematyka prowadzonych przeze mnie badań własnych ma na celu stworzenie miniaturowych wersji organów *in vitro* (w tym przypadku: płuc), które będą mogły dostarczyć cennych informacji na temat mechanizmu współdziałania międzykomórkowego w procesach degeneracyjnych i regeneracyjnych organu, a także będą mogły przyczynić się do zrozumienia patogenezy w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (POChP). Inne kierunki realizowanych przeze mnie badań dotyczą mechanizmów starzenia się oraz mechanizmów modulacji epigenetycznej w procesie patogenezy POChP. Efektem dotychczasowych badań prowadzonych w projekcie BREATH są **3** komunikaty oraz **7** prac opublikowanych jako materiały pokonferencyjne z numerem DOI.

Program zakłada również rozwój nurtu badawczego, w którym będę mogła wykorzystać swoje dotychczasowe doświadczenia naukowe z badań nad atrofią mięśniową w analizach interakcji pomiędzy płucami, a peryferyjną tkanką mięśniową w patogenezie kacheksji związanej z POChP. Obecnie trwa proces rekrutacji pacjentów oraz gromadzenia materiału biologicznego.

We współpracy z zespołem naukowym lekarzy chirurgii ortopedycznej na University of Edinburgh, kontynuuję także badania nad procesami regeneracji mięśni. Celem tych długookresowych badań klinicznych jest ocena aktywności i funkcji mięśniowych komórek macierzystych jako jednego z czynników wpływających na odzyskanie sprawności ruchowej u starszych osób po przebytej operacji stawu kolanowego. Prowadzone przeze mnie analizy dotyczą identyfikacji czynników demograficznych (wśród nich: aktywność ruchowa przed operacją, BMI, palenie tytoniu, spożycie alkoholu oraz przyjmowanie niesterydowych leków przeciwzapalnych). W korelacji ze zmianami molekularnymi zachodzącymi w mięśniu szkieletowym (np. procesy prozapalne i procesy starzenia się) mają one wpływ na aktywność komórek satelitarnych oraz na przebieg procesów regeneracyjnych w mięśniu szkieletowym. Badania te mogą dostarczać ważnych informacji dotyczących rokowań pacjenta, a ich rezultaty przygotowywane są obecnie do 2 publikacji oraz 2 prezentacji konferencyjnych.

Poniżej prezentuję zestawienie prac dokumentujących moje osiągnięcia naukowo - badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

(i) Zestawienie artykułów naukowych (bez publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego). Dane dotyczące wskaźników IF pochodzą z Journal Citation Reports z bazy Clarivate (<https://jcr.clarivate.com/>).

- P1** **Brzeszczyńska J.**[#] Pieniążek A, Gwoździński Ł, Gwoździński K, Jegier A. (2008). Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 33 (6):1223-1231. **IF₂₀₀₈:1,591, IF₂₀₂₀:2,665, 70 pkt MNiSW**
- P2** Marciniak A, **Brzeszczyńska J.**, Gwoździński K, Jegier A. (2009). Antioxidant capacity and physical exercise. *Biology of Sport*. 26 (3):198-213. **IF₂₀₀₉:0,113, IF₂₀₂₀:2,806, 70 pkt MNiSW**

- P3** Gwoździński K, Pieniążek A, **Brzeszczyńska J**, Tabaczar S, Jegier A. (2013). Alterations in red blood cells and plasma properties after acute single bout of exercise. *The Scientific World Journal*. 2013:168376. **IF₂₀₁₃:1,219, 70 pkt MNiSW**
- P4** Gwoździński K, Pieniążek A, Tabaczar S, Jegier A, **Brzeszczyńska J**. (2017). Investigation of oxidative stress parameters in different lifespan erythrocyte fractions in young untrained men after acute exercise. *Experimental Physiology*. 102 (2):190-20. **IF₂₀₁₇:2.732, IF₂₀₂₀:2,969, 70 pkt MNiSW**
- P5** Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki, L. (2016). Cardiac rehabilitation improves the blood plasma properties of cardiac patients. *Experimental Biology and Medicine*. 241 (17):1997-2006. **IF₂₀₁₆:2,688, IF₂₀₂₀:2,691, 70 pkt MNiSW**
- P6** Gwoździński K, Pieniążek A, Bernasińska-Słomczewska J, **Brzeszczyńska J**, Irzmański R, Jegier A. (2020). Alterations in the Properties of Red Blood Cells in Men with Coronary Artery Diseases after Comprehensive Cardiac Rehabilitation. *Cardiol Res Pract*. 2020:6478785. **IF₂₀₂₀:1,866, 100 pkt MNiSW**
- P7** **Brzeszczyńska J**,[#] Luciak M, Gwoździński, K. (2008). Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress. *Free Radical Research*. 42 (1):40-48. **IF₂₀₀₈:2,826, IF₂₀₂₀:4,148, 70 pkt MNiSW**
- P8** **Brzeszczyńska J**,[#] Gwoździński K. (2008). Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components. *Cell Biology International*. 32 (1):114-120. **IF₂₀₀₈:1,619, IF₂₀₂₀:3,612, 70 pkt MNiSW**
- P9** Pieniążek A, **Brzeszczyńska J**,[#] Kruszyńska I, Gwoździński K. (2009). Investigation of albumin properties in patients with chronic renal failure. *Free Radical Research*. 43 (10):1008-1018. **IF₂₀₀₉:2,215, IF₂₀₂₀:4,148, 70 pkt MNiSW**
- P10** **Brzeszczyńska J**, Ramaesh K, Dhillon B, Ross JA. (2012). Molecular profile of organ culture-stored corneal epithelium: LGR5 is a potential new phenotypic marker of residual human corneal limbal epithelial stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 29 (5):871-876. **IF₂₀₁₂:2,13, IF₂₀₂₀:4,101, 70 pkt MNiSW**
- P11** **Brzeszczyńska J**, Samuel K, Greenhough S, Ramaesh K, Dhillon B, Hay DC, Ross JA. (2014). Differentiation and molecular profiling of human embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 33 (6):1597-606. **IF₂₀₁₄:2,53, IF₂₀₂₀:4,101, 70 pkt MNiSW**
- P12** Whyte J, Glover JD, Woodcock M, **Brzeszczyńska J**, Taylor L, Sherman A, Kaiser P, McGrew MJ. (2015). FGF, insulin, and SMAD signalling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem Cell Reports*, 5 (6):1171-1182. **IF₂₀₁₅:8,01, IF₂₀₂₀:7,765, 140 pkt MNiSW**
- P13** Morgan K, Martucci N, Kozłowska A, Gamal W, Brzeszczyński F, Treskes P, Samuel K, Hayes P, Nelson L, Bagnaninchi P, **Brzeszczyńska J**, Plevris J. (2019). Chlorpromazine toxicity is associated with disruption of cell membrane integrity and initiation of a pro-inflammatory response in the HepaRG hepatic cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111:1408-1416. **IF₂₀₁₉:4,545, IF₂₀₂₀:6,529, 100 pkt MNiSW**
- P14** Morgan K, Bryans A, Brzeszczyński F, Samuel K, Treskes P, **Brzeszczyńska J**, Morley S, Nelson, Hayes P. (2020). Oxygen plasma-treated substrates and specific nanopattern promote early differentiation and function of HepaRG progenitor cells. *Tissue Eng Part A*. 26 (19-20): 1064-1076. **IF₂₀₂₀:3,845, 140 pkt MNiSW**
- P15** Yung DE, Robertson AR, Davie M, Sidhu R, McAlindon M, Rahman I, Patel P, Sinha L, Mason S, **Brzeszczyńska J**, Douglas S, Plevris JN, Koulaouzidis A. (2021). Double-headed small-bowel capsule endoscopy: Real-world experience from a multi-centre British study. *Digestive and Liver Disease*. 53 (4):461-466. **IF₂₀₂₀:4,088, 100 pkt MNiSW**

[#] Autor korespondencyjny.

