

# **Autoreferat**



**dr Magdalena Szaryńska**

**Gdańsk Uniwersytet Medyczny**

**Wydział Lekarski**

**Katedra i Zakład Histologii**

**Gdańsk 2022**

**1. Imię i nazwisko: Magdalena Szaryńska****2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:**

23.09.2010	Doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, specjalność Biologia molekularna, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Gdański Uniwersytet Medyczny, <u>Tytuł rozprawy doktorskiej:</u> <i>"Charakterystyka biologiczna krwiotwórczych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej"/</i> <i>"The biological characteristic of hematopoietic stem cells of human umbilical cord blood"</i> Promotor: Prof. dr hab. Jolanta Myśliwska
2005-2009	Dzienne Studia Doktoranckie, Akademia Medyczna w Gdańsku (ukończone 3 lata)
30.06.2004	Magister biologii, Uniwersytet Gdański Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii (BGiO) Kierunek Biologia Specjalizacja: Biologia Molekularna <u>Tytuł pracy:</u> <i>Analiza długości telomerów i aktywności cytotoksycznej komórek NK w procesie starzenia układu immunologicznego człowieka"/</i> <i>"The analysis of telomere length and cytotoxic activity of NK cells in the process of immune system ageing"</i> Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Myśliwski

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

Od 2010	Adiunkt	Katedra i Zakład Histologii Wydział Lekarski Gdański Uniwersytet Medyczny
2005-2009	Asystent	
2005-2010	Doktorant	

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

Cykl Habilitacyjny

		IF	MEiN	Liczba cytowań*
1.	<b>Szaryńska M., Olejniczak A., Kobiela J., Spychalski P., Kmieć Z.</b> <i>Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (review)</i> . <i>Oncol. Lett.</i> <b>2017</b> ; 14 (6): 7653-7668.	1.664	15	24
2.	<b>Szaryńska M., Olejniczak A., Wierzbicki P., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z., Adrych K., Guzek M., Kmieć Z.</b> <i>FasR and FasL In Colorectal Cancer</i> . <i>Int. J. Oncol.</i> <b>2017</b> ; 51 (3): 975-986.	3.333	25	5
3.	Olejniczak A.*, <b>Szaryńska M.*</b> , Kmieć Z. <i>In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines</i> . <i>Int. J. Oncol.</i> <b>2018</b> ; 52 (2): 599-612. * równy udział w pracy	3.571	25	12
4.	<b>Szaryńska M., Olejniczak-Kęder A., Zubrzycki A., Wardowska A., Kmieć Z.</b> <i>Aspirin exerts synergistic effect with anti-Fas stimulation against colorectal cancer stem cells in vitro</i> . <i>Appl. Sci.</i> <b>2021</b> ; 11 (21): 1-15.	2.679	100	0
	Ogółem:	11.247	165	

\* wg *Web of Science Core Collection*, bez autocytowań

**a. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Optymalizacja hodowli ludzkich komórek raka jelita grubego  
w postaci kolonosfer i wykorzystanie ich do oceny funkcji  
ścieżki sygnałowej Fas w nowotworowych komórkach macierzystych

Osiągnięcie naukowe stanowi zbiór czterech powiązanych tematycznie publikacji, zawierający 3 oryginalne prace i 1 pracę przeglądową, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), o łącznej punktacji:

IF = 11.247

MEiN = 165

**b. (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)**

**1. Szaryńska M.,** Olejniczak A., Kobiela J., Spsychalski P., Kmieć Z. *Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (review)*. *Oncol. Lett.* 2017; 14: 7653.

IF	1.664
MEiN	15

MS – autor korespondencyjny, główny pomysłodawca tematu pracy przeglądowej, wiodący udział w zbieraniu materiałów, pisaniu i przygotowanie manuskryptu do publikacji, pozyskanie środków na sfinansowanie pracy (praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, projekt N N402 684040).

**2. Szaryńska M.,** Olejniczak A., Wierzbicki P., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z., Adrych K., Guzek M., Kmieć Z. *FasR And FasL in Colorectal Cancer*. *Int. J. Oncol.* 2017; 51: 975-986.

IF	3.333
MEiN	25

MS - autor korespondencyjny, główny pomysłodawca projektu, znaczący udział w planowaniu doświadczeń, ich przeprowadzaniu, analizie statystycznej i interpretacji wyników, pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do publikacji; pozyskanie środków finansowych na realizację badań (praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, projekt N N402 684040).

**3. Olejniczak A.\*, Szaryńska M.\*,** Kmieć Z. *In vitro* characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 2018; 52: 599-612. \* równy udział w pracy

IF	3.571
MEiN	25

MS - autor korespondencyjny, główny pomysłodawca projektu, znaczący udział w planowaniu doświadczeń, ich przeprowadzaniu, analizie statystycznej i interpretacji wyników, pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do publikacji (wraz z AO – równy udział; equal contribution – zadeklarowany przed opublikowaniem pracy i ujęty w opublikowanym manuskrypcie), pozyskanie środków finansowych na realizację badań (praca nr N N402 684040).

**4. Szaryńska M.,** Olejniczak-Kęder A., Zubrzycki A., Wardowska A., Kmieć Z. *Aspirin exerts synergistic effect with anti-Fas stimulation against colorectal cancer stem cells in vitro*. *Appl. Sci.* 2021; 11: 1-15.

IF	2.679
MEiN	100

MS - autor korespondencyjny, główny pomysłodawca projektu, wiodący udział w planowaniu doświadczeń, ich przeprowadzaniu, analizie statystycznej i interpretacji wyników, pisaniu i przygotowaniu manuskryptu do publikacji.

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

#### **WPROWADZENIE**

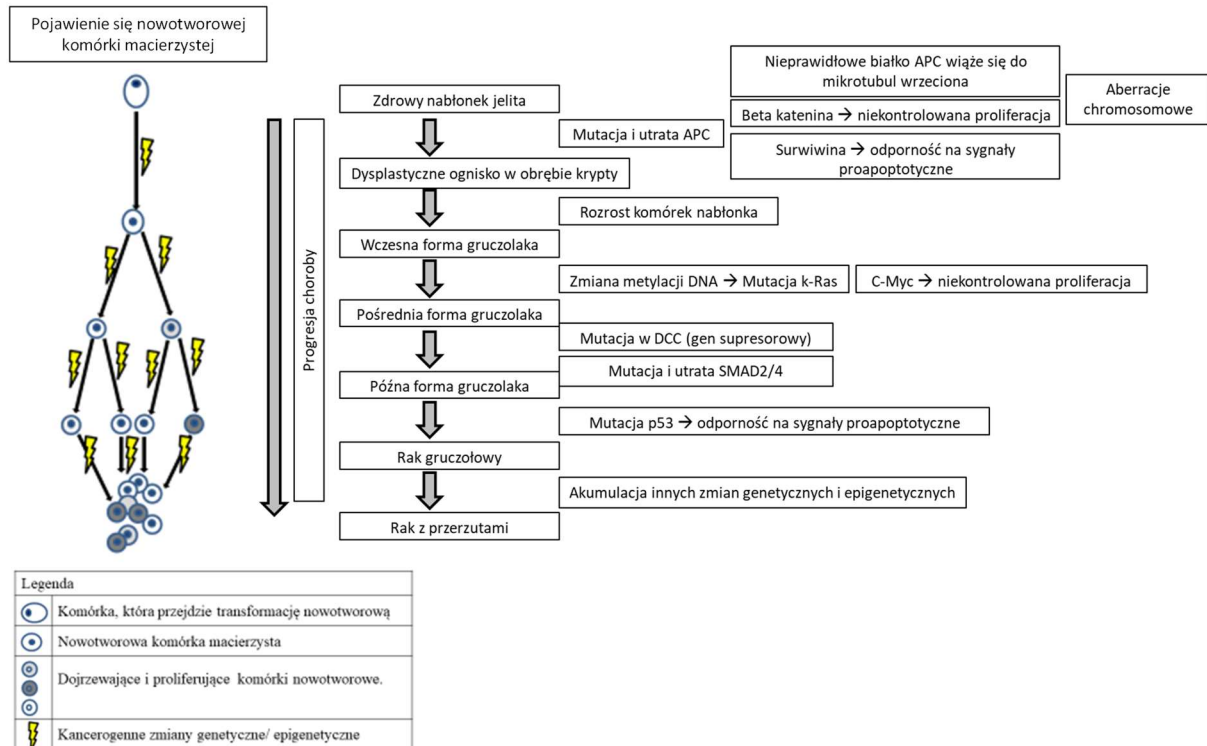
Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów złośliwych. Według danych Krajowego Rejestru Nowotworów w 2018 roku zarejestrowano w Polsce 18 701 nowych zachorowań na nowotwory złośliwe jelita grubego. Wśród mężczyzn odnotowano 10 556 nowych przypadków, natomiast wśród kobiet - 8 145. Wynika z tego, że RJG jest trzecim (po raku prostaty i raku płuca) co do częstości występowania nowotworem złośliwym u mężczyzn oraz drugim (po raku piersi) najczęściej występującym nowotworem złośliwym w populacji polskich kobiet (1). Podobne zależności statystyczne zostały odnotowane na całym świecie. Według danych WHO w 2018 roku zanotowano ponad 1.85 milionów nowych przypadków RJG, a ponad 881 tysięcy pacjentów cierpiących na ten nowotwór zmarło (2).

Zasadniczą rolę w terapii raka okrężnicy odgrywa leczenie chirurgiczne – uznaje się je również za metodę radykalną u wybranych chorych z obecnością przerzutów odległych. Chemioterapia uzupełniająca zwiększa odsetek wyleczeń u chorych charakteryzujących się dużym ryzykiem nawrotu, a chemioterapia w postępowaniu paliatywnym istotnie wydłuża czas życia chorych (3). W przypadku zaawansowanego RJG zlokalizowanego w jelicie grubym stosuje się także przedoperacyjną radioterapię. Około 25% pacjentów z RJG jest diagnozowanych w stadium zaawansowanej choroby z przerzutami, a u około 50% z nich pojawiają się ogniska przerzutowe w późniejszym czasie (4). Rokowania u takich pacjentów nie są zbyt korzystne, ponieważ konwencjonalna terapia niszczy komórki nowotworowe proliferujące lub/i dojrzewające w obrębie guza, podczas gdy nowotworowe komórki macierzyste (NKM) są na nią niewrażliwe. Obecnie wiadomo, że to populacja NKM jest odpowiedzialna za rozwój nowotworu, jego progresję i tworzenie przerzutów. Z tego powodu obserwuje się często na samym początku terapii zmniejszenie objętości guza, po czym następuje wznowa i zaostrzenie choroby nowotworowej (5). U około 50% chorych na RJG obserwowana jest pozytywna odpowiedź na zastosowaną terapię konwencjonalną, lecz u większości z nich po pewnym czasie dochodzi do rozwoju oporności na stosowane chemioterapeutyki (6, 7). Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Cancer.Net pięcioletni okres przeżycia pacjentów z RJG, kiedy nowotwór został zdiagnozowany we wczesnym stadium, wynosi 91%, lecz ten odsetek znacząco obniża się do 72% w przypadku raka

łagodnego i do 14% - dla pacjentów z zaawansowanym stadium rozwoju nowotworu (stadium IV). Ze względu na to, wciąż podejmowane są nowe próby pokonania lekoodporności komórek nowotworowych i opracowania skuteczniejszych form terapii. Wykazano, że wiele typów nowotworów, w tym RJG, rozwija się z komórek o cechach przypominających komórki macierzyste pluripotencjalne (8) określane jako „nowotworowe komórki macierzyste” (NKM) (ang. cancer stem cells, CSCs lub tumor initiating cells, TICs) (9, 10). Występowanie NKM inicjującej kancerogenezę w przypadku RJG zasugerowała grupa badawcza Lucii Ricci-Vitiani, która po raz pierwszy wyizolowała komórki CD133<sup>+</sup> z guza jelita grubego w 2009 roku (9).

Teoria nowotworowych komórek macierzystych tłumaczy podobieństwa pomiędzy właściwościami i funkcją tkankowych komórek macierzystych (nienowotworowych) i NKM występujących wśród komórek nowotworu. Teoria ta pozwoliła również zrozumieć mechanizmy związane z rozwojem i progresją choroby nowotworowej. Teoria NKM zakłada istnienie w obrębie guza różnych populacji komórek zorganizowanych hierarchicznie i istnienie komórek o nieograniczonym potencjale do samoodnowy, proliferacji i różnicowania się (9, 11). Te komórki również są odpowiedzialne za wznowę choroby nawet wiele lat po zakończonej chemio- i radioterapii (12). Biorąc pod uwagę powyższe cechy oraz fakt, że NKM odpowiadają za oporność nowotworu na konwencjonalne środki terapeutyczne, obecnie uważa się, że leczenie powinno być skierowane przede wszystkim na NKM, co mogłoby pozwolić na skuteczne i trwałe wyleczenie pacjentów onkologicznych (13).

Uważa się, że czas rozwoju RJG od zapoczątkowania procesu nowotworowego do wystąpienia klinicznych objawów wynosi od kilku do kilkudziesięciu lat (14). Wśród czynników sprzyjających powstaniu i rozwojowi RJG należy wymienić przede wszystkim niewłaściwą dietę, niewielką aktywność fizyczną, chroniczne stany zapalne oraz predyspozycje genetyczne (15, 16). Na podstawie badań genetycznych, funkcjonalnych i obserwacji klinicznych przedstawiono w 1990 r. hipotezę wyjaśniającą procesy rozwoju nowotworu złośliwego z gruczolaka jelita („adenoma-carcinoma sequence”) (17), co w sposób graficzny zostało przedstawione na schemacie poniżej. Tysiące badań przeprowadzonych w następnym latach potwierdziły słuszność tego tzw. „kanonicznego szlaku” powstawania RJG w odniesieniu do ponad 70% przypadków. Dokładne określenie zmian leżących u podstawy patogenezy RJG u konkretnego pacjenta jest ważne, ponieważ rzutuje na późniejsze decyzje dotyczące zastosowanej terapii. Rycina ta została uzupełniona o NKM, których istnienie wprawdzie wykazano wiele lat po sformułowaniu tego „kanonicznego szlaku”, ale obecnie nie da się pominąć udziału tych komórek w rozwoju i progresji RJG.



Rycina. Kolejność zmian morfologicznych i zaburzeń genetycznych prowadzących do pojawienia się nowotworowej komórki macierzystej w nabłonku jelita oraz do rozwoju raka jelita grubego (rycina własna, zmieniona; przed zmianami opublikowana w manuskrypcie: Szaryńska M., Kmiec Z. Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. Forum Medycyny Rodzinnej 2011).

