



Autoreferat

Załącznik 2a

dr n. med. Małgorzata Rusak

Zakład Diagnostyki Hematologicznej

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Milena Izabela Dąbrowska

Białystok 2017

1. **Imię i nazwisko:** Małgorzata Rusak, do 2003 Suchowierska
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuły pracy magisterskiej/rozprawy doktorskiej.**

- 1999 r.** **Dyplom magistra analityki medycznej,** Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Białymstoku. Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ kwasu ursodeoksycholowego na aktywność β -D- galaktozydazy w wątrobie i nerce szczurów narażonych na stres audiowizualny lub czterochlorek węgla”.
- 2001 r.** Dyplom pierwszego stopnia specjalizacji w zakresie analityki klinicznej.
- 2006 r.** **Dyplom doktora nauk medycznych,** Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Białymstoku. Temat rozprawy doktorskiej: „Apoptoza oraz aktywność ERK i JNK w leukocytach chorych z ostrą białaczką szpikową” (promotor: prof. dr hab. Milena Izabela Dąbrowska).
- 2009 r.** **Dyplom specjalisty** w dziedzinie laboratoryjnej diagnostyki medycznej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Od 1.10.1999 r. - obecnie Asystent w Zakładzie Diagnostyki Hematologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Białymstoku

15.03.2000 r. – 19.01.2010 r. młodszy asystent w Zakładzie Diagnostyki
Hematologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego
w Białymstoku

20.01.2010 r. - obecnie starszy asystent w Zakładzie Diagnostyki
Hematologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego
w Białymstoku

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

A) tytuł osiągnięcia naukowego:

Antygeny limfocytarne jako biomarkery zaburzeń immunologicznych.

Łączny Impact Factor ISI **12.837**; MNSiW **155.000**

B) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa):

1. Rusak M., Osada J., Pawlus J., Chociej-Stypułkowska J., Dąbrowska M., Kłoczko J.: Utility of laboratory tests in B-CLL patients in different clinical stages. International Journal of Hematology 2011; 93: 736-44.

Impact Factor ISI 1.268; MNSiW 15.000

Mój wkład: opracowanie koncepcji pracy, zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, opracowanie i interpretacja wyników oraz dyskusja nad wynikami, sporządzenie rycin i tabel, zebranie literatury, czynny udział w pisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku, autor korespondencyjny. Udział własny szacuję na: 85%.

2. Rusak M.*, Eljaszewicz A.*, Bołkun Ł., Łuksza E., Łapuć I., Piszcz J., Singh P., Dąbrowska M., Bodzenta-Łukaszyk A., Kłoczko J., Moniuszko M.: Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4+ T cells in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej 2015; 125: 553-559.

Impact Factor ISI: 2.054; MNiSW: 25.000

*- równy wkład autorów

Mój wkład: zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i tabel, udział w redagowaniu manuskryptu. Udział własny szacuję na 45%.

3. Rusak M., Bołkun Ł., Chociej-Stypułkowska J., Pawlus J., Kłoczko J., Dąbrowska M.: Flow-cytometry-based evaluation of peripheral blood lymphocytes in prognostication of newly diagnosed DLBCL patients. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2016; 59: 92-96.

Impact Factor ISI: 1.882; MNiSW: 25.000

Mój wkład: opracowanie koncepcji pracy, zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, opracowanie i interpretacja wyników analiz statystycznych, dyskusja nad wynikami, sporządzenie rycin i tabel, zebranie literatury, czynny

udział w pisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku, autor korespondencyjny. Udział własny szacuję na: 85%.

4. Bołkun Ł.*, **Rusak M.***, Eljaszewicz A.*, Pilz L., Radzikowska U., Łapuć I., Łuksza E., Dąbrowska M., Bodzenta-Łukaszyk A., Kłoczko J., Moniuszko M.: Enhanced pretreatment CD25 expression on peripheral blood CD4+ T cell predicts shortened survival in acute myeloid leukemia patients receiving induction chemotherapy. *Pharmacological Reports* 2016; 68: 12-19.