(ii) Zestawienie dorobku naukowego w postaci prac opublikowanych w czasopismach jako materiały z konferencji międzynarodowych (posiadających numer DOI).

1. Gwoździński K, Pieniążek A, **Brzezczńska J**, Jegier A. (2009). Changes of the RBC internal viscosity and erythrocyte membrane properties after single exercise bout. p. 90. In: Abstracts from Europe Meeting 2009 of the Society for Free Radicals Research. *Free Radical Research*, 43 (8):697-782. DOI:10.1080/10715760802207914 **IF₂₀₁₂:3,279, IF₂₀₂₀:4,148, 70 pkt MNiSW**
2. Glover J, Whyte J, **Brzezczńska J**, Taylor L, Sang HM, McGrew MJ. (2014). Culturing avian primordial germ cells and novel transposon vectors for transgenesis, p. 193. In: Abstracts from the UC Davis Transgenic Animal Research Conference IX. *Transgenic Research*, 23 (1):187-210. DOI: doi.org/10.1007/s11248-013-9761-0 **IF₂₀₁₂:2,322, IF₂₀₂₀:2,788, 70 pkt MNiSW**
3. **Brzezczńska J**, Morgan K, Brzezczński F, Samuel K, Hayes P, Plevris J. (2018). Towards understanding the mechanisms of chlorpromazine-induced hepatic toxicity using a human HepaRG-based mode, S141. In: The International Liver Congress 2018 Abstract Book. *Journal of Hepatology*, 68(1):S1-S926. DOI: 10.1016/S0168-8278(18)30498-7 **IF₂₀₁₈:18,946, IF₂₀₂₀:25,083, 200 pkt MNiSW**
4. Yung D, **Brzezczńska J**, Rahman I, Sinha L, Sidhu R, Patel P, Mason S. (2019). PTU-128 Double-headed capsule endoscopy: real-world experience from a multicentre British study, p. A58-A59. In: *Gut*, 68 (2): A1-A269. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-BSGAbstracts.117 **IF₂₀₁₉:18,819, IF₂₀₂₀:23,059, 200 pkt MNiSW**
5. Yung D, Douglas S, **Brzezczńska J**, Plevris JN, Koulaouzidis A. (2019). Double-headed small bowel capsule endoscopy: real-world experience at a tertiary referral centre, p.S9. In: *Endoscopy*, 51 (4). DOI: 10.1055/s-0039-1681195 **IF₂₀₁₉:7,341, IF₂₀₂₀:10,093, 140 pkt MNiSW**
6. Bailo M, Dunning L, **Brzezczńska J**, McIntosh K, Plevin R, Martin SL, Sergeant GP, Goodyear CS, Litherland GJ, Lockhart JC, Crilly A. (2019). Reduction of inflammatory cytokine production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) epithelial cells by protease activated receptor 2 (PAR2) antagonism, p. A62-A63. In: *Thorax*, 74 (Suppl 2): A1-A262. DOI: 10.1136/thorax-2019-BTSabstracts2019.106 **IF₂₀₁₉:10,844, IF₂₀₂₀:9,139, 140 pkt MNiSW**
7. McCallum K, Dunning L, McGarvey L, Hollywood M, **Brzezczńska J**, Crilly A, Lockhart JC, Litherland GJ. (2019). Proteinase activated receptor-2 induced autophagy dysregulation, p. A49. In: *Thorax*, 74 (Suppl 2): A1-A262. DOI: 10.1136/thorax-2019-BTSabstracts2019.81 **IF₂₀₁₉:10,844, IF₂₀₂₀:9,139, 140 pkt MNiSW**
8. Bailo M, Dunning L, **Brzezczńska J**, McIntosh K, Plevin R, Martin SL, Sergeant GP, Goodyear CS, Litherland GS, Lockhart JC, Crilly A. (2020). Protease activated receptor 2 (PAR2) antagonism reduces pro-inflammatory cytokine production in bronchial epithelial cells. In: *European Respiratory Journal*, 56(64): 2292; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.2292 **IF₂₀₂₀:16,671, 200 pkt MNiSW**
9. Tarhini F, Dunning L, Crilly A, **Brzezczńska J**, McGarvey L, Thornbury K, Goodyear CS, Lockhart JC, Litherland GJ. (2020). Repeated exposure to hydrogen peroxide enhances TGF- β and LPS dependent inflammatory responses in BEAS-2B cells. In: *European Respiratory Journal*, 56(64): 607; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.607 **IF₂₀₂₀:16,671, 200 pkt MNiSW**
10. McCallum K, Dunning L, McGarvey L, Hollywood M, **Brzezczńska J**, Goodyear C, Lockhart J, Crilly A, Litherland G. (2020). Regulation of lung autophagy by proteinase-activated receptor 2 activation. In: *European Respiratory Journal*, 6:75; DOI: 10.1183/23120541.LSC-2020.75 **IF₂₀₂₀:16,671, 200 pkt MNiSW**
11. Black K, Mackenzie A, Dunning L, Crilly A, **Brzezczńska J**, McGarvey L, Thornbury K, Goodyear CS, Lockhart JC, Litherland GJ. (2020). Murine airway bronchodilation via Proteinase Activated Receptor 2. In: *European Respiratory Journal*, 56 (64):1895; DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.1895 **IF₂₀₂₀:16,671, 200 pkt MNiSW**

12. Tarhini F, Crilly A, **Brzeszczyńska J**, McGarvey L, Thornbury K, Goodyear CS, Lockhart JC, GJ Litherland GJ. (2021). S50 Oxidative stress driven inflammatory responses in lung epithelial cells. In: *Thorax*, 76 (1): A31; DOI:10.1136/thorax-2020-BTSabstracts.55 **IF₂₀₂₀:9,139, 140 pkt MNiSW**

(iii) Zestawienie dorobku naukowego w postaci doniesień konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym.