W 1989 roku ukazała się publikacja japońskich naukowców opisująca odkrycie nowego receptora, który indukował śmierć komórek linii ludzkich fibroblastów FS-7 w warunkach *in vitro*. Receptor ten został zidentyfikowany dzięki użyciu przeciwciał monoklonalnych wygenerowanych poprzez immunizację myszy komórkami linii FS-7. Autorzy nazwali to białko Fas jako antygen powierzchniowy związany z linią FS-7 (ang. FS-7-associated surface antigen), który dopiero później uzyskał swoją nazwę w klasyfikacji CD – CD95 (18). Już kilka lat po tym odkryciu, opisano ligand dla tego receptora (FasL) na powierzchni linii komórek T cytotoksycznych PC60-d10S uzyskanych metodą izolacji przy użyciu sortera FACS (ang. fluorescence-activated cell sorter) (19). Od tego momentu dowiedziono, że ścieżka sygnalizacyjna Fas wywiera zróżnicowany wpływ na wiele typów komórek. Wiązanie się cząsteczki FasL do swojego receptora Fas może wywołać zarówno efekt pozytywny (fizjologiczny) jak i negatywny, związany z rozwojem różnych stanów patologicznych, w tym progresji nowotworów. Dodatkowo, ekspresja składników ścieżki Fas w komórkach RJG koreluje z gorszymi rokowaniami pacjentów, tworzeniem przerzutów oraz z pojawianiem się

wznowy (20-25) – z intensywnością procesów, za które, według najnowszych badań, odpowiedzialne są NKM (13). Rozwój wiedzy na temat funkcji i sposobów regulacji działania ścieżki Fas może umożliwić stworzenie strategii terapeutycznej, która będzie nakierowana na jej elementy lub może zostać wykorzystana jako narzędzie terapeutyczne biorąc pod uwagę jej duże znaczenie dla NKM.

Najpowszechniej znaną aktywnością ścieżki Fas jest jej pro-apoptotyczna rola w usuwaniu niemacierzystych komórek nowotworowych, komórek zarażonych wirusami czy autoreaktywnych/ niepotrzebnych limfocytów dzięki zaangażowaniu populacji CD8<sup>+</sup> (26). Terapia z użyciem Sorafenibu (o aktywności inhibitora kinaz) i Vorinostatu (inhibitora deacetylazy histonowej) aktywowała apoptozę zależną od ścieżki Fas poprzez fosforylację tyrozyny receptora Fas w pozycji 232 i 291 i zwiększenie translokacji tego receptora do błony komórkowej. Wyniki doświadczeń sugerują, że Vorinostat zwiększa efektywność indukcji ścieżki Fas przez Sorafenib zwiększając poziom wolnych rodników, które mogą hamować aktywności fosfatazy tyrozynowej. Dodatkowo, Vorinostat podnosi aktywność ścieżki Fas poprzez indukcję ekspresji liganda Fas w sposób zależny od NFκB (27). Badania przeprowadzone na szczurzym modelu niedokrwienia mózgu i komórkach linii Jurkat (unieśmiertelnićonych limfocytów T) wykazały związek aktywności ścieżki Fas z białkami szoku cieplnego z rodziny HSP90 i HSP70. (28, 29).

Komórki nowotworowe wykazują stałą (lecz znacznie zmniejszoną) ekspresję zarówno receptora jak i liganda Fas, co może świadczyć o obniżeniu ich wrażliwości na tego typu sygnały (26, 30-32). To sugeruje, że ścieżka Fas musi pełnić w tych komórkach pro-przyżyciowe funkcje i wpływać na progresję choroby. Dowiedziona aktywność cząsteczek Fas/ FasL dla homeostazy tkankowych komórek macierzystych oraz komórek w czasie embriogenezy, zdają się potwierdzać to przypuszczenie (33-35) oraz dowodzić, że głównie dotyczy to populacji NKM (36). Oszacowana ilość białka Fas niezbędna do zaindukowania apoptozy jest 1000 razy wyższa niż ilość tego receptora potrzebna dla jego pro-przyżyciowej aktywności względem NKM (34).

Co ciekawe, zespół Marcusa Petera wykazał, że eliminacja receptora lub liganda Fas powodowała śmierć komórek nowotworowych, a mechanizm ten został określony skrótem DICE (ang. death induced by CD95 or CD95L elimination). DICE to nekrotyczna forma katastrofy mitotycznej cechująca się zwiększeniem objętości komórki, zwiększoną produkcją ROS powodujących pęknięcia DNA oraz aktywację kaspazy 2 następującą po permabilizacji zewnętrznej błony mitochondrialnej (26, 37). Analizy *in vitro* oraz *in vivo* pokazały, że DICE nie da się zahamować, co sugeruje, że angażuje wiele różnych ścieżek prowadzących do śmierci



komórkowej. Autorzy tej pracy sugerują, że DICE jest naturalnym sposobem usuwania z organizmu komórek pozbawionych pro-apoptotycznych właściwości ścieżki Fas. DICE zdaje się być typem śmierci skierowanym wyłącznie przeciwko komórkom nowotworowym (szczególnie NKM), ponieważ komórki te nigdy lub bardzo rzadko mają zmutowane oba allele genu dla FasR. Podobnych obserwacji dokonano z użyciem ludzkich linii raka piersi (MCF7, T4F7), raka jajnika (HeyA8) i mysich komórek raka jelita grubego (CT26L) (37, 38). Indukcja DICE powodowała stopniowy spadek odsetka komórek o cechach NKM i ich potencjału do tworzenia sfer, a w ostateczności zupełny ich zanik w hodowli (39). Zmiana charakteru komórki z nie-macierzystej na macierzystą komórkę nowotworową wiąże się ze spadkiem wrażliwości na pro-apoptotyczne sygnały ze strony receptora Fas, podczas gdy komórki stają się wrażliwe na DICE (38). Dodatkowo, na mysim modelu z nokautem genów dla obu białek Fas/ FasL, nie wykazano żadnych defektów rozwojowych czy zwiększonej liczby umierających komórek w tkankach poza komórkami układu odpornościowego (26, 37). Poza tym, analizy ekspresji Fas/ FasL u chorych na RJG udowodniły jej silny związek z gorszymi rokowaniami i rozwojem przerzutów (21, 22) – za te cechy odpowiadają właśnie NKM (13).

Pomimo początkowych optymistycznych wyników badań z użyciem genetycznie zmodyfikowanych modeli zwierzęcych (26, 37), po podaniu myszom agonistycznych przeciwciał anti-Fas w celu zahamowania tej ścieżki, obserwowano zanik funkcji hepatocytów i ich umieranie, co przyczyniało się do śmierci zwierząt włączonych do eksperymentu. Wykryto, że ten efekt poprzedzony był fosforylacją białka c-Jun przez kinazę JNK (34). Ze względu na możliwą hepatotoksyczność terapii z użyciem przeciwciał anti-Fas, kliniczne ich zastosowanie budzi wiele kontrowersji (40). Wiadomo, że za toksyczność terapii z użyciem przeciwciał anti-Fas odpowiada fragment Fc przeciwciała (40, 41). To umożliwia konstruowanie rekombinowanych cząsteczek pozbawionych tej letalnej właściwości. Jedną z nich znana jako megaFasL lub APO010 ma postać heksamery utworzonego poprzez fuzję dwóch trimerycznych cząsteczek FasL. Cząsteczka megaFasL jest obecnie w trakcie badań klinicznych (42). Kolejnym nowatorskim rozwiązaniem jest fuzyjny związek APG101, który powstał poprzez połączenie zewnątrzkomórkowej domeny receptora Fas i fragmentu Fc przeciwciała IgG. Cząsteczka APG101 wiąże FasL blokując jego działanie (antagonista) i została włączona do II fazy badań klinicznych w leczeniu glejaka (43, 44).

Wprowadzenie terapii anti-Fas do rutynowego zastosowania klinicznego może stanowić wyzwanie, ale jednocześnie może poprawić rokowania pacjentów z RJG. Szersze poznanie wewnątrzkomórkowych zależności pomiędzy ścieżką Fas i innymi ważnymi szlakami

sygnalizacyjnymi na pewno przyspieszy wdrożenie takich form terapii, które zawierałyby przeciwciała anti-Fas oraz działające synergistycznie inne związki przeciwnowotworowe.

### **CEL NAUKOWY PREZENTOWANEGO OSIĄGNIĘCIA**

Celem przedstawionego osiągnięcia naukowego była analiza biologicznego znaczenia ścieżki Fas dla właściwości nowotworowych komórek macierzystych ludzkich linii raka jelita grubego (HCT116, HT29) oraz komórek RJG wyizolowanych z fragmentów guzów pobranych od pacjentów hodowanych w postaci trójwymiarowych kolonosfer.

W tym celu został stworzony i zoptymalizowany model hodowli komórek linii RJG w postaci kolonosfer – trójwymiarowych agregatów komórkowych imitujących cechy guza *in vivo*. Dzięki zastosowaniu takiego sposobu hodowli komórek możliwe było przeanalizowanie różnorodnych aspektów biologii nowotworowych komórek macierzystych związanych z różnym dostępem do składników odżywczych czy tlenu w czasie ekspansji.

Praca przeglądowa włączona do cyklu habilitacyjnego tworzy tło epidemiologiczne poruszając aspekty terapii RJG. W tej pracy zostały scharakteryzowane podstawowe cechy NKM, podkreślając ich udział w patogenezie RJG.

Prace eksperymentalne realizowały następujące szczegółowe cele doświadczalne:

1. Optymalizacja warunków hodowli sferycznej komórek linii RJG oraz komórek wyizolowanych z fragmentów guzów RJG.
2. Analiza właściwości komórek RJG hodowanych w postaci kolonosfer w medium bezsurowiczym.
3. Porównanie właściwości komórek linii RJG hodowanych w formie adherentnej i sferycznej.
4. Analiza wpływu agonistycznego przeciwciała anti-Fas na właściwości NKM RJG człowieka.
5. Analiza synergistycznych właściwości aspiryny i agonistycznego przeciwciała anti-Fas na właściwości NKM RJG.

## OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

### Publikacja 1

*Szaryńska M., Olejniczak A., Kobiela J., Spychalski P., Kmieć Z. Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (review). Oncol. Lett. 2017;14: 7653.*

Pierwsza praca mojego osiągnięcia habilitacyjnego jest pracą przeglądową, która omawia sytuację epidemiologiczną dotyczącą RJG oraz charakteryzuje podstawowe cechy NKM, podkreślając ich udział w patogenezie tego typu nowotworu. Poza tym, powyższa publikacja prezentuje najnowszych strategię terapii RJG, których celem są pierwotne cechy nowotworowych komórek macierzystych.

Pomimo znacznych postępów w leczeniu pacjentów z RJG, wciąż duża ich liczba umiera z powodu późnej diagnozy, wznowy czy pojawiania się odległych przerzutów. Najnowsze strategie terapeutyczne powinny zatem celować w populację nowotworowych komórek macierzystych (NKM), które są odpowiedzialne za wszystkie te niekorzystne zjawiska obniżające przeżywalność pacjentów. Poniższa publikacja cyklu jest pracą przeglądową stanowiącą przegląd eksperymentalnych metod terapeutycznych, które skierowane są na różne aspekty biologii NKM RJG.

Konwencjonalna chemioterapia RJG może być prowadzona w postaci monoterapii z zastosowaniem np. kapecytabiny lub irinotekanu. U większości pacjentów preferowane jest jednak zastosowanie schematów leczenia zawierających 5-fluorouracyl w połączeniu z innym związkiem terapeutycznym, np. FOLFIRI, FOLFOX-4, CAPOX, LVFU2. Chemioterapia może być również sprzężona z radioterapią (45, 46). Dodatkowo, w ostatnich latach do terapii pacjentów z RJG włącza się antagonistyczne przeciwciała monoklonalne łączące się do receptorów na powierzchni komórek guza tj. EGFR czy VEGFR. Taka procedura hamuje aktywację ścieżek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za proliferację, migrację czy angiogenezę. Włączenie do podstawowego schematu leczenia pacjentów z RJG nowatorskich związków wpływających na któryś z aspektów biologii NKM, mogłoby zwiększyć odsetek wyleczonych pacjentów i wydłużyć czas ich życia.

W literaturze stale prowadzona jest dyskusja na temat zestawu markerów charakteryzujących swoiście macierzyste komórki RJG. W tabeli poniżej przedstawiono markery najczęściej wykorzystywane.

Tabela 1. Wybrane markery nowotworowych komórek macierzystych raka jelita grubego oraz pełniona przez nie funkcja (47-49).	
Marker	Funkcja
CD166	ALCAM (activated leucocyte cell adhesion molecule). Jest to cząsteczka adhezyjna należąca do nadrodziny immunoglobulin. Stanowi ona receptor dla ligandu CD6 lub tworzy homofilowe wiązania w obrębie tkanki. Ekspresja CD166 koreluje z inwazyjnością NKM.
CD133	Prominina 1 (Prom 1, AC133). Błonowa glikoproteina zlokalizowana na powierzchni szybko dzielących się komórek. Dokładna jej funkcja nie jest znana, chociaż udowodniono silne korelacje obecności tego białka z zdolnością do podziałów, różnicowania, przeżycia czy migracji NKM.
CD44	P Glikoproteina 1. Jest to cząsteczka adhezyjna będąca receptorem dla kwasu hialuronowego. Białko to odpowiada za interakcje pomiędzy komórkami oraz pomiędzy komórkami a macierzą pozakomórkową, regulując zdolności migracyjne NKM. Poprzez wpływ na aktywność ścieżki Wnt odpowiada za utrzymanie właściwości przez NKM.
CD29	$\beta$ 1 integryna będąca ważnym białkiem adhezyjnym, kluczowym dla utrzymania połączenia komórki z elementami macierzy pozakomórkowej. Zaburzenia ekspresji CD29 prowadzą do dysplazji w obrębie nabłonka jelitowego.
CD24	HSA (heat stable antygen). Cząsteczka adhezyjna odpowiadająca za utrzymywanie stabilności połączeń międzykomórkowych oraz pomiędzy komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową. Jej ekspresja koreluje ze zwiększoną inwazyjnością komórek nowotworowych.
ALDH1	Dehydrogenaza aldehydowa, enzym detoksyfikacyjny, przekształcający retinol do kwasu retinowego, reguluje proliferację komórek.
Bmi-1	Wewnątrzkomórkowe białko będące represorem transkrypcji hamującym czynniki transkrypcyjne regulujące cykl komórkowy i różnicowanie komórek, odpowiada za utrzymanie chromatyny w stanie nieaktywnym transkrypcyjnie. Obecny jest w wyciszonych komórkach macierzystych w obrębie guza i komórki BMI-1-pozytywne mogą dawać początek komórkom wykazującym ekspresję LGR-5.
DCC	Deleted in colorectal cancer. Receptor DCC (przez oddziaływanie z białkiem netryną 1) reguluje proliferację i dojrzewanie komórek w obrębie krypt jelitowych. Wraz z przesuwaniem się komórek dojrzewających w górę gruczołu jelitowego, dużej redukcji ulega poziom netryny 1, co włącza proapoptotyczną funkcję receptora DCC, który aktywuje kaspazę 9.
EpCAM	Epithelial specific antygen. Cząsteczka adhezyjna obecna na powierzchni komórek nabłonkowych, zaangażowana w kontrolę proliferacji i różnicowania się komórek w obrębie tkanki. Potencjał pro-nowotworowy tej glikoproteiny opiera się na pobudzeniu proliferacji komórek pochodzenia nabłonkowego poprzez indukcję ekspresji białek c-myc i cyklin.
Lgr-5	Glikoproteina błonowa pełniąca funkcję receptora 5 sprzężonego z białkiem G, w swojej sekwencji zawiera powtórzenia bogate w leucynę. Gen dla tego białka jest aktywowany przez ścieżkę Wnt odpowiadającą za samoodnowę komórek. Białko to obecne jest w szybko dzielących się NKM odpowiadających za odbudowę masy guza po zakończeniu terapii.
TERT	Jest to podjednostka telomerazy o aktywności odwrotnej transkryptazy (ang. Telomerase reverse transcriptase), która odpowiada za utrzymanie stabilności genomu oraz utrzymuje komórki w stanie uśpienia. Odpowiada za odporność NKM na uszkodzenia DNA w wyniku radioterapii.