1. Pieniążek A, **Brzeszczyńska J**, Gwoździński K. Contradictory effects of carbamylation and oxidative damage on membrane proteins in human red blood cells. 11th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (16-20 lipiec, 2002), Paryż, Francja.
2. Pieniążek A, **Brzeszczyńska J**, Gwoździński K. Comparison of carbamylation and oxidative damage in membrane proteins in human red blood cells. 11th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (16-20 lipiec, 2002), Paryż, Francja.
3. **Brzeszczyńska J**, Gwoździński K. Effect of nitric oxide on the internal components of erythrocytes. 13th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, (15-19 sierpień, 2006), Davos, Szwajcaria.
4. **Brzeszczyńska J**, Pieniążek A, Jegier A, Gwoździński K. Investigation of oxidative changes in human blood plasma after single bout of exercise in healthy and untrained subjects. Meeting of the Society for Free Radical Research Europe (5-9 lipiec, 2008), Berlin, Niemcy.
5. **Brzeszczyńska J**, Ross JA. A robust human satellite cell culture system for the study of microRNA regulation of myoblast differentiation. International Conference of Muscle Wasting - Molecular Mechanisms of muscle growth and wasting in health and disease. (18-23 wrzesień, 2011), Ascona, Szwajcaria.
6. **Brzeszczyńska J**, Ramaesh K, Dhillon B, Ross JA. Molecular profile of organ culture-stored corneal limbal epithelium: implications for *ex vivo* expansion of stem cells. 4th Limbal Stem Cell Meeting (23 wrzesień, 2011), Nottingham, Wielka Brytania.
7. Gwoździński K, Pieniążek A, **Brzeszczyńska J**, Tabaczar S, Jegier A. Oxidative Stress Parameters in Erythrocyte Fractions of Different Life Span After Single Exercise Bout in Young Untrained Man. 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) (14-18 listopad, 2012), San Diego, CA, USA.
8. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A. Changes in properties of red blood cells after single exercise bout in type 2 diabetes mellitus patients. Protein Society, 3rd Diabetes Summit (29-30 kwiecień, 2013), Boston, MA, USA.
9. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki L, Irzmański R. Changes in properties of red blood cells after single exercise bout before and after cardiac rehabilitation. 10th International Congress on Coronary artery disease (13-16 październik, 2013), Florencja, Włochy.
10. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki L, Irzmański R. Cardiac rehabilitation induce changes in blood plasma properties of ischemic heart disease patients. Oxygen Club of California-Oxidants and Antioxidants in Biology (7-10 maj, 2014), Davis, CA, USA.
11. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki L, Irzmański R. Cardiac rehabilitation induces changes in blood plasma properties of ischemic heart disease patients. 8th International Society of Antioxidants In Nutrition and Health Congress (5-6 czerwiec, 2014), Lizbona, Portugalia.
12. Jacobi C, **Brzeszczyńska J**, Johns N, Degen S, Degen M, Schilb A, Hatakeyama S, Glass D, Roubenoff R, Greig A, Ross JA, Fearon KCH. Distinct age-related muscle wasting pathways are activated in samples of human cancer cachexia patients. The 2nd Cancer Cachexia Conference (26-28 wrzesień, 2014), Montreal, Kanada.

13. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki L, Irzmański R. Alterations in erythrocyte internal components induced by cardiac rehabilitation. European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation (14-16 maj, 2015), Lizbona, Portugalia.
14. Gwoździński K, Pieniążek A, Czepas J, **Brzeszczyńska J**, Jegier A, Pawlicki L, Irzmański R. The influence of cardiac rehabilitation on the properties of blood plasma of patients with ischemia heart disease. Oxygen Club of California World Congress (24-26 czerwiec, 2015), Walencja, Hiszpania.
15. Morgan K, Brzeszczyński F, **Brzeszczyńska J**, Mabbott M, Reynolds P, Anderson G, Morley S, Plevris J, Hayes P, Gadegaard N, Nelson LJ. Nanotopographical features influence derivation and selection of reference genes for progenitor cell differentiation protocols. TERMIS-EU 2017 Conference (26-30 czerwiec, 2017), Davos, Szwajcaria.
16. Morgan K, Martucci N, Kozłowska A, Gamal W, Brzeszczyński F, Samuel K, Treskes P, Hayes P, Nelson LJ, Bagninichi, P, **Brzeszczyńska J** and Plevris J. Chlorpromazine effect on the structural integrity of hepatic cell membrane in human HepaRG cells. IBCA Conference (6-8 czerwiec, 2018), Edynburg, Wielka Brytania.
17. Morgan K, Martucci N, Kozłowska A, Gamal W, Brzeszczyński F, Samuel K, Treskes P, Hayes P, Nelson LJ, Bagninichi, P, **Brzeszczyńska J** and Plevris J. Chlorpromazine disrupts structural integrity of hepatic cell membranes in human HepaRG cells and initiates a pro-inflammatory response. BASL 2018 Annual Meeting (18-21 wrzesień, 2018), York, Wielka Brytania.
18. Bailo M, Dunning L, **Brzeszczyńska J**, Martin SL, Sergeant GP, Goodyear CS, Litherland GJ, Lockhart JC, Crilly A. Understanding PAR2 matriptase ENaC crosstalk in the lung: implications for COPD. Irish Thoracic Society Annual Scientific Meeting (21-23 listopad, 2019), Galway, Irlandia.
19. Black K, MacKenzie A, Dunning L, Crilly A, **Brzeszczyńska J**, McGarvey L, Thornbury K, Goodyear CS, Lockhart JC, Litherland GJ. (2019). Enhanced airway smooth muscle relaxation via proteinase activated receptor 2. Irish Thoracic Society Annual Scientific Meeting (21-23 listopad, 2019), Galway, Irlandia.
20. McCallum K, Dunning L, McGarvey L, Hollywood M, Goodyear CS, **Brzeszczyńska J**, Crilly A, Lockhart JC, Litherland GJ. (2019). Proteinase activated receptor 2 modulates expression of autophagy markers in murine lungs. Irish Thoracic Society Annual Scientific Meeting (21-23 listopad, 2019), Galway, Irlandia.
21. Brzeszczyński F, **Brzeszczyńska J**. (2021). The role of pre-operative sarcopenia in emergency laparotomy setting: A systematic review. TMS International Junior Doctors' Conference for Aspiring Surgeons (26 czerwiec, 2021), Londyn, Wielka Brytania (konferencja w trybie on-line).
22. Brzeszczyński F, **Brzeszczyńska J**. (2021). A Systematic Review on the Role of Preoperative Sarcopenia Detection in Emergency Laparotomy Surgery. 8th International Congress of the World Society of Emergency Surgery (7-10 wrzesień, 2021), Edynburg, Wielka Brytania (konferencja w trybie on-line).

5.3. Podsumowanie dorobku naukowego oraz wskaźniki bibliometryczne

Mój dorobek naukowy obejmuje 25 prac eksperymentalnych i przeglądowych opublikowanych w okresach przed i po doktoracie oraz 42 doniesienia zjazdowe.

Po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam 21 prace naukowe o zasięgu międzynarodowym w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR).

Moje osiągnięcie naukowe, zgłoszone do oceny w postępowaniu habilitacyjnym, składa się z 6 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR. W 4 z nich jestem pierwszym autorem, a w 2 artykułach dodatkowo pełnię rolę autora korespondencyjnego.

Sumaryczna wartość współczynników oddziaływania Impact Factor (IF) zgodna z rokiem opublikowania 21 prac po doktoracie wynosi 76,253, a jego aktualna wartość to 94,385 (2030 pkt MNiSW).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) zgodny z rokiem opublikowania 6 publikacji, wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego równy jest 34,236, natomiast jego aktualna wartość wynosi 39,051 (750 pkt MNiSW).

Łączna liczba cytowań moich prac wynosi 301 (wg. bazy naukowej ISI *Web of Science Core Collection*), a Indeks Hirscha (h-index) ma wartość 10. Natomiast wg. bazy *Scopus*, sumaryczna liczba cytowań jest na poziomie 312, a h-index wynosi 11.

Szczegółowe dane bibliometryczne przedstawiono poniżej w Tabeli 3. Natomiast dane bibliometryczne dla innych moich prac posiadających numer DOI, opublikowanych w czasopiśmie jako materiały z konferencji międzynarodowych, prezentuje Tabela 4.

Tabela 3. Podsumowanie danych bibliometrycznych dla prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora.

Wszystkie prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora	
Liczba opublikowanych prac w czasopiśmie z listy JCR	21
Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji	76,253
Aktualna sumaryczna wartość IF (z roku 2020)	94,385
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	2030 pkt
Całkowita liczba cytowań (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	301
Liczba cytowań bez autocytowań (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	278
Całkowita liczba cytowań (wg. bazy <i>Scopus</i>)	312
Liczba cytowań bez autocytowań (wg. bazy <i>Scopus</i>)	290
Indeks Hirsha (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	10
Indeks Hirsha (wg. bazy <i>Scopus</i>)	11
Prace stanowiące podstawę osiągnięcia naukowego	
Liczba opublikowanych prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego	6
Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji	34,236
Aktualna sumaryczna wartość IF (z roku 2020)	39,051
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	750 pkt
Liczba cytowań (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	103
Liczba cytowań bez autocytowań (wg. bazy <i>Web of Science</i>)	96
Liczba cytowań (wg. bazy <i>Scopus</i>)	105
Liczba cytowań bez autocytowań (wg. bazy <i>Scopus</i>)	99

Tabela 4. Podsumowanie danych bibliometrycznych dla prac posiadających numer DOI, opublikowanych w czasopiśmie jako materiały z konferencji międzynarodowych.