Większa część całej pracy skupia się na przedstawieniu sposobów eliminacji lub obniżenia potencjału NKM poprzez działanie na wybrane ich właściwości lub ścieżki sygnalizacyjne kluczowe dla komórek macierzystych RJG.

Pierwsza wspomniana w pracy strategia polega na stymulacji różnicowania się komórek nowotworowych i pierwszy w tym zakresie sukces został zanotowany w przypadku komórek białaczki promielocytarnej (50). Komórki białaczkowe po traktowaniu kwasem retinowym różnicują się, tracą swój pierwotny potencjał i stają się jednocześnie wrażliwe na działanie klasycznej terapii przeciwnowotworowej. Kolejna strategia opiera się na blokowaniu białek kontrolujących prawidłowy przebieg cyklu komórkowego w celu destabilizacji jego przebiegu oraz stymulacji niekontrolowanych podziałów, które w rezultacie mogą doprowadzić do utraty stabilności genomu i katastrofy mitotycznej komórek guza. Wykazano, że komórki bez właściwie działających mechanizmów kontrolujących cykl komórkowy stały się bardziej wrażliwe na sygnały pro-apoptotyczne. Łączne użycie moriny i inhibitora telomerazy MST-312 pozwoliło na zmniejszenie potencjału NKM RJG poprzez zahamowanie czynnika transkrypcyjnego STAT3 oraz aktywności telomerazy (51). Inna grupa badawcza stosowała antysensowne RNA blokujące ekspresję genu kinazy Chk1 (52).

W czasie progresji RJG jednym z kluczowych etapów jest przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. Epithelial-mesenchymal transition, EMT), kiedy komórki tracą właściwości komórek nabłonkowych i zyskują zdolność do migracji, nabywając cech komórek mezenchymalnych (komórek tkanek łącznych). Proces ten jest kontrolowany przez wiele kluczowych ścieżek sygnalizacyjnych, a wśród nich Wnt, Nanog, TGF $\beta$  (53). Dodatkowo, w czasie EMT może dojść do transróżnicowania się komórek niemacierzystych i wtedy nabierają one cech NKM zyskując zdolność do migracji, tworzenia przerzutów oraz stają się odporne na klasyczną terapię (54).

Dalsza część pracy koncentruje się na czynnikach regulujących wyżej wspomniane kluczowe ścieżki, w tym kontrolujących aktywność ścieżki Wnt. Zaprezentowałam czynniki, które mogą stać się celem terapii lub, które hamują aktywność ścieżki Wnt i potencjalnie mogą zostać wykorzystane jako czynniki terapeutyczne. Działanie ścieżki Wnt i jej ważnego efektoru –  $\beta$ -kateniny jest wadliwe w ponad 70% wszystkich przypadków RJG, więc duże zainteresowanie badaczy tym molekularnym celem terapeutycznym jest zrozumiałe. Jedną z rycin w pracy w czytelny sposób ilustruje te strategie. Wśród czynników hamujących pro-proliferacyjne właściwości ścieżki Wnt wymienia się aspirynę (ASA), która została wykorzystana w mojej czwartej publikacji włączonej do cyklu habilitacyjnego. ASA hamuje aktywność ścieżki Wnt i obniża ekspresję jej białek efektorowych. Jednym z proponowanych

mechanizmów działania ASA jest stabilizacja  $\beta$ -kateniny w jej nieaktywnej ufosforylowanej formie, co blokuje jej funkcje jako czynnika transkrypcyjnego (55). Oprócz tego, ASA jest ligandem dla receptora PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), który blokuje cykl komórkowy, indukuje różnicowanie i apoptozę komórek docelowych (55). Wśród regulatorów ścieżki Wnt wymienia się między innymi ścieżkę Notch (56), wraz z jej ligandem– JAG1 (57) oraz  $\gamma$ -sekreazami uwalniającymi podjednostkę migrującą do jądra komórkowego i aktywującą ekspresję genów białek efektorowych (58). Jednocześnie te białka zostały zaproponowane jako potencjalne cele terapii przeciwnowotworowej.

W dalszej części mojej pracy przeglądowej kolejno prezentuję potencjalne strategie hamowania ścieżek sygnalizacyjnych lub czynników transkrypcyjnych kluczowych dla zachowania wysokiego potencjału przez NKM RJG. Pierwszym z nich jest czynnik transkrypcyjny Nanog, którego aktywność bezpośrednio wiąże się ze zdolnością do samoodnowy, proliferacji i różnicowania NKM. Wykazano jego nadekspresję w komórkach nowotworowych, a wyciszenie ekspresji powoduje obniżenie zdolności proliferacyjnych i zmniejszenie rozmiarów guza w modelu ksenotransplantacji (59). Analiza cyklu komórkowego wykazała, że Nanog również reguluje ekspresję cykliny D i białka c-myc (60). Co więcej, w 75% komórek RJG ekspresji ulega pseudogen – *NANOGP8*, który przywraca właściwości promujące kancerogenezę po wyciszeniu ekspresji genu (59). Badania z wykorzystaniem różnych linii nowotworowych pokazały, że zahamowanie aktywności czynnika NANOG zwiększa wrażliwość komórek na apoptozę, zmniejsza ich aktywność podziałową, zatrzymuje cykl w fazie G0/G1 oraz blokuje proces EMT (61). Wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody immunocytochemicznej sugerują, że białko to jest aktywne szczególnie w NKM, co czyni z czynnika NANOG jeden z bardziej obiecujących celów terapii (61).

Kolejnym przykładem białka aktywnego w komórkach nowotworowych, które może być hamowane poprzez nowatorską strategię leczniczą, jest TGF $\beta$ . Szczególnie mocno podkreśla się rolę TGF $\beta$  w promowaniu zjawiska EMT oraz nabyciu zdolności do migracji, indukcji aktywności limfocytów regulatorowych, utracie błonowej E-kadheryny i polarności komórek o pochodzeniu nabłonkowym. Jednocześnie zwiększa on syntezę czynników transkrypcyjnych typowych dla komórek pluripotencjalnych tj. Snail1/2, Twist (62). Wszystkie te efekty działania TGF $\beta$  mogą ulec zahamowaniu między innymi przez syntetyczne związki P17 i P144 (63). Jednym z białek należących do nadrodziny TGF $\beta$  jest białko BMP4. Białko to jest wydzielane parakrynowo przez komórki zrębu ściany jelita, indukuje różnicowanie i dojrzewania kolonocytów wzdłuż osi krypty jelita grubego (64). Wykazano, że białko to hamuje właściwości NKM działając na nie w ten sam sposób, jak podczas rozwoju nabłonka

jelita, co zwiększało podatność komórek na apoptozę zarówno w warunkach *in vitro* jak i w mysim modelu po ksenotransplantacji NKM RJG (65). Trójiodotyronina (T3), aktywna forma hormonu wydzielanego przez tarczycę, zwiększa aktywność BMP4 obniżając równolegle efekt działania ścieżki Wnt i oporność komórek na apoptozę (66).

W dalszym ciągu pracy zostały przedstawione potencjalne cele terapeutyczne związane z przemianami metabolicznymi zachodzącymi podczas transformacji komórek do NKM. Sirtuina 1 (SIRT1, silent mating type information regulation 2 homolog 1), której nadekspresja została zaobserwowana w RJG, jest białkiem regulującym wiele funkcji komórek nowotworowych tj. migracja i tworzenie przerzutów, przez co została zaproponowana jako jeden z negatywnych markerów transformacji nowotworowej (67). Obniżenie ekspresji SIRT1 dzięki cząsteczce miR-34a przywróciło wrażliwość komórek linii RJG na 5-FU (68). Koekspresja markera NKM białka CD133 i SIRT1, spadek zdolności do tworzenia sfer, aktywności czynników transkrypcyjnych typowych dla komórek macierzystych (Oct4, Nanog, Tert) sprawia, że SIRT1 może zostać zaliczona do markerów NKM w RJG (69).

Ostatni z przykładów związków o wysokim potencjale przeciwnowotworowym, o którym pragnę wspomnieć w poniższym opisie, jest metformina, której pozytywny wpływ na przebieg terapii zaobserwowano u pacjentów przyjmujących ją w leczeniu cukrzycy typu 2 (70). Metformina może stanowić aktywny składnik terapii adjuwantowej zwiększając efektywność działania klasycznych chemioterapeutyków i jednocześnie pozwalając na zmniejszenie ich dawek. A co najważniejsze, wydaje się, że metformina działa wybiórczo na populację NKM (71).

### **Podsumowanie publikacji 1**

Poniższa praca przeglądowa opisuje właściwości NKM oraz prezentuje szeroki stan wiedzy dotyczącej testowanych nowatorskich metod leczenia RJG. Celem tych strategii terapeutycznych są NKM w obrębie guza, gdyż właśnie ta populacja odpowiada za wysoki odsetek niepowodzeń terapii oraz za wznowę choroby i tworzenie przerzutów. Zakłada się, że takie związki po włączeniu do schematu leczenia pacjentów z RJG mogłyby znacznie zwiększyć jej efektywność. Terapia łącząca klasyczne i nowatorskie metody pozwoliłaby obniżyć dawki chemioterapeutyków, zmniejszając jednocześnie skutki uboczne terapii i podnosząc komfort życia pacjentów.

**Publikacja 2**

*Szaryńska M., Olejniczak A., Wierzbicki P., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z., Adrych K., Guzek M., Kmieć Z. FasR And FasL In Colorectal Cancer. Int. J. Oncol. 2017;51: 975.*

Równoległe w laboratorium były prowadzone badania, których wyniki zostały następnie opublikowane w postaci manuskryptów nr 2 i nr 3 mojego Autoreferatu. Zostały one zaprezentowane chronologicznie, zgodnie z datą ukazania się prac na łamach czasopisma International Journal of Oncology.

Obie te prace realizowały trzy pierwsze cele szczegółowe mojego osiągnięcia habilitacyjnego. Cele te obejmowały optymalizację metody hodowli NKM w postaci kolonosfer, analizę biologicznych właściwości tych komórek oraz porównania właściwości komórek linii RJG w hodowli adherentnej i sferycznej. Dodatkowo, praca nr 2 omawia wyniki dotyczące wpływu agonistycznego przeciwciała anti-Fas na swoiste cechy i funkcje komórek linii RJG ora komórek uzyskanych z fragmentów guzów pacjentów z RJG.

Pierwsza oryginalna praca będąca częścią osiągnięcia habilitacyjnego jest jednocześnie pierwszą moją pracą, w której opisano wyniki optymalizacji hodowli komórek raka jelita grubego uzyskanych od pacjentów i powstała przy współpracy z zespołem chirurgów Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed. Ta współpraca umożliwiła porównanie właściwości komórek komercyjnych linii RJG (HCT116, HT29) z komórkami pochodzącymi od pacjentów z RJG, które były hodowane i traktowane w takich samych warunkach. Komórki obu linii RJG hodowane były zarówno w postaci adherentnej jak i sferycznej, a uzyskane wyniki pozwoliły przedstawić argumenty potwierdzające bardziej korzystne właściwości hodowli sferycznej komórek komercyjnych linii RJG nad ich adherentnymi odpowiednikami. Wyniki poniższej pracy podkreślają podobieństwa we właściwościach kolonosfer uzyskanych z komórek linii HCT116 i HT29 do kolonosfer z komórek pobranych od pacjentów. Największa różnica pomiędzy nimi dotyczyła ich żywotności w hodowli. Podczas gdy kolonosfery utworzone z prób pobranych od pacjentów bogate w komórki CD133<sup>+</sup> prezentowały żywotność bliską 100%, komórki linii RJG użyte w pracy charakteryzowała apoptoza osiągająca poziom 76%. Była to jedna z kwestii, które zostały rozwinięte w moich następnych pracach.

Komórki pobrane od pacjentów były w krótkim czasie poddane wieloetapowej izolacji komórek o potencjale nowotworowych komórek macierzystych (NKM). Izolacja komórek z fragmentu guza RJG obejmowała etap fragmentacji skrawka, długotrwałej izolacji enzymatycznej z użyciem kolagenazy (20ng/ml) i hialuronidazy (20ng/ml), po której próba była



filtrowana w celu uzyskania jednolitej zawiesiny i wyeliminowania litych elementów łącznotkankowego zrębu. Wyizolowane komórki były następnie hodowane w medium bezsurowiczym promującym przetrwanie tylko komórek o pierwotnych cechach, którego skład został opracowany na podstawie literatury oraz moich badań wstępnych. Następnego dnia była sprawdzana czystość hodowli przy użyciu cytometrycznej analizy odsetka komórek pozytywnych pod względem białek markerowych typowych dla NKM RJG, a mianowicie CD133, CD44 oraz CD29. Próby pobrane od pacjentów charakteryzowały się dużą różnorodnością, komórki CD133-pozytywne stanowiły od 9% do 98% wszystkich komórek w hodowli. Analizy potwierdziły silną korelację pomiędzy wysokim odsetkiem komórek CD133<sup>+</sup> w hodowli i czasem przeżycia tych komórek w warunkach *in vitro* ( $R=0.9$ ;  $p<0.001$ ). Kolonosfery o najwyższym odsetku komórek CD133<sup>+</sup> mogły przetrwać kilkanaście pasaży, podczas gdy, próby o niskiej proporcji tych pierwotnych komórek – zaledwie 2-4 dni.

Równolegle z analizą komórek RJG uzyskanych z prób pacjentów, były prowadzone analizy komórek dwóch linii RJG – HCT116 i HT29, które były jednocześnie hodowane w postaci monowarstwy komórek przylegającym (w pożywce z 10% surowicą) oraz w postaci kolonosfer (w medium hodowlanym identycznym do tego, jakiego używaliśmy do ekspansji komórek pacjentów). Pozwoliło nam to określić wpływ warunków hodowli na właściwości komórek. Po raz pierwszy mogliśmy zaprezentować, że sferyczne hodowle lepiej odzwierciedlają warunki panujące w obrębie guza *in vivo*, ponieważ znacząco zmniejszyła się proporcji komórek CD133<sup>+</sup>, z wartości wynoszącej prawie 100% do 70% i 41%, odpowiednio, dla linii HCT116 i HT29. Biorąc pod uwagę, że guz to heterogenna grupa komórek, hodowla składająca się w 100% z komórek o potencjale NKM, wydaje się mniej wiarygodnym narzędziem badawczym. Dokładniejsza analiza częstości komórek posiadających inne markery wykazała, że komórki adherentne były znacznie wzbogacone w populację CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>, podczas gdy komórki hodowane w postaci kolonosfer miały bardziej zróżnicowany fenotyp. Kolonosfery wywodzące się z linii HCT116 były bogate w komórki CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> (61±8%), podczas gdy hodowla sferyczna utworzona z komórek linii HT29 posiadała wysoki odsetek komórek CD133<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup> (41%±8) w całej populacji.

Poza tym, dalsza analiza wykazała, że komórki obu linii RJG w hodowli adherentnej posiadały znacząco wyższy odsetek komórek Fas<sup>+</sup> i FasL<sup>+</sup> w porównaniu do ich sferycznych odpowiedników, a kolonosfery uzyskane z komórek od pacjentów prezentowały pośrednie wartości. Spadek ilości komórek Fas<sup>+</sup> w obrębie kolonosfery (HCT116 – z 96% na 16%, HT29 - z 92% do 1% komórek w kolonosferach) związany był ze zmianą sposobu hodowli, a analiza statystyczna wykazała wysoką korelację pomiędzy odsetkiem komórek CD133<sup>+</sup> i Fas<sup>+</sup> ( $R=0.8$ ;

$p < 0.05$ ). Jednocześnie cytometryczna analiza stężenia rozpuszczalnej formy FasL wykazała, że żadne z badanych populacji nie wydzielały tego białka do medium. Tak znaczący spadek odsetka komórek Fas<sup>+</sup> prawdopodobnie wynika z adaptacji komórek RJG do zmienionych warunków ekspansji. Z jednej strony, zgodnie z hipotezą dotyczącą DICE, białko Fas jest wciąż obecne na powierzchni, by uniknąć tego specyficznego typu śmierci komórkowej. Z drugiej strony zaś, komórki guza obniżając poziom receptora zaangażowanego w indukcję programowanej śmierci, zmniejsza swoją wrażliwość na tego typu sygnały uciekając przed komórkami układu odpornościowego.

Druga część pracy opisuje wyniki analizy wpływu agonistycznego przeciwciała anti-Fas na właściwości komórek obu linii RJG. W wyniku takiego traktowania nie zaobserwowaliśmy znacznego natężenia apoptozy komórek Fas<sup>+</sup> w hodowli, wręcz przeciwnie. Analiza komórek w hodowli adherentnej pokazała tylko wzrost proporcji komórek CD133<sup>+</sup>CD44-CD29<sup>+</sup> i spadek tempa proliferacji, bez wpływu na żywotność. Bardziej istotne różnice obserwowałam dla komórek hodowanych w postaci kolonosfer. Wpływ traktowania przy użyciu agonistycznych przeciwciał anti-Fas zależał od linii, jednakże kolonosfery obu linii wykazały wzrost proporcji NKM o fenotypie CD133<sup>+</sup>. Wyniki dokładniejszej analizy cytometrycznej sugerują, że inkubacja z przeciwciałami anti-Fas działa wybiórczo na komórki CD44<sup>+</sup>, ponieważ zaobserwowałam znaczący spadek ich liczby zarówno w obrębie puli komórek CD133<sup>+</sup> jak i CD133<sup>-</sup>. Jednocześnie, warunki hodowli nie zwiększały proporcji komórek apoptotycznych, ale powodowały wzrost rozmiarów kolonosfer w porównaniu do komórek inkubowanych z przeciwciałami kontroli izotypowej.

Trzecia część tej publikacji obejmuje analizę metodą real-time PCR ekspresji genów dla Fas i FasL w grupie pacjentów z RJG. Grupę kontrolną stanowiły fragmenty zdrowej tkanki od zdrowych ochotników. Wyniki uwiarygodniły 80-krotnie wyższe stężenie mRNA dla FasL w próbach RJG w porównaniu do prób kontrolnych. Ekspresja genu dla Fas była tylko nieznacznie wyższa, chociaż wykazywała wyraźną tendencję wzrostową. Analiza korelacji ekspresji obu tych białek wykazała wysoką zależność ( $R=0.54$ ,  $p < 0.05$ ). Poza tym, w próbach otrzymanych od pacjentów z bardziej zaawansowaną chorobą nowotworową (TNM 3-4) była znamienne wyższa ekspresja FasL w porównaniu do pacjentów z łagodniejszą postacią RJG (TNM 1-2). Wyniki uzyskane po analizie komórek linii HCT116 i HT29 zdają się pasować do powyższej hipotezy. Komórki linii HCT116 (TNM3) posiadały wyższy odsetek komórek pozytywnych pod względem obu białek w porównaniu do komórek kolonosfer wywodzących się z linii HT29 (TNM2).

## Podsumowanie publikacji 2

Wyniki poniższej publikacji potwierdzają, że zastosowane warunki hodowli w medium bezsurowiczym pozwalają uzyskać trójwymiarowe kolonosfery, które były wzbogacone w komórki o pierwotnym fenotypie – NKM. Zaobserwowałam również znaczne różnice we właściwościach komórek linii RJG hodowanych w postaci adherentnej i sferycznej, jednocześnie podkreślając podobieństwo właściwości komórek linii RJG z hodowli sferycznej do hodowli komórek pobranych od pacjentów.

Ponieważ DICE zostało opisane jako nowy rodzaj śmierci komórkowej, na który wrażliwe są tylko komórki nowotworowe, a szczególnie NKM, to kwestia znaczenia ścieżki Fas dla różnych aspektów biologii tych komórek wydaje się jeszcze ważniejsza. NKM są populacją, która odpowiada za nieskuteczność terapii pacjentów z RJG, więc wszelkie próby zaprzęgnięcia tej ścieżki w celu zwiększenia wydajności leczenia są warte rozważenia. Wyniki powyższej pracy jednoznacznie sugerują, że ścieżka Fas pełni kluczowe funkcje w NKM, więc dalsza ich analiza powinna stać się celem kolejnych badań. Wyniki uzyskane w czasie realizacji zaplanowanych doświadczeń tak bardzo mnie zainspirowały, że analiza znaczenia ścieżki Fas w biologii NKM RJG stała się celem kolejnych doświadczeń. Efekty kolejnej części z nich zostały ujęte w mojej ostatniej pracy włączonej do cyklu habilitacyjnego.

## Publikacja 3

*Olejniczak A., Szaryńska M., Kmieć Z. In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines. Int. J. Oncol. 2018;52 (2): 599-612.*

Praca nr 3 wliczona do cyklu habilitacyjnego jest podsumowaniem optymalizacji hodowli komórek linii RJG człowieka w postaci kolonosfer, analizy właściwości otrzymanych komórek oraz porównania ich z cechami komórek występujących w modelu adherentnym tych linii. Stanowi ona kluczową pozycję, gdyż tworzy podstawę do testowania różnorodnych związków o potencjale przeciwnowotworowym z wykorzystaniem modelu hodowli trójwymiarowych kolonosfer, a zatem umożliwia realizację dalszych planów naukowych. Praca ta powstała dzięki współpracy z dr Agatą Olejniczak-Kęder, więc obie stałyśmy się równoważnymi współautorami (Equal contribution).

Optymalizacja warunków ekspansji komórek w hodowli obejmowała dobór właściwych suplementów by pożywka mogła promować przeżycie i podziały komórek nowotworowych w formie sferycznych agregatów. Warunkiem utrzymania komórek w ich pierwotnej, niezróżnicowanej formie było zastosowanie pożywki bez surowicy, a zamiast niej dodanie

szeregu suplementów niezbędnych do przeżycia komórek. Podstawą okazało się użycie dwóch czynników wzrostowych - EGF i bFGF, zwiększających potencjał do podziałów i przeżycia pierwotnych komórek. Kolonosfery tworzone przez komórki obu linii charakteryzowały się innymi parametrami morfometrycznymi. Sfery z linii HCT116 miały większe rozmiary, o średnicy przekraczającej 300  $\mu\text{m}$ , gęściej upakowane komórki i regularny kontur. Z kolei kolonosfery z linii HT29 były znacząco mniejsze, posiadały około 200  $\mu\text{m}$  średnicy, i cechowały się nieregularnym kształtem.

Cytometryczna analiza fenotypu NKM bazowała na określaniu proporcji komórek posiadających markery najczęściej wykorzystywane przez inne grupy badawcze, tj. CD133, CD29, CD44, EpCAM, Bmi-1, Lgr-5. Komórki pozytywne pod względem obecności wymienionych markerów występowały zarówno na powierzchni komórek w modelu sferycznym jak i adherentnym. Jednak w zależności od wykorzystanego markera, odsetek ten był zmienny i wskazywał, iż to postać 2D posiada wyższą proporcję komórek o ekspresji białek markerowych dedykowanych NKM. Hodowle adherentne charakteryzowały się praktycznie 100% odsetkiem komórek CD133<sup>+</sup>, podczas gdy kolonosfery utworzone z komórek linii HCT116 i HT29 miały odpowiednio po około 70% i 45% komórek o tym fenotypie.

W kolejnym etapie została określona żywotność komórek w czasie hodowli. Wykorzystałam barwnik 7-AAD, który pozwolił na oszacowanie odsetka martwych komórek, gdyż interkaluje on do dwuniciowego DNA komórek mających uszkodzoną błonę komórkową. Po przeanalizowaniu komórek w hodowli sferycznej okazało się, że odsetek martwych komórek przekracza poziom 70%, podczas gdy w hodowlach adherentnych – jest to wartość kilku procent. Analiza komórek z wykorzystaniem aneksyny V i jodku propidyny pozwoliła stwierdzić, że około 90% spośród nich to komórki apoptotyczne, a pozostała frakcja jest utworzona z komórek nekrotycznych. Obserwacje dotyczące żywotności komórek w prowadzonych hodowlach kolonosfer potwierdzają, że ten model hodowli odzwierciedla architekturę guzów *in vivo*, w których najgłębiej umiejscowione komórki są uznane za apoptotyczne i/lub nekrotyczne. Dodatkowo, wysoka liczba tych komórek w hodowli sferycznej wiązała się z zastosowaniem pożywki wspierającej utrzymanie komórek niezróżnicowanych, pierwotnych, a komórki proliferujące i różnicujące się ulegały śmierci komórkowej z braku odpowiednich czynników wzrostowych bądź na drodze *anoikis*. Pomimo tak wysokiej proporcji komórek 7-AAD-pozytywnych w hodowlach sferycznych, liczba komórek żywych utrzymywała się na stałym poziomie, a komórki mogły być hodowane w postaci kolonosfer w sposób ciągły przez wiele tygodni.

Następnie przeprowadzono analizę właściwości proliferacyjnych komórek dzięki liczeniu żywych komórek w hodowli przy wykorzystaniu komory Fuchsa-Rosenthala. Ta żmudna, ale dokładna metoda pozwalała jednocześnie na analizę morfologii komórek w bieżącej hodowli. Ponadto, zastosowałam barwnik CFSE, który wnikał do komórek i wiązał się z wewnątrzkomórkowymi aminami emitując fluorescencję proporcjonalną do ilości zakumulowanego barwnika, tzn. im komórka rzadziej się dzieliła, tym więcej CFSE w swoim wnętrzu zachowała. Zaobserwowałam, że w obrębie hodowli sferycznych znajdują się komórki o wysokim tempie podziałów, które prawdopodobnie rekompensują straty komórek wspomniane powyżej. Jednocześnie, należy podkreślić, iż komórki w modelu sferycznym cechują się ogólnym niższym tempem proliferacji w porównaniu do komórek w hodowli adherentnej. Nasze wyniki sugerują, że w obrębie kolonosfer mniejszy odsetek komórek ulega podziałom w porównaniu do komórek hodowanych w formie 2D, w których to prawie 100% i 75% populacji wykazywała aktywność podziałową w hodowli, odpowiednio, komórek linii HCT116 i HT29. Ocena proporcji komórek w poszczególnych fazach cyklu, potwierdziła powyższe wnioski. Ponad 60% komórek w hodowli sferycznej znajdowała się w fazie G1/G0, która odpowiada komórkom wyciszonym, do których, zgodnie z literaturą, zalicza się NKM.

Druga część tego manuskryptu prezentuje szczegółowe obserwacje komórek po separacji magnetycznej, zawiera porównanie właściwości komórek CD133-pozytywnych i CD133-negatywnych (rozdzielonych metodą separacji magnetycznej) hodowanych w medium bezsurowiczym w postaci kolonosfer. Komórki obu frakcji miały zdolność tworzenia sfer, które jednak znacząco różniły się rozmiarem. Analiza fenotypowa potwierdziła, że zaledwie 20% z komórek CD133-negatywnych miało na swojej powierzchni inne kluczowe markery, podczas gdy komórki CD133-pozytywne miały znacznie wyższy odsetek komórek CD29<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> (odpowiednio 80% i 60% dla komórek linii HCT116 i HT29). Dodatkowo, po analizie komórek z wykorzystaniem barwnika CFSE, zaobserwowaliśmy, że komórki frakcji CD133-pozytywnej uzyskanej z obu linii RJG charakteryzowały się wyższym tempem proliferacji w porównaniu do komórek CD133<sup>-</sup>. Jednocześnie, komórki linii HCT116 posiadały większy odsetek dzielących się komórek we frakcji CD133<sup>-</sup>, natomiast komórki linii HT29 – we frakcji CD133<sup>+</sup>.

Aby określić sferogenność (zdolność do odtworzenia kolonosfer) komórek obu frakcji uzyskanej po separacji magnetycznej, komórki zostały wysiane w różnych stężeniach. Siedmiodniowa obserwacja wykazała, że subpopulacje CD133<sup>+</sup> bardzo wydajnie odtworzyły sfery, znacznie zwiększając jednocześnie liczbę komórek w hodowli, natomiast frakcje CD133<sup>-</sup> wytworzyły raczej niewielkich rozmiarów skupiska komórek, przypominających luźno upakowane agregaty. Hodowla komórek w Matrigelu, który stanowi substytut macierzy

zewnątrzkomórkowej, pozwoliła na określenie zdolności do degradacji macierzy i ekspansji komórek obu frakcji z obydwu linii. Eksperyment potwierdził większe zdolności migracyjne komórek obu frakcji pochodzących z linii HCT116, w porównaniu do komórek HT29. Te obserwacje są prawdopodobnie powiązane z wyższym stopniem progresji RJG linii HCT116 niż HT29, które wynosiły odpowiednio TNM3 i TNM2.

### Podsumowanie publikacji 3

Przedstawione wyniki pokazują, że hodowla sferyczna lepiej odzwierciedla warunki wzrostu guza *in vivo*, w porównaniu do modelu adherentnego. Moje obserwacje potwierdziły heterogenność populacji komórkowych w obrębie kolonosfer, w których komórki o cechach NKM nie dominowały w 100%, co zdaje się być spójne z analizą guzów pobranych od pacjentów. Biorąc pod uwagę moje obserwacje, można stwierdzić, że hodowle sferyczne stanowią bardziej wiarygodny model badawczy. W obrębie sfer występują komórki proliferujące, wyciszone, nekrotyczne i martwe, które są również obserwowane w warunkach naturalnych. Ta trójwymiarowa forma ekspansji *in vitro* naśladuje architekturę wzrastających guzów litych, czego nie obserwuje się w hodowlach adherentnych.

Z kolei izolacja magnetyczna komórek o fenotypie CD133<sup>+</sup> udowodniła, że komórki te posiadają zdecydowanie większy potencjał sferogeny oraz zdolność proliferacyjną niezbędną do odtworzenia kolonosfer w porównaniu do frakcji komórek CD133<sup>-</sup>. Jednocześnie uznałam, że wykorzystanie tylko jednego białka do separacji NKM wydaje się nie wystarczające. Zdają się potwierdzać to obserwacje, gdzie komórki CD133<sup>-</sup> także posiadają pewne właściwości, które mogłyby zostać przypisane NKM. Należy także podkreślić, że kolonosfery pochodzące z wykorzystanych linii komórkowych przejawiały niekiedy rozbieżne cechy, co najprawdopodobniej związane jest z różnicami w agresywności i stopniu zróżnicowania komórek występujących w obrębie tych linii. Linie HCT116 i HT29 prezentują inne stopnie zaawansowania choroby w klasyfikacji TNM.