Prace opublikowane w czasopiśmie jako materiały z konferencji międzynarodowych	
Liczba opublikowanych prac w czasopiśmie z listy JCR	12
Sumaryczna wartość IF zgodnie z rokiem publikacji	148,218
Aktualna sumaryczna wartość IF (z roku 2020)	159,272
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	1900 pkt

Moje publikacje, wchodzące w skład osiągnięcia zgłoszonego we wniosku habilitacyjnym (publikacje **H1-H6** z Tabeli 1), cytowane były wielokrotnie w innych pracach opublikowanych

w prestiżowych czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR) o wysokich współczynnikach oddziaływania IF oraz wysokiej liczbie punktów MNiSW. Na przykład, publikacje **H1** oraz **H2** cytowane były m.in. w pracach opublikowanych w czasopiśmie *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* (IF₂₀₂₀:12,910, 200 pkt MNiSW):

- Van de Worp i in. (2020). Identification of microRNAs in skeletal muscle associated with lung cancer cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 11:452-463.
- Alyodawi i in. (2019). Compression of morbidity in a progeroid mouse model through the attenuation of myostatin/activin signalling. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 10:662-686.
- Riuzzi i in. (2018). Cellular and molecular mechanisms of sarcopenia: the S100B perspective. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 9:1255-1268.

Natomiast publikacje **H5** oraz **H6** cytowane były m.in. w artykułach opublikowanych w czasopismach *Physiological Reviews* (IF₂₀₂₀:37,312, 200 pkt MNiSW), *Hepatology* (IF₂₀₂₀:17,425, 200 pkt MNiSW) i *Biomaterials* (IF₂₀₂₀:12,479, 200 pkt MNiSW):

- Karagiannis i in. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*. 99(1):79-114.
- Goldring i in. (2017). Stem cell-derived models to improve mechanistic understanding and prediction of human drug-induced liver injury. *Hepatology*. 65: 710-721.
- Gyunggyu i in. (2021). Generation of uniform liver spheroids from human pluripotent stem cells for imaging-based drug toxicity analysis. *Biomaterials*. 269: 120529.

5.4. Współpraca z ośrodkami międzynarodowymi w zakresie prowadzonych projektów naukowych

Tematyka mojej działalności naukowej, obejmująca kilka kierunków badań, umożliwiła mi nawiązanie kilkuletniej współpracy z wieloma renomowanymi jednostkami badawczymi i realizowanie wspólnych badań naukowych w zakresie:

(i) Fizjologii wysiłku fizycznego:

- Katedra Medycyny Sportowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi - prof. dr hab. Anna Jegier.

(ii) Aktywności komórek satelitarnych w atrofii mięśniowej:

- Division of Health Sciences (Department of Clinical Surgery), Royal Infirmary of Edinburgh, University of Edinburgh, Wielka Brytania - prof. Kenneth Fearon
- Division of Health Sciences (Department of Orthopaedics and Trauma), Royal Infirmary of Edinburgh, University of Edinburgh, Wielka Brytania - prof. Hamish Simpson
- Harvard Medical School and Harvard Stem Cell Institute, Harvard University, Boston, MA, USA - dr David Glass
- Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR), Bazylea, Szwajcaria - prof. Ronenn Roubenoff i dr Carsten Jacobi
- School of Sport, Exercise and Rehabilitation Sciences, University of Birmingham, Wielka Brytania - prof. Carolyn Greig
- NUTRIM School of Nutrition and Translational Research in Metabolism, Maastricht University, Holandia - prof. Annemie Schols.

(iii) Limbalnych komórek macierzystych:

- Tennent Institute of Ophthalmology, Gartnavel General Hospital, Glasgow, Wielka Brytania - dr Kanna Ramaesh

- SNBTS Cellular Therapy Group, MRC Centre for Regenerative Medicine, Edynburg, Wielka Brytania - Mrs. Kay Samuel.
- (iv) Reprogramowania i różnicowania iPSCs:
 - Peking University Institute of Hematology, Peking University People's Hospital, Pekin w Chinach - dr Jing Liu
 - SNBTS Cellular Therapy Group, MRC Centre for Regenerative Medicine, Edynburg, Wielka Brytania - Mrs. Kay Samuel.
- (v) Biotechnologii i inżynierii tkankowej:
 - Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Biberach an der Riss, Niemcy - dr Mario Beilmann
 - Bioreactor Group, Charité-Universitätsmedizin Berlin (szpital uniwersytecki afiliowany przy Humboldt University oraz Free University Berlin), Berlin, Niemcy - dr Katrin Zeilinger.
- (vi) Aplikacji komórek macierzystych w badaniach hepatocytotoksyczności lekowej:
 - Centre for Liver and Digestive Disorders, Hepatology Laboratory, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania - prof. John Plevris i prof. Peter Hayes.
- (vii) Embriologii:
 - Roslin Institute w The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania - dr Mike McGrew.
- (viii) Procesów regeneracyjnych płuc oraz rozwoju kacheksji w POChP:
 - School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences, Queen's University Belfast (QUB), Belfast, Wielka Brytania - dr Fionnuala Lundy
 - Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania - dr Elaine Emmerson.

5.5. Udział w projektach badawczych

Moje prace naukowo-badawcze obejmują łącznie 11 projektów, w tym stanowią część trzech dużych europejskich programów w obszarze medycyny regeneracyjnej i translacyjnej: (1) StemBANCC IMI Collaborative Project (www.stembancc.org); (2) EndoVESPA (www.endoo-project.eu) oraz (3) BREATH Border Regions Airways Training Hub (www.breath-copd.org), w których pełniłam wiodącą rolę i byłam odpowiedzialna za realizację poszczególnych etapów badań.

Wykaz projektów badawczych

- | | |
|------------------|---|
| 2006-2007 | Kierownik projektu British-Polish Young Scientists Programme przyznanego przez British Council, grant nr. WAR/341/51 - „ <i>Exercise-induced changes in erythrocytes membrane function and structure studied by spin-label EPR</i> ” - School of Life Sciences (SLS), Heriot-Watt University, Wielka Brytania; Uniwersytet Łódzki; Uniwersytet Medyczny w Łodzi. |
| 2007-2010 | Główny wykonawca grantu badawczego MNiSW, grant nr. N 404 10L7 33 - „ <i>Czy próby wysiłkowe mogą indukować zmiany w strukturze erytrocytów oraz w wybranych parametrach osocza człowieka</i> ” - Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki. |
| 2009-2011 | Główny wykonawca grantu badawczego przyznanego przez Edinburgh and Lothians Health Foundation - „ <i>Corneal limbal stem cells and differentiation: Molecular profile of human embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells</i> ” - Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania. |