### Publikacja 4

*Szaryńska M., Olejniczak-Kęder A., Zubrzycki A., Wardowska A., Kmieć Z. Aspirin exerts synergistic effect with anti-Fas stimulation against colorectal cancer stem cells in vitro. Appl. Sci. 2021;11 (21): 1-15.*

Ostatnia praca włączona do cyklu została zainspirowana badaniami wstępnymi, w których po dodaniu aspiryny (ASA) do komórek traktowanych przeciwciałami anti-Fas zaobserwowałam znaczące różnice w ich właściwościach. Wykorzystując warsztat metodyczny

i sferyczny model hodowli linii komórkowych RJG przeprowadziłam analizę wybranych właściwości komórek nowotworowych (a wśród nich populacji NKM) po traktowaniu ASA. W literaturze brak jest doniesień analizujących takie rozwiązanie w terapii RJG. Zarówno ASA jak i przeciwciała anti-Fas są oddzielnie wykorzystywane w wielu różnych koncepcjach eksperymentalnych lub terapeutycznych (włączając w to strategie przeciwnowotworowe), jednak ich łączne zastosowanie nie zostało wcześniej przebadane. Zaskakujące wyniki moich wstępnych obserwacji oraz nowatorskość mojego podejścia eksperymentalnego, skłoniło mnie do kontynuowania poniższych badań.

Na podstawie analiz wstępnych zostały oznaczone wartości IC<sub>50</sub> dla ASA dla każdej z linii, chociaż większość testów przeprowadziłam z użyciem ASA w trzech stężeniach (1.25 mM, 2.2 mM i 2.5 mM dla HCT116; 1.25 mM, 1.8 mM i 2.5 mM dla HT29), to dla uproszczenia przekazu w finałowej wersji manuskryptu znalazły się wyniki uzyskane tylko z ASA w stężeniu równym wartości IC<sub>50</sub>, były to wartości 2.2mM oraz 1.8mM, odpowiednio dla linii HCT116 i HT29. ASA w pozostałych stężeniach wywoływała podobne efekty po traktowaniu komórek obu linii, niektóre z nich były proporcjonalne do stężenia, co zaznaczyłam w publikacji.

Pod wpływem traktowania ASA i przeciwciałami anti-Fas kolonosfer uzyskanych z komórek linii HCT116 i HT29 zaobserwowano następujące zmiany:

- Zmniejszenie rozmiarów sfer
- Spadek proporcji komórek CD133<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> i CD29<sup>+</sup>
- Wzrost liczby komórek posiadających na swojej powierzchni receptor Fas
- Zwiększenie poziom apoptozy komórek w hodowli
- Wzrost ekspresji kaspazy 2 i 3

Większość z tych obserwacji była znamienne różna od tych, które wykazałam po traktowaniu komórek tylko przy użyciu ASA. Moje wyniki wskazują, że ASA odwraca pro-nowotworowe funkcje ścieżki Fas w NKM. Zwiększenie proporcji komórek posiadających na swojej powierzchni receptor Fas może świadczyć o zwiększonej wrażliwości tych komórek na czynniki pro-apoptotyczne, co zostało potwierdzone przez zwiększony poziom kaspazy 3. Dodatkowo, wyniki wykazały niższy odsetek komórek o fenotypie typowym dla NKM, co może świadczyć o przejściu ich w stan wyciszenia o znacznie obniżonej aktywności. Jeżeli do tych obserwacji dołożymy spadek ich aktywności proliferacyjnej, to można przypuszczać, że połączenie ASA i przeciwciał anti-Fas, wykazuje wysoki potencjał przeciwnowotworowy.

W drugiej części pracy wykorzystałam warsztat badawczy dotyczący modyfikacji w warunkach *in vitro* komórek dendrytycznych (DC) przy użyciu lizatów komórkowych. Lizaty komórek linii RJG przygotowane po traktowaniu komórek przy użyciu ASA i przeciwciał anti-Fas zostały dodane do hodowli komórek DC. Analiza biologiczna przeprowadzona po 24-godzinnej inkubacji wykazała, że wpływ lizatów na właściwości komórek DC zależał od linii komórkowej użytej do wykonania lisatu. Lizaty wykonane z komórek HCT116 po traktowaniu ASA i przeciwciałami anti-Fas sprawiły, że komórki DC były dłuższe w porównaniu do komórek kontroli nietraktowanej, podczas gdy lizaty z linii HT29 nie zaindukowały wydłużania się tych komórek immunokompetentnych. Podobne zależności wykazałam odnośnie fenotypu komórek DC. Lizaty pochodzące z komórek HCT116 wykazały bardziej znamienne wpływy na proporcje zaktywowanych komórek DC i wzrost na ich powierzchni ekspresji charakterystycznych markerów (HLA-DR, CD11c, CD80 oraz CD83), niż lizaty uzyskane z traktowanych komórek HT29, pomimo, iż one również wywołały istotne efekty.

#### **Podsumowanie publikacji 4**

Wyniki czwartej publikacji włączonej do cyklu sugerują, że łączne traktowanie komórek RJG przy użyciu ASA i przeciwciał anti-Fas może przynieść wymierne korzyści, kiedy włączy się je do terapii pacjentów z RJG. ASA zdaje się być swoistym molekularnym przełącznikiem dwóch przeciwnych aktywności ścieżki Fas – pro-apoptotycznej versus promującej właściwości NKM. Dodatkowo, wydaje się, że równowaga pomiędzy poszczególnymi kaspazami: kaspazą 2 i kaspazą 3 może mieć kluczowe znaczenia dla całkowitego efektu traktowania komórek przy użyciu ASA i przeciwciałami anti-Fas. ASA ma prawdopodobnie znaczący wpływ na regulowania poziomów obu kaspaz w komórkach RJG będących jednocześnie pod wpływem stymulacji ścieżki Fas. To nowatorskie podejście wymaga dalszych badań, co, mam nadzieję, stanie się celem moich kolejnych projektów.

#### **Podsumowanie osiągnięcia habilitacyjnego**

Prezentowany cykl prac dotyczy kolejnych etapów realizacji głównego celu, a mianowicie: analizy roli ścieżki Fas w populacji NKM RJG człowieka hodowanych w postaci trójwymiarowych kolonosfer. W pierwszym etapie przeprowadziłam złożoną ewaluację metody hodowli komórek RJG w postaci kolonosfer czyli w warunkach jak najbardziej zbliżonych do tych, jakie panują w obrębie guza litego. Opracowana została pożywka hodowlana, która wybiórczo promuje przeżycie i funkcjonowanie komórek o pierwotnym



potencjale, czyli NKM. Aby udowodnić wyższość hodowli sferycznej nad adherentną, która jest powszechnie wykorzystywana dla linii dostępnych komercyjnie, przeprowadziłam złożone analizy porównawcze właściwości komórek utrzymywanych w obu typach hodowli. Słuszność mojego założenia zdaje się potwierdzać podobieństwo wyników uzyskanych przy użyciu linii RJG hodowanych w postaci kolonosfer, do rezultatów obserwowanych dla komórek uzyskanych z fragmentów guzów pobranych od pacjentów z RJG.

Na bazie tak przygotowanego modelu, mogłam prowadzić analizę wpływu agonistycznego przeciwciała anty-Fas na komórki w hodowli. Okazało się, że taka stymulacja nie wykazywała pro-apoptotycznych właściwości, wręcz przeciwnie, zaobserwowałam, że miało to korzystny wpływ na ich przeżywalność, sferogenność i fenotyp. W obliczu tego, wielkim zaskoczeniem okazało się, że po dodaniu ASA do takich traktowanych kolonosfer, ten efekt został zatrzymany lub wręcz odwrócony. Wyników moich badań sugerują, że nowatorskie połączenie stymulacji ścieżki Fas oraz szlaków molekularnych zależnych od ASA może dać wymierne korzyści wynikające z tego, że ich celem wydają się być NKM. W związku z tym, kolejnym moim wyzwaniem będą poszukiwania białek komórkowych, które stoją na skrzyżowaniu tych dwóch szlaków sygnalizacyjnych. Udało mi się wykazać, że ASA moduluje przebieg sygnału ścieżki Fas, aktywuje molekularny przełącznik we wnętrzu NKM, który w przyszłości mógłby stać się celem terapeutycznym.

## Bibliografia

1. Jaroszyńska Z and Wiśniewska K: Epidemiology of colorectal cancer (C18-C21) in Poland. *Journal of Education, Health and Sport* 11: 143-156, 2021.
2. World Cancer Report. Cancer research for cancer prevention. P. WC, Elisabete W and W. SB (eds.) International Agency for Research on Cancer, Lyone. France, 2020.
3. Krzakowski M. WK: Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. VM Media Sp z o.o. VM Group sp. k. ( Grupa Via Medica), 2013.
4. Manhas J, Bhattacharya A, Agrawal SK, et al.: Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2016.
5. Di Franco S, Todaro M, Dieli F and Stassi G: Colorectal cancer defeating? Challenge accepted! *Molecular aspects of medicine* 39: 61-81, 2014.
6. Khan K, Wale A, Brown G and Chau I: Colorectal cancer with liver metastases: neoadjuvant chemotherapy, surgical resection first or palliation alone? *World journal of gastroenterology : WJG* 20: 12391-12406, 2014.
7. Paldino E, Tesori V, Casalbore P, Gasbarrini A and Puglisi MA: Tumor initiating cells and chemoresistance: which is the best strategy to target colon cancer stem cells? *BioMed research international* 2014: 859871, 2014.
8. Salama P and Platell C: Colorectal cancer stem cells. *ANZ J Surg* 79: 697-702, 2009.
9. Ricci-Vitiani L, Fabrizio E, Palio E and De Maria R: Colon cancer stem cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87: 1097-1104, 2009.
10. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445: 111-115, 2007.

11. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
12. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al.: Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 13820-13825, 2009.
13. Frank NY, Schatton T and Frank MH: The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *The Journal of clinical investigation* 120: 41-50, 2010.
14. Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50: 113-130, 2007.
15. Isoda T, Nakatsu Y, Yamauchi K, et al.: Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* 10: 940-947, 2014.
16. Rogler G: Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett* 345: 235-241, 2014.
17. Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
18. Yonehara S, Ishii A and Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756, 1989.
19. Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178, 1993.
20. Li H, Fan X, Stoicov C, et al.: Human and mouse colon cancer utilizes CD95 signaling for local growth and metastatic spread to liver. *Gastroenterology* 137: 934-944, 944.e931-934, 2009.
21. Hoogwater FJ, Nijkamp MW, Smakman N, et al.: Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 138: 2357-2367, 2010.
22. Kykalos S, Mathaiou S, Karayiannakis AJ, Patsouras D, Lambropoulou M and Simopoulos C: Tissue expression of the proteins fas and fas ligand in colorectal cancer and liver metastases. *Journal of gastrointestinal cancer* 43: 224-228, 2012.
23. Nijkamp MW, Hoogwater FJ, Steller EJ, et al.: CD95 is a key mediator of invasion and accelerated outgrowth of mouse colorectal liver metastases following radiofrequency ablation. *Journal of hepatology* 53: 1069-1077, 2010.
24. Strater J, Hinz U, Hasel C, et al.: Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma: clinical evidence for immunoselection and CD95L mediated control of minimal residual disease. *Gut* 54: 661-665, 2005.
25. Zhang W, Ding EX, Wang Q, et al.: Fas ligand expression in colon cancer: a possible mechanism of tumor immune privilege. *World journal of gastroenterology : WJG* 11: 3632-3635, 2005.
26. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, et al.: The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. In: *Cell death and differentiation, England*, pp 885-886, 2015.
27. Park MA, Reinehr R, Haussinger D, et al.: Sorafenib activates CD95 and promotes autophagy and cell death via Src family kinases in gastrointestinal tumor cells. *Mol Cancer Ther* 9: 2220-2231, 2010.
28. Yin XH, Han YL, Zhuang Y, Yan JZ and Li C: Geldanamycin inhibits Fas signaling pathway and protects neurons against ischemia. *Neurosci Res* 124: 33-39, 2017.
29. Concannon CG1 FU, Holmberg CI, Szegezdi E, Sistonen L, Samali A.: CD95-mediated alteration in Hsp70 levels is dependent on protein stabilization. *Cell Stress Chaperones*. 10: 59-65., 2005.
30. Ivanov VN, Lopez Bergami P, Maulit G, Sato TA, Sassoon D and Ronai Z: FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Molecular and cellular biology* 23: 3623-3635, 2003.
31. Ivanov VN, Ronai Z and Hei TK: Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 281: 1840-1852, 2006.
32. Igney FH and Krammer PH: Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 54: 1127-1136, 2005.
33. Martin-Villalba A, Llorens-Bobadilla E and Wollny D: CD95 in cancer: tool or target? *Trends in molecular medicine* 19: 329-335, 2013.
34. Chen L, Park SM, Tumanov AV, et al.: CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465: 492-496, 2010.
35. Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, et al.: Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell death and differentiation* 13: 31-40, 2006.
36. Corsini NS, Sancho-Martinez I, Laudenklos S, et al.: The death receptor CD95 activates adult neural stem cells for working memory formation and brain repair. *Cell stem cell* 5: 178-190, 2009.
37. Hadji A, Ceppi P, Murmann AE, et al.: Death induced by CD95 or CD95 ligand elimination. *Cell reports* 7: 208-222, 2014.

38. Ceppi P, Hadji A, Kohlhapp FJ, et al.: CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. *Nat Commun* 5: 5238, 2014.
39. Schickel R, Park SM, Murmann AE and Peter ME: miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell* 38: 908-915, 2010.
40. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al.: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364: 806-809, 1993.
41. Xu Y, Szalai AJ, Zhou T, et al.: Fc gamma Rs modulate cytotoxicity of anti-Fas antibodies: implications for agonistic antibody-based therapeutics. *J Immunol* 171: 562-568, 2003.
42. Eisele G, Roth P, Hasenbach K, et al.: APO010, a synthetic hexameric CD95 ligand, induces human glioma cell death in vitro and in vivo. *Neuro Oncol* 13: 155-164, 2011.
43. Blaes J, Thomé CM, Pfenning PN, et al.: Inhibition of CD95/CD95L (FAS/FASLG) Signaling with APG101 Prevents Invasion and Enhances Radiation Therapy for Glioblastoma. *Mol Cancer Res* 16: 767-776, 2018.
44. Wick W, Fricke H, Junge K, et al.: A phase II, randomized, study of weekly APG101+reirradiation versus reirradiation in progressive glioblastoma. *Clin Cancer Res* 20: 6304-6313, 2014.
45. Binefa G, Rodriguez-Moranta F, Teule A and Medina-Hayas M: Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 20: 6786-6808, 2014.
46. Sauer R, Liersch T, Merkel S, et al.: Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 30: 1926-1933, 2012.
47. Weichert W, Knösel T, Bellach J, Dietel M and Kristiansen G: ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol* 57: 1160-1164, 2004.
48. Wahab SM, Islam F, Gopalan V and Lam AK: The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2017.
49. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng LF, Tan ST and Itinteang T: Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol* 71: 110-116, 2018.
50. Nowak D, Stewart D and Koeffler HP: Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* 113: 3655-3665, 2009.
51. Chung SS, Oliva B, Dwabe S and Vadgama JV: Combination treatment with flavonoid morin and telomerase inhibitor MST312 reduces cancer stem cell traits by targeting STAT3 and telomerase. *Int J Oncol* 49: 487-498, 2016.
52. Martino-Echarri E, Henderson BR and Brocardo MG: Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy. *Oncotarget* 5: 9889-9900, 2014.
53. Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890, 2009.
54. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715, 2008.
55. Sabatino L, Pancione M, Votino C, et al.: Emerging role of the beta-catenin-PPARgamma axis in the pathogenesis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20: 7137-7151, 2014.
56. Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, et al.: Activation of Notch signaling in human colon adenocarcinoma. *Int J Oncol* 33: 1223-1229, 2008.
57. Guilmeau S, Flandez M, Mariadason JM and Augenlicht LH: Heterogeneity of Jagged1 expression in human and mouse intestinal tumors: implications for targeting Notch signaling. *Oncogene* 29: 992-1002, 2010.
58. Huang R, Wang G, Song Y, et al.: Colorectal cancer stem cell and chemoresistant colorectal cancer cell phenotypes and increased sensitivity to Notch pathway inhibitor. *Mol Med Rep* 12: 2417-2424, 2015.
59. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, et al.: NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. *Oncogene* 32: 4397-4405, 2013.
60. Han J, Zhang F, Yu M, et al.: RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cancer Lett* 321: 80-88, 2012.
61. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al.: Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem Cells* 30: 2076-2087, 2012.
62. Abetov D, Mustapova Z, Saliev T and Bulanin D: Biomarkers and signaling pathways of colorectal cancer stem cells. *Tumour Biol* 36: 1339-1353, 2015.
63. Llopiz D, Dotor J, Casares N, et al.: Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int J Cancer* 125: 2614-2623, 2009.
64. Lubbe SJ, Pittman AM, Matijssen C, et al.: Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. *Hum Mutat* 32: E1928-1938, 2011.

65. Karagiannis GS, Afaloniati H, Karamanavi E, Poutahidis T and Angelopoulou K: BMP pathway suppression is an early event in inflammation-driven colon neoplasmatogenesis of uPA-deficient mice. *Tumour Biol* 37: 2243-2255, 2016.
66. Catalano V, Dentice M, Ambrosio R, et al.: Activated Thyroid Hormone Promotes Differentiation and Chemotherapeutic Sensitization of Colorectal Cancer Stem Cells by Regulating Wnt and BMP4 Signaling. *Cancer Res* 76: 1237-1244, 2016.
67. Zu G, Ji A, Zhou T and Che N: Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta analysis. *Int J Surg* 26: 32-37, 2016.
68. Yamakuchi M, Ferlito M and Lowenstein CJ: miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13421-13426, 2008.
69. Chen X, Sun K, Jiao S, et al.: High levels of SIRT1 expression enhance tumorigenesis and associate with a poor prognosis of colorectal carcinoma patients. *Sci Rep* 4: 7481, 2014.
70. Nie Z, Zhu H and Gu M: Reduced colorectal cancer incidence in type 2 diabetic patients treated with metformin: a meta-analysis. *Pharm Biol*: 1-7, 2016.
71. Zhang Y, Guan M, Zheng Z, Zhang Q, Gao F and Xue Y: Effects of metformin on CD133+ colorectal cancer cells in diabetic patients. *PLoS One* 8: e81264, 2013.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Szczegółowy wykaz pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych znajduje się w załączniku „Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, odbytych stażach, współpracy z instytucjami i o działalności popularyzującej naukę”.

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przedstawiona jest w załącznikach „Analiza bibliometryczna publikacji dr Magdaleny Szaryńskiej w postępowaniu o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego” oraz „Wskaźniki bibliometryczne publikacji autorstwa dr Magdaleny Szaryńskiej stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 12 ust. 2 ustawy” (szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego).

### 5.1. Analiza Bibliometryczna

Na dzień 9.02.2022

Sumaryczny Impact Factor (wyłączając dzieło)	57.991
Łączna liczba punktów MEiN (wyłączając dzieło)	663
Wartość IF za prace, w których kandydat jest pierwszym autorem (po doktoracie, wyłączając dzieło)	38.857
Liczba prac oryginalnych i poglądowych (po doktoracie, wyłączając dzieło)	11
Liczba prac, w których kandydat jest pierwszym autorem (po doktoracie, wyłączając dzieło)	7
Doniesienia konferencyjne	21
Liczba cytowań wg <i>Web of Science Core Collection / Scopus</i>	209/209
Indeks Hirscha ( <i>Web of Science / Scopus</i> )	8/8
Łączna liczba cytowań (bez autocytowań) ( <i>Web of Science / Scopus</i> )	194/195

Moje zainteresowania naukowe po obronie doktoratu, poza omówioną w ww. cyklu rolę ścieżki Fas w nowotworowych komórkach macierzystych raka jelita grubego, skupiają się również na badaniach innych aspektów dotyczących biologii nowotworów czy zastosowaniu w terapii komórek immunokompetentnych po modyfikacji *in vitro*. Dodatkowo angażowałam się w badania stanowiące kontynuację doświadczeń rozpoczętych w trakcie trwania mojej pracy magisterskiej i projektu doktorskiego. Miałam okazję poszerzać mój warsztat badawczy dzięki pomocy doświadczonych współpracowników, ale również dzięki wyjazdom szkoleniowym do renomowanych ośrodków w Warszawie i Krakowie.

## **5.2. Pozostałe prace dotyczyły następujących zagadnień:**

### **5.2.1. Komórki nowotworowe i wybrane elementy ich niszy.**

W okresie, który nastąpił po obronie doktoratu napisałam kilka prac przeglądowych, które stanowiły albo „słowo wstępu” do prowadzonej pracy badawczej albo stały się swoistą naukową dyskusją z publikacjami innych autorów. Pierwsza praca z tej grupy to analiza wiedzy dotyczącej właściwości niszy krwiotwórczych komórek macierzystych w obrębie szpiku kostnego. Druga z nich, wykorzystuje tę samą wiedzę jako tło dla zaprezentowania związków aktywowanych hipoksją jako jednych z proponowanych rozwiązań w terapii nowotworów krwi. Takie związki terapeutyczne mogłyby dokładnie celować w miejsca namnażania się komórek nowotworowych, gdyż byłyby one aktywowane tylko w miejscach o obniżonym stężeniu parcjalnych tlenu – czyli w miejscach, gdzie panują warunki hipoksji.

W tej grupie publikacji są również dwa obszernie komentarze do innych publikacji. Pierwsza z tych prac przeciwstawia wnioski wynikające z moich obserwacji wynikom uzyskanym przez autorów, które podkreślają negatywną rolę lipopolisacharydu ścian bakterii (LPSu) obecnego w miejscu rozwoju raka jelita grubego. Wyniki moich badań sugerują, że LPS może stanowić pozytywny modulator funkcji komórek dendrytycznych, kiedy użyje się go do modyfikacji tych immunokompetentnych komórek w warunkach *in vitro*. Moje wnioski mogą wskazywać na ważną biologiczną rolę tej cząsteczki, która przecież występuje w dużych ilościach w niszy jelitowej. Drugi komentarz powstał po przeczytaniu ciekawego artykułu opisującego znaczenia hormonów tarczycy w regulacji funkcji zarówno zdrowych komórek jak i komórek w procesie kancerogenezy. Publikacja Liu i wsp. prezentuje molekularne elementy osi podwzgorze – przysadka – tarczyca, w tym role receptorów dla hormonów tarczycy. W tym miejscu znajdowały się błędne informacje, które zostały skorygowane przeze mnie w

powyższym komentarzu, aby nie wprowadzać w błąd przyszłych czytelników. Zostało to zilustrowane czytelną tabelką umieszczoną w tekście.

Ostatnia z prac tej grupy szeroko przedstawia kontrowersje dotyczące znaczenia ścieżki Fas w komórkach nowotworowych. Najlepiej poznana jest pro-apoptotyczna funkcja efektorów tej ścieżki, lecz w świetle nowych odkryć okazuje się, że została ona zaprzęgnięta również w czasie transformacji nowotworowej do zwiększenia przeżywalności komórek nowotworowych, uodpornienia się na sygnały apoptotyczne, a typ śmierci określanej jako DICE stanowić może jeden z naturalnych mechanizmów eliminujących komórki nowotworowe posiadające na swojej powierzchni cząsteczki Fas lub/i FasL.

1. Olejniczak A., Szaryńska M., Kmieć Z. *Rola nisz szpiku kostnego oraz hipoksji w regulacji aktywności krwiotwórczych komórek macierzystych*. Post. Biol. Kom. 2016 : t. 43, nr 2, s. 305.
2. Olejniczak A., Szaryńska M. *Związki aktywowane hipoksją w leczeniu nowotworów krwi i guzów litych*. Post. Biol. Kom. 2016 : t. 43, nr 4, s. 579-596.
3. Szaryńska M., Olejniczak-Kęder A. *Comment on "Trapping of lipopolysaccharide to promote immunotherapy against colorectal cancer and attenuate liver metastasis"*. Adv. Mater. 2019 : vol. 31, nr 28, art. ID 1900747, s. 1-2.
4. Szaryńska M. *Comment on : Molecular functions of thyroid hormone signaling in regulation of cancer progression and anti-apoptosis*. Int. J. Mol. Sci. 2020 : vol. 21, nr 8, art. ID 2684, s. 1-2.
5. Szaryńska M., Olejniczak-Kęder A. *Different faces of Fas signaling in cancer cells*. Nov. Appr. Cancer Study. 2019 : vol. 3, nr 2, s. 262-264.

### **5.2.2. Analiza funkcji komórek NK w procesie starzenia układu immunologicznego człowieka.**

Powstanie tej pracy było swoistą kontynuacją badań, w których uczestniczyłam w czasie realizacji projektu mojej pracy magisterskiej. Materiał do badań stanowiła surowica krwi pobranej od osób młodych (średnia wieku 26 lat), seniorów poniżej 85 roku życia (średnia wieku 78 lat) i starszych seniorów powyżej 85 roku życia (średnia wieku 91 lat). Jej cel stanowiła szczegółowa ocena parametrów stanu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego i korelacji ich ze stanem aktywacji komórek NK. Wnioski sformułowane na podstawie uzyskanych wyników zdają się potwierdzać istnienie zjawiska opisanego wcześniej w literaturze jako „successful ageing” – czyli „zdrowego starzenia fizjologicznego”. Takie „fizjologiczne starzenie” wymaga utrzymania równowagi pomiędzy poziomem procesów prozapalnych i przeciwzapalnych w organizmie oraz aktywnością komórkowych mechanizmów ochronnych regulujących poziom stresu oksydacyjnego. Wyniki powyższej pracy wskazują również, że zdolność komórek NK do aktywacji aż do bardzo zaawansowanego wieku stanowi jeden z kluczowych składników wpływających na zachowanie owej równowagi.

1. Kaszubowska L., Kaczor J., Hak Ł., Dettlaff-Pokora A., Szaryńska M., Kmieć Z. *Sensitivity of natural killer cells to activation in the process of ageing is related to the oxidative and inflammatory status of the elderly*. J. Physiol. Pharmacol. 2011 : vol. 62, nr 1, s. 101-109.

### **5.2.3. Ocena właściwości komórek dendrytycznych uzyskanych z prekursorów monocytarnych.**

Do realizacji założeń obu tych prac zostały użyte komórki dendrytyczne (KD), które otrzymałam w warunkach laboratoryjnych z monocytów krwi pępowinowej lub obwodowej człowieka. Pierwsza praca wykorzystwała komórki wyizolowane z krwi pępowinowej i stanowi rozwinięcie moich doświadczeń z użyciem krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM). To właśnie w tym czasie po raz pierwszy zetknęłam się z ekspansją KD z prekursorów, zoptymalizowałam metodę ich hodowli i zaczęłam testować różne związki mogące mieć wpływ na stan ich aktywacji. W powyższej pracy dysponowałam KD uzyskanymi z prekursorów z dwóch różnych źródeł. Były to KKM CD34<sup>+</sup> krwi pępowinowej oraz prekursory monocytarne z krwi obwodowej. Pozwoliło mi to na wskazanie, że dobór źródła prekursorów do otrzymania komórek immunokompetentnych ma zasadnicze znaczenia dla właściwości uzyskanych komórek. Krew pępowinowa bowiem stanowi niszę komórkową predysponującą rozwój komórek o cechach supresorowych.

Celem badań opisanych w drugiej pracy z tej grupy było określenie potencjalnej przydatności KD zmodyfikowanych w warunkach *in vitro* w czasie terapii przeciwnowotworowej. Dodatkowo, porównałam wpływ warunków hodowli komórek linii RJG (HCT116 i HT29) na właściwości KD, gdy komórki tych linii były użyte do przygotowania lizatów komórkowych oraz supernatantów z ich hodowli (ang. *TCM, Tumor Conditioned Medium*) – te czynniki stanowiły materiał do stymulacji KD. Poza tym, w czasie procedury traktowania KD dodawałam LPS do wybranych prób analizując jego wpływ na efekt końcowy stymulacji.

Uzyskane w pracy wyniki sugerują, że wykorzystanie modelu sferycznego do hodowli linii komórkowych użytych do modyfikacji KD *in vitro*, lepiej naśladuje naturalnie występujące zjawiska w początkowych etapach odpowiedzi przeciwnowotworowej. Właściwości KD uzyskanych z monocytów krwi pacjentów z RJG traktowanych lizatami z autologicznych komórek nowotworowych przypominały bowiem cechy KD traktowanych lizatami z kolonosfer uzyskanych z linii HCT116 i HT29. KD traktowane lizatami z komórek linii adherentnych wykazywały odmienne właściwości. Zauważyłam, że występowanie określonych konfiguracji markerów NKM w obrębie hodowli sferycznych linii RJG znacząco wpływa na

dojrzewanie i aktywację KD po stymulacji lizatem lub supernatantem z komórek nowotworowych. Wydaje się ponadto, że komórki CD133<sup>+</sup> osłabiały funkcje KD, gdyż im więcej tych komórek występowało w próbce materiału zastosowanego do stymulacji KD, tym mniejszy odsetek zaktywowanych KD odnotowano po inkubacji. Dodatkowo, obserwowane efekty zostały wzmocnione przez zastosowanie LPS. To właśnie te wyniki posłużyły do przedstawienia hipotezy w mojej pracy opublikowanej w Adv. Mater. w 2019 roku, która mówi o pozytywnej funkcji LPSu dla właściwości KD.

1. Szaryńska M., Preis K., Zabul P., Kmieć Z. *Diversity of dendritic cells generated from umbilical cord or adult peripheral blood precursors*. Centr. Eur. J. Immunol. 2018 : vol. 43, nr 3, s. 306.
2. Szaryńska M., Olejniczak A., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z., Kmieć Z. *Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*. Sci. Rep. 2018: vol. 8, art. ID 12042.

#### **5.2.4. Właściwości nowotworowych komórek macierzystych – znaczenie w terapii raka jelita grubego człowieka.**

Pierwsza praca tej grupy jest pracą przeglądową, która powstała w czasie, kiedy przygotowywałam się do części doświadczalnej realizacji celów cyklu prac habilitacyjnych, do badań z użyciem komórek nowotworowych raka jelita grubego (RJG). Dokładnie przestudiowałam literaturę dotyczącą tej tematyki. Owocem tego stała się praca szeroko omawiająca podłoże molekularne rozwoju RJG, a zwłaszcza pojawienie się nowotworowych komórek macierzystych (NKM) w obrębie nabłonka jelita. Kolejne akapity koncentrują się na wybranych aspektach biologii NKM, tj. zdolność do proliferacji, fenotyp, zmiany genetyczne i epigenetyczne. Wykazano, że NKM są w znacznej mierze odpowiedzialne za rozwój oporności na leczenie i tworzenie przerzutów. Omówiono też rolę wybranych elementów niszy tych komórek mających duże znaczenie w czasie progresji RJG.