- 2010-2014** **Główny wykonawca grantu badawczego MNiSW, grant nr. N 404 1784 40 - „Wpływ próby wysiłkowej na zmiany w strukturze erytrocytów oraz wybranych parametrów osocza krwi u mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca poddanych rehabilitacji kardiologicznej”** - Katedra Biofizyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki.
- 2010-2012** **Kierownik projektu w ramach programu The Daphne Jackson Trust finansowanego przez The Leverhulme Trust - „Satellite stem cells role in muscle pathophysiology of cancer cachexia”** - Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2012-2013** **Wykonawca grantu Institute Strategic Grants BB/J004316/1, BB/J004219/1 przyznanego przez Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) - „Culturing avian primordial germ cells and novel transposon vectors for transgenesis”** - Roslin Institute, The Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2013-2015** **Główny wykonawca grantu badawczego przyznanego przez Dr Hadwen Trust - „A scalable system for the production of human induced pluripotent cell (hiPSC)-derived, functionally-mature hepatocytes for replacement of animal toxicology testing”** - Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2014-2017** **Główny wykonawca grantu badawczego w ramach StemBANCC (IMI, EFPIA) Collaborative Project - “Stem cells for biological assays of novel drugs and predictive toxicology” oraz kierownik zadania badawczego pt. “Functional characterisation of iPSCs derived hepatocytes”** - Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2015-2016** **Główny wykonawca grantu Research Grant BB/L023687/1 przyznanego przez Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) - „Nanopatterned Human Liver BioChips for Drug Hepatotoxicity Screening”** - Centre for Liver and Digestive Disorders, Hepatology Laboratory, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2017-2018** **Wykonawca grantu EndoVESPA European grant (H2020-ICT-24-2015 (GA: 688592)) - „Endoscopic Versatile robotic guidancE, diagnoSis and theraPy of magnetic-driven soft-tethered endoluminal robots (EndoVESPA)”** - Centre for Liver and Digestive Disorders, Hepatology Laboratory, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2018-2021** **Koordynator projektu edukacyjno-naukowego BREATH (Border and Regions Airways Training Hub) przyznanego przez Europejski program badawczy w ramach INTERREG V-A INTERREG V-A United Kingdom-Ireland (Ireland-Northern Ireland-Scotland) - Institute of Biomedical and Environmental Science (IBEHR), University of the West of Scotland, Wielka Brytania.**

5.6. Nagrody

Prowadzone przeze mnie badania w ramach 5 z 11 projektów badawczych wymienionych powyżej w sekcji 5.5. zostały zrealizowane dzięki nagrodom i stypendiom naukowym (Fellowships), przyznanym mi w drodze konkursów.

Lista nagród i stypendiów

- 2006** **Nagroda British Council dla młodych naukowców (British-Polish Young Scientists Programme) na rozwój współpracy międzynarodowej.**
- 2009** **Stypendium naukowe Edinburgh and Lothians Health Foundation na prowadzenie badań własnych w Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.**
- 2010** **Stypendium naukowe The Daphne Jackson Trust finansowane przez The Leverhulme Trust na prowadzenie badań własnych w Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.**

- 2013** **Stypendium naukowe otrzymane z fundacji Dr Hadwen Trust** na prowadzenie badań własnych w Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.
- 2014** **Stypendium naukowe konsorcjum StemBANCC (IMI, EFPIA) Collaborative Project** na prowadzenie badań własnych w Medical Research Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Wielka Brytania.

Dokumenty potwierdzające uczestnictwo w powyższych projektach badawczych oraz uzyskane nagrody opisane w sekcjach 5.5 i 5.6 znajdują się w Załączniku 6.

5.7. Informacja o wystąpieniach na międzynarodowych konferencjach naukowych z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie oraz przewodniczenie sesji na konferencjach naukowych i udział w komitetach organizacyjnych

Wystąpienia na międzynarodowych konferencjach naukowych

- 2008** *“Structural alterations of erythrocyte membrane components induced by exhaustive exercise”*, 1st Annual Research Conference of the Scottish Universities Sports Related Academic Group (SUSRAG). A Showcase of Sport and Exercise Research in Scotland (14 kwietnia, 2008), Dundee, Wielka Brytania (**prezentacja ustna**).
- 2014** *“Myogenesis in cancer cachexia”*, Edinburgh Muscle Meeting, Royal Infirmary Hospital, Department of Clinical Surgery (13-14 styczeń, 2014), Edynburg, Wielka Brytania. (**wykład plenarny**)
- 2014** *“iPSCs models in drug safety”*. StemBANCC Annual Meeting (15-17 kwietnia, 2014), Lubeka, Niemcy (**prezentacja ustna**).
- 2015** *“Aging/sarcopenia: in vitro and biopsy data”*, Edinburgh Muscle Meeting, Royal Infirmary Hospital, Department of Clinical Surgery (11-12 lutego, 2015), Edynburg, Wielka Brytania (**wykład plenarny**).
- 2015** *“Phenotypic and functional analysis indicate that iPSCs cell-derived hepatocyte-like cells have foetal rather than adult characteristics”*. StemBANCC Annual Meeting (21-23 września, 2015), Kopenhaga, Dania (**prezentacja ustna**).
- 2019** *“An overview of the technical capabilities across BREATH”*. BREATH Annual Conference, Queens University Belfast (QUB) (19-21 czerwca, 2019), Belfast, Wielka Brytania (**wykład plenarny**).
- 2021** *“The Effect of Sarcopenia on Outcomes Following Orthopaedic Surgery: A Systematic Review”*. British Orthopaedic Research Society (BORS) Meeting 2021 (13-14 wrzesień, 2021), Edynburg, Wielka Brytania (artykuł przyjęty do **prezentacji ustnej**).

Wykłady wygłoszone na zaproszenie

- 2013** *“Molecular profiles of organ culture-stored corneal limbal epithelium: Implications for ex vivo expansion of stem cells”*, Research Seminar, Roslin Institute, The Royal (Dick) School of Veterinary Studies (15 kwietnia, 2013), Edynburg, Wielka Brytania.
- 2014** *“Pancreatic cancer and muscle loss”*, Cancer Research UK Meeting, Royal Infirmary Hospital, Department of Clinical Surgery (12 lutego, 2014), Edynburg, Wielka Brytania.
- 2015** *“Loss of oxidative defense and potential blockade of satellite cell maturation in the skeletal muscle of patients with cancer but not healthy elderly”*, Research Seminar, Genomics Institute of the Novartis Research Foundation (20 lipca, 2015), San Diego, CA, USA.
- 2020** *“Quantitative Real-Time PCR application”*, BREATH INTERREG Virtual Workshop (9 czerwca, 2020), Glasgow, Wielka Brytania.

Przewodniczenie sesji na konferencjach naukowych i udział w komitetach organizacyjnych

- 2014** Edinburgh Muscle Meeting, Royal Infirmary Hospital, Department of Clinical Surgery (13-14 stycznia, 2014), Edynburg, Wielka Brytania – **Członek Komitetu Organizacyjnego**.

- 2019** BREATH Annual Conference (19-21 czerwca, 2019), Queens University Belfast (QUB), Belfast, Wielka Brytania – **Przewodnicząca Sesji Naukowej.**
- 2020** BREATH Virtual Conference (15-17 czerwca, 2020), University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania – **Przewodnicząca Sesji Naukowej.**
- 2021** BREATH Virtual Conference (21-23 czerwca, 2021), Dundalk Institute of Technology (DIT), Dundalk, Irlandia – **Przewodnicząca Sesji Naukowej.**

5.8. Członkostwo w komitetach redakcyjnych czasopism oraz informacja o recenzowaniu artykułów naukowych

Jestem członkiem komitetu redakcyjnego czasopisma *Bone & Joint Research* z listy JCR (IF₂₀₂₀:5,853, 100 pkt MNiSW), w którym pełnię funkcję *Specialty Editor* jako redaktora odpowiedzialnego za prace dotyczące komórek macierzystych, atrofii mięśniowej oraz miRNA.

Wykonałam recenzje artykułów dla czasopism naukowych o zasięgu międzynarodowym, m.in. dla: *Bone & Joint Research*, *Journal of Functional Biomaterials*, *Bioengineering*, *Journal of Cell Science*, *Genetics and Molecular Biology*, *Applied Sciences*, *Gastroenterology Research and Practice*, *Free Radical Research*, *Acta Pharmacologica Sinica* oraz *Acta Physiologica*.

5.9. Członkostwo w towarzystwach naukowych

Obecnie jestem członkiem następujących towarzystw naukowych:

- Polskie Towarzystwo Biochemiczne (PTBioch)
- Federation of European Biochemical Societies (FEBS)
- Polskie Towarzystwo Biofizyczne (PTBF)
- European Biophysical Societies' Association (EBSA)
- European Respiratory Society (ERS)
- British Association for Lung Research (BALR)
- Daphne Jackson Fellows Association

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

6.1. Działalność dydaktyczna

6.1.1. Działalność dydaktyczna na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ⁴

- 1995-2000** Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotów: „Podstawy statystyki” i „Biofizyka” dla studentów I roku studiów na kierunku Biologia oraz „Biochemia kliniczna” dla studentów III roku studiów na kierunku Biologia.
- 2009-obecnie** Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotu „Pracownia specjalistyczna II stopnia” dla studentów I roku studiów II stopnia (magisterskich) na kierunku Biotechnologia.⁵ Do programu tego przedmiotu wprowadziłam po raz pierwszy na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska nowe specjalistyczne zajęcia teoretyczne i praktyczne z zakresu technologii komórek macierzystych oraz analiz molekularnych. Zajęcia te są bardzo wysoko oceniane przez studentów.

⁴ Ograniczenia, wynikające z wymiaru godzin dydaktycznych dla nauczycieli akademickich zatrudnionych na 1/4 etacie adiunkta (57.5 godz.), na którym pracuję od roku 2009 w Katedrze Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, nie pozwalały mi na prowadzenie zajęć dydaktycznych w większym zakresie, jak również na pełnienie funkcji opiekuna/kierującego/promotora pomocniczego prac licencjackich, magisterskich czy doktorskich na Uniwersytecie Łódzkim.

⁵ W ankietach prowadzonych przeze mnie zajęć na UŁ studenci regularnie oceniali poziom moich zajęć jako bardzo wysoki. Średnia arytmetyczna w większości pytań w systemie USOS osiągała poziom 5 w skali od 2 do 5.

6.1.2. Działalność dydaktyczna na uczelniach zagranicznych

- 2006-2008** Prowadzenie zajęć dydaktycznych na Heriot-Watt University w Edynburgu z przedmiotu „*Statistical Methods in Life Sciences*” w ramach modułu „*Research in Humans*” dla studentów studiów magisterskich w School of Life Sciences. Przygotowanie tych zajęć wymagało ode mnie zapoznania się z metodyką pracy dydaktycznej na brytyjskich uczelni oraz pogłębienia wiedzy w zakresie metod statystycznych stosowanych w badaniach biomedycznych. Zdobyte doświadczenie w opracowaniu i prowadzeniu tych zajęć pozwoliło mi nabyć nowe umiejętności dydaktyczne w anglojęzycznym systemie szkolnictwa wyższego.
- 2014-2017** Prowadzenie specjalistycznych kursów z reprogramowania i hodowli ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSCs) dla stypendystów programu europejskiego w ramach konsorcjum StemBANCC (IMI, EFPIA). Szkolenia prowadziłam również dla naukowców, m.in. koncernu farmaceutycznego Boehringer Ingelheim Pharma GmbH w Biberach an der Riss w Niemczech, Bioreactor Group w Charité-Universitätsmedizin Berlin w Niemczech oraz Innsbruck Medical University w Austrii.
- 2018-obecnie** Prowadzenie seminariów „*Research Seminars*” dla doktorantów studiów doktoranckich w School of Health and Life Sciences na University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania.
- 2018-obecnie** Prowadzenie seminariów „*Journal Club*” dla doktorantów programu BREATH, University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania.
- 2018-obecnie** Udział w interdyscyplinarnym przygotowaniu młodej kadry akademickiej do szerzenia wiedzy z zakresu chorób płuc w ramach projektu edukacyjno-naukowego BREATH. W projekcie pełnię funkcję koordynatora naukowo-dydaktycznego dla 5 doktorantów na University of the West of Scotland.
- Prowadzę także specjalistyczne kursy z zakresu hodowli progenitorowych komórek macierzystych oraz z zakresu analiz molekularnych dla stypendystów programu BREATH.

6.1.3. Opieka nad pracami doktorskimi

- 2006-2008** Nadzorowanie prac eksperymentalnych z zakresu hodowli mysich komórek mięśniowych (C2C12) oraz analiz molekularnych ekspresji microRNA w pracy doktorskiej dr Robina A McGregora z School of Engineering and Physical Sciences, Heriot-Watt University, Edynburg, Wielka Brytania (temat pracy doktorskiej: „*Skeletal muscle microRNAs in human cancer cachexia and Type 2 diabetes*”).
- 2013-2015** Nadzorowanie prac eksperymentalnych z zakresu analiz molekularnych ekspresji genów w pracy doktorskiej dr Neila Johnsa z Department of Clinical Surgery, Royal Infirmary of Edinburgh, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania (temat pracy: „*Phenotypes and genetic markers of cancer cachexia*”).
- 2015-2018** Nadzorowanie prac badawczych z zakresu analiz molekularnych ekspresji genów w pracy doktorskiej dr Katie Morgan z Centre for Liver and Digestive Disorders, Hepatology Laboratory, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania (temat pracy: „*Formulating an improved in vitro hepatic model for drug development and toxicity testing*”).
- 2016-2019** Promotor pomocniczy pracy doktorskiej dr Maurice’a Griffina z Department of Orthopaedics and Trauma, Royal Infirmary of Edinburgh, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania (temat pracy: „*Muscle factors and demographic characteristics affecting early functional outcome following total knee arthroplasty*”).

2018-obecnie Koordynator 5 prac doktorskich wykonywanych w ramach projektu BREATH na University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania. Praca koordynatora obejmuje nadzorowanie prac badawczych oraz prowadzenie szkoleń dla doktorantów w zakresie technik laboratoryjnych wykorzystywanych w biologii molekularnej i biologii komórki.

6.2. Działalność popularyzująca naukę

marzec 2014 „Pancreatic Cancer UK Visit” – Spotkanie z pacjentami z kachekcją nowotworową, Edinburgh Royal Infirmary Hospital, Edynburg, Wielka Brytania.

lutym 2015 „Stem Cell Revolution” – Zajęcia dla licealistów w ramach przedmiotu *Biology* na poziomie Highers oraz Advanced Highers, Balerno Community High School w Edynburgu, Wielka Brytania.

czerwiec 2019 Glasgow Science Fair – Prelekcje dla dzieci szkół podstawowych z okręgu zachodniej części Szkocji, University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania.

listopad 2019 World COPD Day 2019 – Współorganizowanie obchodów Światowego Dnia POChP, University of the West of Scotland, Glasgow, Wielka Brytania.

7. Zagraniczne staże naukowe i szkolenia

Staż naukowe

01.08.2003 - 28.02.2004 School of Life Sciences, Arizona State University (ASU), Tempe, AZ, USA
Biology Department, Scottsdale Community College, Scottsdale, AZ, USA.

03.08.2009 - 31.12.2012 Tissue Injury and Repair Group, Medical Research Centre for Regenerative Medicine, Division of Health Sciences, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.