Druga praca z tej grupy stanowi szeroki opis wyników analizujących wpływ 5-fluorouracylu (5-FU), aspiryny (ASA) oraz przeciwciała skierowanego przeciwko receptorowi EGFR (anty-EGFR) na właściwości komórek występujących w kolonosferach wywodzących się z dwóch linii RJG (HCT116, HT29). Wykazałam, że komórki hodowane w formie kolonosfer stanowią dobry model również do analizy związków o potencjale terapeutycznym, takich, jak zostały użyte w powyższym badaniu. Dodatkowym potwierdzeniem tej tezy jest odmienna wrażliwość komórek utrzymanych w formie adherentnej i sferycznej na zastosowane terapeutyki. Komórki kolonosfer były bardziej odporne na działanie zastosowanych związków. Ponadto, komórki obu użytych linii RJG różniły się stopniem zaawansowania choroby w skali TNM, a fakt, że odpowiadały w odmienny sposób na wykorzystane związki, potwierdza, że komórki utrzymywane w formie sferycznej stanowią swoiste fenokopie guza pierwotnego.



Uzyskane wyniki potwierdzają, że zastosowanie pojedynczego związku wywołuje mniej znaczące efekty w porównaniu do zmian obserwowanych przy użyciu mieszanin dwóch środków. Co więcej, nie całkowicie tożsame wyniki dotyczące obu analizowanych linii komórkowych RJG sugerują, że testowane leki mogą wykorzystywać nieco inne mechanizmy, działające na różne procesy i szlaki sygnałowe w komórce. Na pewno jedną z przyczyn jest odmienny status genetyczny oraz stopień zaawansowania RJG obu zastosowanych linii, co może sugerować, że cechy indywidualne pacjentów powinny być brane pod uwagę w czasie planowania terapii.

1. Szaryńska M., Olejniczak A., Kmieć Z. *The role of cancer stem cells in pathogenesis of colorectal cancer*. Post. Hig. Med. Dośw. (online) 2016 : t. 70, s. 1469-1482.
2. Olejniczak-Kęder A., Szaryńska M., Wrońska A., Siedlecka-Kroplewska K., Kmieć Z. *Effects of 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA on the spherical culture system of HCT116 and HT29 colorectal cancer cell lines*. Int. J. Oncol. 2019 : vol. 55, nr 1, s. 223-242.

### **5.2.5. Analiza różnych aspektów wywierających wpływ na krwiotwórcze komórki macierzyste krwi pępowinowej człowieka.**

Powyższe prace stanowią podsumowanie moich dokonań z zakresu analizy właściwości krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) CD34<sup>+</sup> z krwi pępowinowej i korelacji ich z wybranymi parametrami klinicznymi. Pierwsza z prac zaklasyfikowanych do tej grupy porusza problem ważny z punktu widzenia powodzenia porodu, a mianowicie wpływ obecności osoby bliskiej w czasie jego trwania. Wyniki moich analiz wskazują, że wsparcie psychologiczne ze strony bliskiej osoby w czasie porodu ma wpływ również na objętość krwi pępowinowej oraz na odsetek komórek o największym potencjale. Mniejszą objętość krwi pępowinowej oraz niższy odsetek KKM uzyskałam z porodów, gdzie obecna była osoba bliska. Sugeruje to, że przed planowanym bankowaniem krwi pępowinowej swojego dziecka, należy wziąć pod uwagę wiele różnorodnych aspektów związanych z przebiegiem samego porodu.

Druga praca, analizuje cechy krwi pępowinowej jako niszy dla KKM. Celem było oznaczenie poziomów wybranych cytokin pro- i anty-zapalnych zarówno w krwi pępowinowej, jak i we krwi obwodowej matki w okresie okołoporodowym. Poziomy GM-CSF, IL-4, IL-10 oraz TNF były oznaczane przy użyciu metody cytometrycznej w nadsączach komórek jednojądrzastych obu typów krwi. Okazało się, że zwiększony poziom IL-4, IL-10 oraz GM-CSF korelował z niższym odsetkiem KKM CD34<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> wśród wszystkich komórek jądrzastych. Zasugerowałam, iż związane jest to z intensywnym dojrzewaniem komórek krwi pępowinowej w okresie okołoporodowym by zaspokoić wszystkie potrzeby noworodka. Co

ciekawe, zaobserwowałam przeciwną zależność pomiędzy odsetkiem KKM w krwi pępowinowej i poziomami cytokin w surowicy krwi pępowinowej i surowicy krwi matki.

1. Szaryńska M., Kmieć Z., Preis K., Zabul P. *The presence of a supporting person during delivery affects cord blood haematopoietic stem cells*. J. Obstet. Gynaecol. 2014 : vol. 34, nr 3, s. 245.
2. Szaryńska M., Myśliwski A., Myśliwska J., Kmieć Z., Preis K., Zabul P. *Cytokine profiles during delivery affect cord blood hematopoietic stem and progenitors cells*. Cell. Immunol. 2015: vol. 283, nr 2, s. 137-141.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę = omówienie pozostałych osiągnięć**

### **6.1. Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach:**

1. Główny wykonawca projektu finansowanego przez MNiSW o nr 2 PO5A 088 30, którego kierownikiem był prof. dr hab. Andrzej Myśliwski pt.: „*Optymalizacja namnażania komórek dendrytycznych o właściwościach immunosupresyjnych oraz cytotoksycznych z krwiotwórczych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej*”. Projekt został zrealizowany w latach 2006-2010. Wyniki stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej oraz zostały opublikowane w postaci trzech prac oryginalnych:
  1. Szaryńska M. i wsp. *Cytokine profiles during delivery affect cord blood hematopoietic stem and progenitors cells*. Cell. Immunol. 2015; 283 (2):, s. 137.
  2. Szaryńska M. i wsp. *The presence of a supporting person during delivery affects cord blood haematopoietic stem cells*. J Obstet Gynaecol. 2014; 34 (3): 245.
  3. Szaryńska M. i wsp. *Diversity of dendritic cells generated from umbilical cord or adult peripheral blood precursors*. Centr. Eur. J. Immunol. 2018; 43 (3): 306.
2. Kierownik projektu zaakceptowanego do finansowania przez MNiSW o nr N N402 684040, pt.: „*Analiza wpływu ludzkich komórek dendrytycznych na właściwości biologiczne i molekularne pierwotnych linii raka jelita grubego człowieka w modelu mysim*”, realizowanego w latach 2011-2017, którego wyniki zostały zaprezentowane w postaci 3 prac oryginalnych i 2 prac przeglądowych:
  1. Szaryńska M. i wsp. *Cancer stem cells as targets for DC-based immunotherapy of colorectal cancer*. Scientific Reports 2018; 13 (1): 12042.
  2. Szaryńska M. i wsp. *Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer*. Oncology Letters 2017; 14: 7653-7668.
  3. Szaryńska M. i wsp. *FasR and FasL in colorectal cancer*. IJO 2017; 51: 975-986.
  4. Olejniczak A, Szaryńska M, Kmieć Z. *In vitro characterization of spheres derived from colorectal cancer cell lines*. IJO 2018; 52 (2): 599-612.
  5. Szaryńska M. i wsp. *The role of cancer stem cells in pathogenesis of colorectal cancer*. Postepy Hig Med Dosw. 2016; 70: 1469-1482.
3. Wykonawca w zadaniu badawczym Miniatura o nr 2019/03/X/NZ3/00434 (nr projektu w rejestrze GUMed: 04-0533/09/119), którego kierownikiem był prof. dr hab. Jarosław Kobiela z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej pt.: „*Ocena poziomu wybranych białek związanych z hormonalną homeostazą tarczycy w komórkach*”

*raka jelita grubego wyizolowanych od pacjentów oraz korelacja ich z parametrami klinicznymi oraz właściwościami nowotworowych komórek macierzystych*”. Zadanie badawcze było realizowane w latach 2019 – 2021. Publikacja podsumowująca uzyskane wyniki jest w ostatniej fazie przygotowania.

## **6.2. Członkostwo w towarzystwach naukowych:**

Od 2007 – członek Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (PTHiC)

W latach 2009-2011 – pełniłam funkcję skarbnika PTHiC

## **6.3. Recenzowanie artykułów w czasopismach naukowych (Razem 32 recenzje):**

- Folia Histochemica et Cytobiologica – IF 1.698 - 3
- Spandidos
  - International Journal of Oncology – IF 5.65 - 2
  - Oncology Letters -IF 2.967 - 6
  - Molecular Medicine Reports – IF 2.952 - 6
  - Oncology Reports – IF 3.906 - 3
  - Experimental and Therapeutic Medicine – IF 2.447 - 1
- MDPI
  - International Journal of Molecular Medicine – IF 5.923 - 3
  - Cancers – IF 6.639 - 2
  - Cells – IF 6.600 - 2
  - Vaccines – IF 4.422 -2
- BMC Cancer – 5-year IF 4.372 - 1
- Willey - Molecular Carcinogenesis – IF 4.784 - 1

## **6.4. Współpraca z innymi jednostkami naukowymi:**

### **W Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (GUMed):**

#### **1. Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej**

W 2011 roku, na samym początku mojej pracy z komórkami raka jelita grubego nawiązałam bardzo efektywną współpracę z lekarzami powyższej kliniki – z prof. Jarkiem Kobielą, prof. Zbigniewem Śledzińskim, dr Piotrem Spsychalskim, dr Dariuszem Łaski oraz lek. Olgą Rostkowską. Naszym wspólnym celem jest jak najszersza charakterystyka komórek RJG by poprawić efektywność terapii pacjentów. Pracownicy Kliniki Chirurgii wspierają moje badania w laboratorium swoją fachową radą, prowadzą selekcję pacjentów do badania, pobierają fragmenty guzów, a na etapie podsumowywania wyników uzupełniają analizę danych i wyciąganie wniosków swoją kliniczną wiedzą. W ramach naszej współpracy planujemy kolejne projekty, piszemy wnioski i realizujemy zamierzone cele. Nasza dotychczasowa współpraca zaowocowała 3 artykułami oryginalnymi (w tym dwa zostały włączone do cyklu habilitacyjnego) oraz 5 wspólnymi doniesieniami konferencyjnymi. Poza tym wspólnie

zrealizowaliśmy 2 projekty badawcze (punkt 6.1.2 i 6.1.3). Zostałam promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej lek. Olgi Rostkowskiej.

## **2. Katedra i Klinika Gastroenterologii i Hepatologii**

Jedna z prac włączonych do cyklu wymagała pobrania materiału od dużej liczby pacjentów z RJG, wtedy udało mi się nawiązać współpracę z lekarzami pracującymi w powyższej klinice. Mogłam liczyć na ich wsparcie merytoryczne w czasie realizowania projektu, jak i na etapie podsumowywania wyników i wyciągania wniosków. Nasza praca została podsumowana w postaci artykułu oryginalnego w International Journal of Oncology.

## **3. Katedra i Zakład Immunologii Medycznej (dawniej Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii)**

Współpraca z pracownikami tej jednostki rozpoczęła się na etapie realizacji projektu promotorskiego w 2008 roku. Współpraca z zespołem prof. Piotra Trzonkowskiego zaowocowała pracą oryginalną, pracą przeglądową oraz dwoma doniesieniami konferencyjnymi. Już na tym etapie nawiązałam współpracę z dr hab. Anną Wardowską, która obecnie jest pracownikiem innej jednostki GUMed.

## **4. Katedra i Zakład Fizjopatologii**

Pracownicy tej jednostki są wysokiej klasy specjalistami zarówno w dziedzinie cytometrii przepływowej, jak i w analizie ekspresji genów metodami molekularnymi. Dzięki współpracy z nimi znacznie rozwinęłam swój warsztat badawczy, a dr hab. Anna Wardowska znacząco włączyła się w ostatnie etapy powstania jednej z prac włączonych do cyklu habilitacyjnego. Nasza współpraca trwa do dzisiaj, planujemy wspólną realizację kolejnych projektów.

## **5. Klinika Położnictwa**

Analiza właściwości krwiotwórczych komórek macierzystych z krwi pępowinowej była prowadzona dzięki współpracy z personelem powyższej kliniki.

## **6. Katedra i Zakład Immunologii (obecnie włączona do Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej)**

Pani prof. Jolanta Myśliwska, która była kierownikiem Katedry Immunologii, była promotorem mojej rozprawy doktorskiej oraz współautorem 2 artykułów oryginalnych i 3 doniesień konferencyjnych.

## **7. Katedra i Zakład Biochemii**

Współpraca dotyczyła doświadczeń związanych z analizą funkcji komórek NK (punkt 5.2.2).

## **8. Katedra Mikrobiologii**

Współpraca dotyczyła stworzenia mysiego modelu sepsy do badań nad związkami immunomodulacyjnymi.

**Poza GUMed:****9. Oddział Położniczo-Ginekologiczny Szpitala św. Wojciecha, Gdańsk**

W trakcie realizowania doświadczeń dotyczących właściwości KKM krwi pępowinowej oraz właściwości samej niszy dla tych komórek, rozpoczęłam współpracę z dr Piotrem Zabulem wówczas pracującym w powyższej jednostce. Nasza kilku letnia współpraca została podsumowana w 3 pracach oryginalnych (punkty 5.2.3 i 5.2.5).

**10. Katedra Chemii Organicznej, Politechnika Gdańska**

Współpraca z tą jednostką była realizowana w celu analizy immunomodulacyjnych właściwości pochodnych fragmentów ścian komórkowych bakterii – muramulodipeptydów oraz białka – tuftsyny w mysim modelu sepsy. Wyniki doświadczeń, w których uczestniczyłam zostały opublikowane w postaci pracy oryginalnej, dodatkowo - zostały wygłoszone na 3 konferencjach naukowych.

Współpraca z zespołem zajmującym syntezą nowych pochodnych związków, których znaczenia dla homeostazy organizmu zostało wcześniej potwierdzone, jest obecnie przeze mnie kontynuowane z inną grupą badawczą. Prof. Adam Prahl oraz dr Emilia Iłowska z Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu Gdańskiego obecnie prowadzą syntezę nowych pochodnych bradykininy i neurotensyny do ewaluacji ich aktywności przeciwnowotworowej względem komórek linii RJG.

**11. Zakład Fizjologii i Biochemii, Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku**

Współpraca dotyczyła doświadczeń związanych z analizą funkcji komórek NK (punkt 5.2.2).

**6.5. Aktywny udział w konferencjach naukowych PO DOKTORACIE****Wystąpienie ustne:**

1. Szaryńska M., Olejniczak A., Kmieć Z., Kobiela J., Śledziński Z. *Improved method of isolation and expansion of primary colorectal cancer stem cells*. W: XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików: Współczesne techniki mikroskopowe i molekularne w biologii i medycynie, Międzyzdroje, 9-12 września 2015.
2. Olejniczak A., Szaryńska M., Kmieć Z. *Izolacja i charakterystyka nowotworowych komórek macierzystych z fragmentów raka jelita grubego pochodzących od pacjentów i linii komórkowych*. W: V Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP, Lublin 1-2 grudnia 2018 r. : abstrakty / red. M. Maciąg, K. Maciąg. Lublin, 2018.
3. Olejniczak-Kęder A., Szaryńska M., Siedlecka-Kroplewska K., Wrońska A., Kmieć Z. *Spherical model of colorectal cancer cells for 5-FU and anti-EGFR antibody in combination with ASA analysis*. W: 53rd Symposium of Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry: From ultrastructure to *in vivo* imaging : progress in microscopical techniques, Gdańsk, 15-18 September 2019.

**Pozostałe:**

1. Olejniczak A., Szaryńska M., Kmieć Z., Kobiela J. *Colorectal cancer stem cells as potential target for DC-based therapy*. W: 23rd International Students Scientific Conference : New dimension of medicine, Gdańsk, Poland, April 23-25, 2015.