Szkolenia

sierpień 2003 - luty 2004 Szkolenia dydaktyczne – językowe w ramach kursu ACL, Arizona State University (ASU), Tempe, AZ, USA.

październik 2010 - październik 2012 (i) Professional Skills Workshop; (ii) Media Skills Workshop; (iii) Presentation Skills Course; (iv) Networking Skills Workshop, The Daphne Jackson Trust Training Sessions, Londyn, Wielka Brytania.

październik 2009 Flow Cytometry Course, Centre for Inflammation Research, Queen’s Medical Research Institute, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.

listopad 2010 Pluripotent Stem Cell Training Course, Roslin Cellab and Stemcell Technologies, Edynburg, Wielka Brytania. Uzyskanie certyfikatu specjalisty ds. technologii komórek macierzystych.

lipiec 2013 Biogazelle’s qPCR Training Course, Biogazelle, Londyn, Wielka Brytania. Uzyskanie certyfikatu Biogazelle gbase+.

wrzesień 2015 Szkolenie z międzysektorowej mobilności doświadczonych naukowców oraz możliwości prowadzenia badań naukowych poza sektorem akademickim. StemBANCC Course, NovoNordisk, Kopenhaga, Dania.

maj 2018 (i) Writing Research Proposals for the College of Medicine and Veterinary Medicine oraz (ii) Collaborative Writing and Publishing, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania.

kwiecień 2019 Tissue Biopsies Training Part A. BREATH Course, School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences na Queen’s University Belfast (QUB), Belfast, Wielka Brytania.

lutym 2020 Tissue Biopsies Training Part B. BREATH Course, Leicester Medical School, University of Leicester, Leicester, Wielka Brytania.

8. Pozostałe informacje dotyczące kariery zawodowej

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora w grudniu 1999 podjęłam pracę na stanowisku Clinical Research Associate w firmie farmaceutycznej Merck, Sharp and Dohme (MSD) w

Warszawie, w której pracowałam do lipca 2003. W ramach swoich obowiązków na tym stanowisku monitorowałam badanie kliniczne COX-2 selektywnego, niesterydowego leku przeciwzapalnego rofecoxib, przeznaczonego do objawowego leczenia stanu zapalnego i bólu w chorobie zwyrodnieniowej i reumatoidalnym zapaleniu stawów. Moje zadania obejmowały monitorowanie medyczno-prawnych aspektów badania oraz projektowanie i koordynację poszczególnych jego etapów. Realizacja tych zadań wymagała ode mnie ustawicznego doskonalenia się w wiedzy medycznej. Zdobyte doświadczenia w zakresie implementacji tzw. Dobrej Praktyki Badań Klinicznych wraz z umiejętnościami przetwarzania danych w badaniach klinicznych, okazały się bardzo pomocne na późniejszym etapie mojego rozwoju naukowego oraz w pracy w wielośrodkowym badaniu klinicznym w europejskim projekcie EndoVESPA.

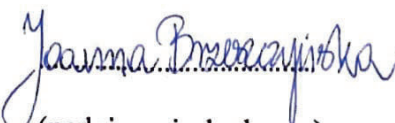
9. Bibliografia

1. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(1):16–31.
2. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2010;39(4):412–23.
3. Rosenberg IH. Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance. *J Nutr*. 1997;127(5):990S-991S.
4. Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol*. 1998;147(8):755–63.
5. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):489–95.
6. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: A new definition. *Clin Nutr*. 2008;27(6):793–9.
7. Fearon K, Arends J, Baracos V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(2):90–9.
8. Mueller TC, Bachmann J, Prokopchuk O, Friess H, Martignoni ME. Molecular pathways leading to loss of skeletal muscle mass in cancer cachexia--can findings from animal models be translated to humans? *BMC Cancer*. 2016; 16:75.
9. Byrne CA, McNeil AT, Koh TJ, Brunskill AF, Fantuzzi G. Expression of genes in the skeletal muscle of individuals with cachexia/sarcopenia: A systematic review. *PLoS ONE*. 2019;14(9).
10. Baylis D, Syddall HE, Jameson KA, Cooper C, Lord JM, Roberts HC, et al. Cachexia, sarcopenia, inflammaging and outcomes in hospitalised older people (the CaSIO study): Study protocol and preliminary results. *Eur Geriatr Med*. 2015;6(5):495–501.
11. Mierzejewski B, Archacka K, Grabowska I, Florkowska A, Ciemerych MA, Brzoska E. Human and mouse skeletal muscle stem and progenitor cells in health and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;104:93–104.
12. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PML, Carathers M, et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007;117(4):889–901.
13. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289(5488):2363–6.
14. Calura E, Cagnin S, Raffaello A, Laveder P, Lanfranchi G, Romualdi C. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics*. 2008;9(1):630.
15. Johns N, Hatakeyama S, Stephens NA, Degen M, Degen S, Friauff W, et al. Clinical Classification of Cancer Cachexia: Phenotypic Correlates in Human Skeletal Muscle. *PLoS ONE*. 2014;9(1).
16. Anderson DM, Anderson KM, Chang C-L, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, et al. A Micropeptide Encoded by a Putative Long Non-coding RNA Regulates Muscle Performance. *Cell*. 2015;160(4):595–606.
17. Cannon JG. Cytokines in aging and muscle homeostasis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995;50 Spec No:120–3.

18. Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2379–86.
19. Ferrucci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, Cohen HJ, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47(6):639–46.
20. Langen RCJ, Schols AMWJ, Kelders MCJM, van der Velden JLJ, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW. Tumor necrosis factor- α inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2002;283(3):C714–21.
21. Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, Ausin P, Pascual-Guardia S, Broquetas J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic Biol Med*. 2015; 79:91–108.
22. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(17):3221–47.
23. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):377–88.
24. Kennedy D, Mnich K, Samali A. Heat shock preconditioning protects against ER stress-induced apoptosis through the regulation of the BH3-only protein BIM. *FEBS Open Bio*. 2014; 4:813–21.
25. White JP, Puppa MJ, Gao S, Sato S, Welle SL, Carson JA. Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2013;304(10): E1042–52.
26. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis*. 2013;4(10): e838.
27. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;529(7584):37–42.
28. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
29. Kwak JY, Kwon K-S. Pharmacological Interventions for Treatment of Sarcopenia: Current Status of Drug Development for Sarcopenia. *Ann Geriatr Med Res*. 2019;23(3):98–104.
30. Penna F, Bonetto A, Aversa Z, Minero VG, Fanelli FR, Costelli P, et al. Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7(3):345–54.
31. scope-consultation-comments-and-responses.pdf. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/GID-TA10105/documents/scope-consultation-comments-and-responses>
32. Bhasin S, Jasuja R. Selective androgen receptor modulators as function promoting therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(3):232–40.
33. Solomon ZJ, Mirabal JR, Mazur DJ, Kohn TP, Lipshultz LI, Pastuszak AW. Selective Androgen Receptor Modulators: Current Knowledge and Clinical Applications. *Sex Med Rev*. 2019;7(1):84–94.
34. Narayanan R, Coss CC, Dalton JT. Development of selective androgen receptor modulators (SARMs). *Mol Cell Endocrinol*. 2018; 465:134–42.
35. Commissioner O of the. FDA In Brief: FDA warns against using SARMs in body-building products. FDA. 2019 Mar 19; Available from: <https://www.fda.gov/news-events/fda-brief/fda-brief-fda-warns-against-using-sarms-body-building-products>
36. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
37. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkowicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*. 2015;62(3):329–37.
38. Świerczek B, Ciemerych MA, Archacka K. From pluripotency to myogenesis: a multistep process in the dish. *J Muscle Res Cell Motil*. 2015;36(6):363–75.
39. Rn J, Fmv R. Towards stem cell therapies for skeletal muscle repair. *NPJ Regen Med*. 2020 May;5:10–10.
40. Drews K, Jozefczuk J, Prigione A, Adjaye J. Human induced pluripotent stem cells—from mechanisms to clinical applications. *J Mol Med*. 2012;90(7):735–45.
41. Archacka K, Grabowska I, Ciemerych MA. Indukowane komórki pluripotentne - nadzieje, obawy i perspektywy. *Postępy Biol Komórki*. 2010;37(1):41–62.
42. Greig CA, Young A, Skelton DA, Pippet E, Butler FM, Mahmud SM. Exercise studies with elderly volunteers. *Age Ageing*. 1994;23(3):185–9.

43. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 2001;137(4):231–43.
44. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods.* 2010;50(4):S1–5.
45. Best TM, Shehadeh SE, Levenson G, Michel JT, Corr DT, Aeschlimann D. Analysis of changes in mRNA levels of myoblast- and fibroblast-derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res.* 2001;19(4):565–72.
46. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4401–6.
47. Keller P, Vollaard NBJ, Gustafsson T, Gallagher IJ, Sundberg CJ, Rankinen T, et al. A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol.* 2011;110(1):46–59.
48. de Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernández M, Vega-Naredo I, Caballero B, García-Macía M, et al. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):733–7.
49. Pedersen BK, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Hansen H, Krzywkowski K, et al. Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med.* 2000;21 Suppl 1: S4-9.
50. Dolly A, Dumas J-F, Servais S. Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know? *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11(6):1413–28.
51. Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, Mura L, Gramignano G, Lusso MR, et al. Quantitative evaluation of oxidative stress, chronic inflammatory indices and leptin in cancer patients: Correlation with stage and performance status. *Int J Cancer.* 2002;98(1):84–91.
52. Sullivan-Gunn MJ, Campbell-O'Sullivan SP, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011;2(3):181–8.
53. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol.* 1990;258(4): R918–23.
54. Barbieri E, Sestili P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *J Signal Transduct.* 2011;2012: e982794.
55. Figueras M, Busquets S, Carbó N, Barreiro E, Almendro V, Argilés JM, et al. Interleukin-15 is able to suppress the increased DNA fragmentation associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 2004;569(1–3):201–6.
56. Di Marco S, Mazroui R, Dallaire P, Chittur S, Tenenbaum SA, Radzioch D, et al. NF-kappa B-mediated MyoD decay during muscle wasting requires nitric oxide synthase mRNA stabilization, HuR protein, and nitric oxide release. *Mol Cell Biol.* 2005;25(15):6533–45.
57. Komatsu M. Potential role of p62 in tumor development. *Autophagy.* 2011;7(9):1088–90.
58. Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates “reserve cells.” *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 6):769–79.
59. Gayraud-Morel B, Chrétien F, Flamant P, Gomès D, Zammit PS, Tajbakhsh S. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol.* 2007;312(1):13–28.
60. L'honore A, Rana V, Arsic N, Franckhauser C, Lamb NJ, Fernandez A. Identification of a New Hybrid Serum Response Factor and Myocyte Enhancer Factor 2-binding Element in MyoD Enhancer Required for MyoD Expression during Myogenesis. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):1992–2001.
61. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 2011;25(20):2125–36.
62. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 2011;30(8):1536–48.
63. Wu Z, Woodring PJ, Bhakta KS, Tamura K, Wen F, Feramisco JR, et al. p38 and Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate the Myogenic Program at Multiple Steps. *Mol Cell Biol.* 2000;20(11):3951–64.
64. Lovett FA, Cosgrove RA, Gonzalez I, Pell JM. Essential role for p38alpha MAPK but not p38gamma MAPK in Igf2 expression and myoblast differentiation. *Endocrinology.* 2010;151(9):4368–80.
65. Gillespie MA, Le Grand F, Scimè A, Kuang S, von Maltzahn J, Seale V, et al. p38- γ -dependent gene silencing restricts entry into the myogenic differentiation program. *J Cell Biol.* 2009;187(7):991–1005.

66. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 2003;22(16):4212–22.
67. Liu R-M, Liu G. Cell senescence and fibrotic lung diseases. *Exp Gerontol.* 2020; 132:110836.
68. Taylor-Jones JM, McGehee RE, Rando TA, Lecka-Czernik B, Lipschitz DA, Peterson CA. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mech Ageing Dev.* 2002 Mar 31;123(6):649–61.
69. Brack AS, Rando TA. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev.* 2007;3(3):226–37.
70. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006 Feb;38(2):228–33.
71. Sato T, Rocancourt D, Marques L, Thorsteinsdóttir S, Buckingham M. A Pax3/Dmrt2/Myf5 Regulatory Cascade Functions at the Onset of Myogenesis. *PLoS Genet.* 2010;6(4).
72. Güller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol.* 2010;588(Pt 21):4075–87.
73. Yue B, Yang H, Wang J, Ru W, Wu J, Huang Y, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Prolif.* 2020;53(7).
74. Tasca E, Pegoraro V, Merico A, Angelini C. Circulating microRNAs as biomarkers of muscle differentiation and atrophy in ALS. *Clin Neuropathol.* 2016;35(1):22–30.
75. Jung HJ, Lee K-P, Kwon K-S, Suh Y. MicroRNAs in Skeletal Muscle Aging: Current Issues and Perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019;74(7):1008–14.
76. Freire PP, Fernandez GJ, Cury SS, de Moraes D, Oliveira JS, de Oliveira G, et al. The Pathway to Cancer Cachexia: MicroRNA-Regulated Networks in Muscle Wasting Based on Integrative Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8).
77. He WA, Calore F, Londhe P, Canella A, Guttridge DC, Croce CM. Microvesicles containing miRNAs promote muscle cell death in cancer cachexia via TLR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(12):4525–9.
78. Materozzi M, Merlotti D, Gennari L, Bianciardi S. The Potential Role of miRNAs as New Biomarkers for Osteoporosis. *Int J Endocrinol.* 2018;(1):1-10.
79. Lee K-P, Shin YJ, Panda AC, Abdelmohsen K, Kim JY, Lee S-M, et al. miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4. *Genes Dev.* 2015;29(15):1605–17.
80. Chou B-K, Mali P, Huang X, Ye Z, Doney SN, Resar LM, et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 2011;21(3):518–29.
81. Mack AA, Kroboth S, Rajesh D, Wang WB. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from CD34+ Cells across Blood Drawn from Multiple Donors with Non-Integrating Episomal Vectors. *PLOS ONE.* 2011;6(11):e27956.
82. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, et al. An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *STEM CELLS.* 2013;31(3):458–66.
83. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, et al. Suppression of Induced Pluripotent Stem Cell Generation by the p53-p21 Pathway. *Nature.* 2009;460(7259):1132–5.
84. Spike BT, Wahl GM. p53, Stem Cells, and Reprogramming. *Genes Cancer.* 2011;2(4):404–19.
85. Park TS, Huo JS, Peters A, Jr CCT, Verma K, Zimmerlin L, et al. Growth Factor-Activated Stem Cell Circuits and Stromal Signals Cooperatively Accelerate Non-Integrated iPSC Reprogramming of Human Myeloid Progenitors. *PLOS ONE.* 2012;7(8): e42838.
86. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science.* 2008;322(5903):945–9.
87. Rivory LP, Slaviero KA, Clarke SJ. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *Br J Cancer.* 2002;87(3):277–80.
88. Naito T, Tashiro M, Ishida T, Ohnishi K, Kawakami J. Cancer cachexia raises the plasma concentration of oxymorphone through the reduction of CYP3A but not CYP2D6 in oxycodone-treated patients. *J Clin Pharmacol.* 2013;53(8):812–8.


(podpis wnioskodawcy)