2. Olejniczak A., **Szaryńska M.**, Kmieć Z., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z. *Wykorzystanie zmodyfikowanych komórek dendrytycznych przeciwko nowotworowym komórkom macierzystym raka jelita grubego człowieka*. W: I Konferencja Doktorantów Pomorza BioMed Session 2015, Gdańsk, 12 grudnia 2015.
3. Olejniczak A., **Szaryńska M.**, Kmieć Z. *Charakterystyka nowotworowych komórek macierzystych pochodzących z linii komórkowych raka jelita grubego*. W: 7 Konferencja Postępy w Badaniach Biomedycznych, Warszawa, 10-11.12.2016.
4. Olejniczak A., **Szaryńska M.**, Kmieć Z. *Ocena interakcji między komórkami dendrytycznymi a nowotworowymi komórkami macierzystymi linii raka jelita grubego*. W: 50 Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików : Od przeszłości do teraźniejszości..., Wojanów, 5-8 września 2016.
5. Olejniczak A., **Szaryńska M.**, Cyman M., Kmieć Z. *In vitro analysis of cells properties derived from HCT1216-and HT29-colonospheres*. W: XI Copernican International Young Scientists Conference, Toruń, Poland, 28-30 June, 2017.
6. **Szaryńska M.**, Olejniczak A., Kobiela J., Łaski D., Śledziński Z., Kmieć Z. *FasR i FasL w komórkach macierzystych raka jelita grubego*. W: 68 Kongres Towarzystwa Chirurgów Polskich, Kraków, 27-30 września 2017.
7. **Szaryńska M.**, Olejniczak A., Kobiela J., Kmieć Z. *In vitro modified dendritic cells as a useful tool for colorectal cancer immunotherapy targeting cancer stem cells*. W: 53rd Symposium of Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry : From ultrastructure to *in vivo* imaging : progress in microscopical techniques, Gdańsk, 15-18 September 2019.

#### 6.6. Ukończone kursy i szkolenia:

1. 02.2005 r. – udział w szkoleniu z zakresu preparatyki komórek macierzystych krwi pępowinowej w Banku Komórek Krwiotwórczych i Krwi Pępowinowej Kliniki Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie – w trakcie mojego tygodniowego pobytu w ośrodku kierowanym przez prof. Wiesława Wiktora Jędrzejczaka – jednego z pionierów przeszczepiania i bankowania krwi pępowinowej w Polsce, nauczyłam się wszystkich podstawowych procedur izolacji i preparatyki KKM, mogłam również poznać procedury bankowania tych komórek
2. 13–14.05.2005 r. – ukończyłam IV Szkołę Cytometrii Przepływowej poświęconą komórkom macierzystym, organizowaną przez firmę Becton Dickinson, Kraków – to szkolenie pozwoliło mi nauczyć się metod analizy cytometrycznej KKM z wykorzystaniem różnorodnych markerów
3. 3.06.2005 r. – udział w szkoleniu w ramach Stem Cell Therapeutics Excellence Centre – The Second Stem Cell Summer School, Kraków – była to jedna z inicjatyw prof. Mariusza Ratajczaka – autorytet w dziedzinie pracy z komórkami macierzystymi (w tym komórkami embrionalnymi), w czasie tego szkolenia poznałam wiele nowatorskich technik izolacji, analizy rzadkich komórek macierzystych
4. 23.01-3.02.2006 r – udział w szkoleniu z zakresu izolacji i określania właściwości komórek macierzystych krwi pępowinowej, Zakład Transplantologii, Collegium Medicum, UJ, Kraków – taki długi pobyt w macierzystej jednostce prof. Ratajczaka był doskonałą szansą poznania warsztatu pracy zespołu, poznania i praktycznego przećwiczenia wielu technik, które w późniejszym etapie mogłam sama wykorzystać w laboratorium

5. 23.03.2006 r. – udział w seminarium firmy Applied Biosystems pt.: „Najnowsze Osiągnięcia w Technikach Biologii Molekularnej”, Warszawa.
6. 12.05.2006 r. - Kurs z zakresu barwienia preparatów histologicznych metodami: Hematoksyliną i eozyną, Mallor’ego, May-Grunwalda i Giemsy; przeprowadzonego w Pracowni Preparatyki Histologicznej Katedry Histologii i Immunologii AM w Gdańsku – dzięki temu mogłam przeprowadzić analizę rozmazów krwi pępowinowej.
7. 13.06.2006 r. – brałam udział w warsztatach z zakresu sortowania komórek przy użyciu cytometru sortującego Aria BD organizowanych przez firmę Becton Dickinson, Gdańsk.
8. 28.02.2011 r. – udział w warsztatach dotyczących poprawy ergonomii, bezpieczeństwa oraz wyników pipetowania oraz w seminarium pt.: „Hodowle komórkowe w inkubatorach CO2” organizowanym przez firmę Labart Sp. z o.o.
9. 21-25.09.2015 r. – udział w szkoleniu dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie (2015-1911-206-132)
  - a. Dla osób wykonujących procedury (2015-1913-208-149)
  - b. Dla osób uczestniczących w wykonywaniu procedur (2015-1914-207-156)
  - c. Dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach (2015-1915-209-150)
10. 11-29.06.2018 r. – kurs doskonalący z języka angielskiego w ramach projektu „Rozwój kompetencji kadry dydaktycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego przez UE.
11. 29.06.2018 r. – udział w warsztatach z kompetencji kulturowych w ramach projektu „Rozwój kompetencji kadry dydaktycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego przez UE.
12. 24.06.2021 r. – szkolenie aplikacyjne z obsługi aparatu ImageQuant™ LAS 500 przeprowadzone przez firmę GE Healthcare Bio-Sciences AB, Gdańsk.
13. 08.2021 r. – udział w kursie dla Kadry Dydaktycznej GUMed „Pedagogika Dorosłych” w ramach projektu współfinansowanego przez UE pt.: „Poprawa jakości kształcenia studentów GUMed poprzez rozwój infrastruktury dydaktycznej i wsparcie procesu nauczania o metody symulacji medycznej”.
14. 01-02.2019 r.- udział w szkoleniu z zakresu przygotowania zaawansowanych prezentacji multimedialnych dla kadry dydaktycznej GUMed w ramach projektu „Rozwój kompetencji kadry dydaktycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego” współfinansowanego przez UE.

#### **6.7. Udział w organizacji zjazdów naukowych:**

1. Członek Komitetu Organizacyjnego The 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry - The ICHC 2008: 'Imaging of Cell Dynamics'; 23-27.08.2008, Gdańsk
2. Członek Komitetu Organizacyjnego 53rd Symposium of Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry : From ultrastructure to *in vivo* imaging : progress in microscopical techniques; 15-18.09.2019, Gdańsk

## 6.8. Nagrody za działalność naukową

1. Pierwsza nagroda za wystąpienie pt.: "Colorectal cancer stem cells as potential target for DC-based therapy" podczas 23rd International Students Scientific Conference: New dimension of medicine, 23-25.04.2015, Gdańsk
2. Wyróżnienie na 24th International Students Scientific Conference: New dimension of medicine za prezentację pt. "Ocena interakcji między komórkami dendrytycznymi a nowotworowymi komórkami macierzystymi linii raka jelita grubego", 18-20.05.2016, Gdańsk
3. Pierwsza nagroda za wystąpienie pt: „Charakterystyka nowotworowych komórek macierzystych pochodzących z linii komórkowych raka jelita grubego” zaprezentowane podczas 7 Konferencji Postępów w Badaniach Biomedycznych, 10-11.12.2016, Warszawa
4. 17.12.2019 r. - Zespołowa Nagroda Rektora GUMed za badania nad charakterystyką biologiczną komórek dendrytycznych oraz ich potencjalnym wykorzystaniem terapeutycznym.

## 6.9. Działalność dydaktyczna:

**6.9.1. Od 2005 roku** - Udział w organizacji dydaktyki (przygotowywanie prezentacji, materiałów pomocniczych na zajęcia oraz testów) prowadzonej przez Katedrę Histologii i Immunologii, później Katedrę Histologii Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz prowadzenie zajęć seminaryjnych i laboratoryjnych:

- Histologia z cytofizjologią - seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku Wydziału Lekarskiego AMG/GUMed
- Histologia z cytofizjologią - seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku Wydziału Nauk o Zdrowiu Akademii Medycznej w Gdańsku
- Histology with Embryology – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku English Division Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Gdańsku
- Histology with Cell Physiology - seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku English Division Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Metody barwienia komórek i tkanek. Teoria i praktyka - zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed
- Zasady morfometrii i cytometrii. Ich zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce medycznej - zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed
- Wprowadzenie do biologii komórki nowotworowej - zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed
- Mikroskopowa diagnostyka różnicowa prawidłowych i patologicznych komórek i tkanek - zajęcia fakultatywne dla studentów Wydziału Lekarskiego GUMed
- Introduction to Cancer Cytobiology - zajęcia fakultatywne dla studentów English Division Wydziału Lekarskiego GUMed
- Microscopic differential diagnosis of normal and pathological cells and tissues - zajęcia fakultatywne dla studentów English Division Wydziału Lekarskiego GUMed



### **6.9.2. W latach 2009-2011 i 2016-2019**

Opiekun dydaktyczny przedmiotu Histology with Cell Physiology dla kierunku lekarskiego anglojęzycznego Wydziału Lekarskiego. Moim zadaniem była koordynacja planu przebiegu całego rocznego kursu, przygotowywanie testów na cotygodniowe sprawdziany, aktualizacja prezentacji multimedialnych, aktualizacja strony internetowej dla studentów anglojęzycznych oraz udział w radach pedagogicznych.

### **6.9.3. Od 2012 roku**

W 2012 roku włączyłam się w organizację rocznego kursu (Premedical Course, Pre-Med) dla młodzieży z różnych krajów przygotowujących się do studiów medycznych na kierunku lekarskim anglojęzycznym. Moje zadanie polegało na przygotowaniu zajęć: Introduction to Cytophysiology and Microscopic Anatomy, których koordynacją zajmuję się do dziś. Jestem odpowiedzialna za przygotowywanie materiałów dydaktycznych, aktualizację prezentacji multimedialnych, prowadzenie seminariów i zajęć laboratoryjnych oraz przygotowywanie różnego rodzaju testów sprawdzających wiedzę studentów, włączając w to kolokwium zaliczeniowe.

**6.9.4.** Współautor tłumaczenia rozdziału „Tkanka nabłonkowa” podręcznika „Histologia” Junqueira: podręcznik i atlas / Anthony L. Mescher, Edra Urban & Partner, Wrocław 2020

Za to otrzymałam w grudniu 2021 roku Zespołową Nagrodę Dydaktyczną Rektora GUMed.

### **6.10. Opieka nad studentami:**

1. Opieka merytoryczna doświadczeń prowadzonych przez mgr inż. Agatę Olejniczak-Kęder, czego efektem była wyróżniona w 2019 roku rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka modelu sferycznego linii komórkowych raka jelita grubego i jego wykorzystanie w badaniach *in vitro* z komórkami immunokompetentnymi i związkami przeciwnowotworowymi”, która dodatkowo została uhonorowana Nagrodą Gdańskiego Towarzystwa Naukowego i Prezydenta Miasta Gdańska dla Wybitnych Młodych Naukowców.
2. Opiekun naukowy projektu „Analiza wpływu natywnych form bradykininy i neurotensyny oraz ich analogów na komórki ludzkich linii raka jelita grubego” prowadzonego przez studentkę Wydziału Analityki Medycznej GUMed, Kamilę Podpłońską w ramach programu Young Scientific Program Projektu PO WER 3.5.

3. Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej lek. Olgi Rostkowskiej z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej, pt.: „Rola hormonów tarczycy w rozwoju raka jelita grubego” – publikacja oryginalna prezentująca uzyskane wyniki jest w ostatniej fazie przygotowania do druku.

### **6.11. Działalność popularyzująca naukę**

#### **1. Przygotowanie artykułów opublikowanych na łamach portalu biotechnologia.pl:**

1. Nowa metoda określania poziomu białek rozpuszczalnych (21.08.2008)  
Dostępny pod adresem: <https://biotechnologia.pl/archiwum/nowa-metoda-okreslania-poziomu-bialek-rozpuszczalnych,10981>
2. Komórki macierzyste - podstawowe definicje (01.10.2007)  
Dostępny pod adresem: <https://biotechnologia.pl/archiwum/komorki-macierzyste-podstawowe-definicje,11437?month=7&year=2018>

#### **2. Organizacja weekendowego kursu dla uczniów z X Liceum Ogólnokształcącego w Gdańsku pt. "Microscopy", którego program obejmował:**

- A. wprowadzenie teoretyczne dotyczące budowy mikroskopu
- B. prezentację historii histologii rozwijającej się równoległe z postępowaniem w tworzeniu bardziej dokładnych mikroskopów
- C. prezentację technik histologicznych
- D. praktyczną naukę przygotowywania rozmazów krwi obwodowej i barwienia ich techniką Maya – Grunwalda – Giemsa
- E. naukę obsługi mikroskopu
- F. oglądanie preparatów histologicznych
- G. wykonywanie rysunków histologicznych

Moim zadaniem było przygotowanie materiałów dydaktycznych, włącznie z napisaniem krótkiego „skryptu”, który zawierał wszystkie informacje prezentowane w czasie seminariów, przygotowanie prezentacji multimedialnych oraz prowadzenie całego kursu i opieka w czasie zajęć praktycznych. Cały kurs był prowadzony w języku angielskim.

#### **3. Popularnonaukowa publikacja:**

Szaryńska M., Kmiec Z. Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. Forum Medycyny Rodzinnej 2011; 5(1): 47-56.

## 7. Plany naukowe

W najbliższym czasie, moje badania wciąż będą się koncentrowały na roli ścieżki Fas i modulacyjnym wpływie aspiryny na funkcje tej ścieżki w nowotworowych komórkach macierzystych raka jelita grubego człowieka. Z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej (metody wyciszania genów, analizy ich ekspresji oraz aktywności produktów białkowych), będę poszukiwała białek, które mogą mieć znaczenie dla zmiany roli ścieżki Fas z pro-przyżyciowej na apoptotyczną. Ciekawą kwestią wydaje się być to, czy aspiryna może wywierać anty-nowotworowy wpływ również w warunkach *in vivo* po podaniu pacjentowi w trakcie terapii w formie leku adjuwantowego.

Dodatkowo, ostatnio wraz z prof. Jarkiem Kobielą z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej rozpoczęliśmy badania analizujące wpływ hormonów tarczycy na właściwości nowotworowych komórek macierzystych raka jelita grubego. Po uzyskaniu pierwszych obiecujących wyników, planujemy dokładniej przyjrzeć się roli tego hormonu i rozważyć, czy status tarczycowy miałby znaczenie dla wrażliwości NKM na zastosowane leczenie przeciwnowotworowe.

Poza tym, przy współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Gdańskiego rozpoczęłam badania nad wpływem pochodnych bradykininy i angiotensyny na właściwości komórek linii RJG. Te bardzo aktywne białka wykazują znaczące działanie stymulujące rozwój nowotworów, np. raka płuca, trzustki czy wątroby. Obszar tej aktywności nie jest jednak nadal dokładnie zbadany, co sugeruje potrzebę przeprowadzenia dalszych badań w tym kierunku i stwarza pole do eksperymentowania z dostępnymi analogami neurotensyny i bradykininy o potencjalnie wysokiej aktywności biologicznej. Działania te mogą służyć zarówno próbie zahamowania niekorzystnego działania tych związków lub stymulacji ich aktywności blokujących przeżycie, proliferację czy zdolność do migracji komórek nowotworowych.

Oświadczam, iż nie ubiegałam się dotychczas o nadanie stopnia doktora habilitowanego.