Impact Factor ISI: 2.587; MNiSW: 25.000

*- równy wkład autorów

Mój wkład: zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników, udział w redagowaniu manuskryptu. Udział własny szacuję na 30%.

5. Jakubiuk-Tomasz A., Sobaniec W., **Rusak M.**, Poskrobko E., Nędzi A. [S.D.], Olchowik B., Galicka A.: Decrease of interleukin (IL)17A gene expression in leucocytes and in the amount of IL-17a protein in CD4+ T cells in children with Down syndrome. *Pharmacological Reports* 2015; 67; 6: 1130-1134.

Impact Factor ISI: 2.251; MNiSW: 25.000

Mój wkład: zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i tabel, udział w redagowaniu manuskryptu. Udział własny szacuję na 50%.

6. Kosel J., **Rusak M.**, Gołembiewski Ł., Dąbrowska M., Siemiątkowski A.: Total knee replacement induces peripheral blood lymphocytes apoptosis and it is not prevented by regional anesthesia - a randomized study. *Revista Brasileira de Anestesiologia* 2015; 66: 133-139.

Impact Factor ISI: 0.517; MNiSW: 15.000

Mój wkład: zabezpieczenie i przygotowanie próbek krwi do analizy, wykonanie oznaczeń cytometrycznych, interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i tabel, udział w redagowaniu manuskryptu. Udział własny szacuję na 60%.

7. Daniluk J., Daniluk U., **Rusak M.**, Dąbrowska M., Reszeć J., Garbowicz M., Humińska K., Dąbrowski A.: The effect of penicillin administration in early life on murine gut microbiota and blood lymphocyte subsets. *Anaerobe* 2017; 47: 18-24

Impact Factor ISI: 2.278; MNiSW: 25.000

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji pracy, wykonanie oznaczeń, interpretacja wyników analiz statystycznych, opracowanie wyników i dyskusja nad wynikami, przygotowanie rycin i tabel, udział w redagowaniu manuskryptu. Udział własny szacuję na 40%.

C) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Chociaż limfocyty nie stanowią najliczniejszej populacji krwinek białych u ludzi, tym nie mniej odgrywają podstawową rolę w układzie odpornościowym człowieka. Warunkują bowiem swoistość odpowiedzi immunologicznej na antygeny egzo- i endogenne. Wszystkie limfocyty powstają w procesie hematopoezy z wielopotencjalnej komórki macierzystej, przy czym limfopoeza stanowi najwcześniejszy etap różnicowania się „komórki pnia”. Ukierunkowane limfoidalne komórki macierzyste dają początek prekursorom różnych subpopulacji limfocytów. Tym samym, linia limfoidalna stanowi najbardziej różnorodną grupę komórek krwi, spośród których najliczniejszą populację stanowią komórki T. Dojrzewają w grasicy, skąd wędrują do krwi obwodowej oraz narządów limfatycznych, uczestnicząc w komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wśród nich wyróżnia się subpopulacje limfocytów pomocniczych (Th1, Th2), cytotoksycznych (Tc) i regulatorowych (Treg). Th w odpowiedzi na antygen prezentowany przez komórki dendrytyczne, uwalniają cytokiny i czynniki wzrostu, stymulując dojrzewanie i funkcje wielu innych komórek odpornościowych. Limfocyty Tc niszczą komórki zainfekowane wirusem, nowotworowe oraz komórki przeszczepionego narządu. Wrodzoną zdolność do zabijania komórek obcych antygenowo mają komórki NK, rozpoznające zmiany w obrębie składowych głównego kompleksu zgodności tkankowej. Z kolei limfocyty Treg hamują odpowiedź immunologiczną, m.in. zapobiegając autoagresji i nadwrażliwości na alergen. W szpiku kostnym powstaje kolejna subpopulacja limfocytów- limfocyty B. Dojrzewają one ostatecznie w tkance limfatycznej przewodu pokarmowego i mają zdolność do syntezy przeciwciał, warunkując odpowiedź humoralną. Podtyp B1 odpowiada za syntezę immunoglobulin typu M i wspomaga usuwanie komórek apoptotycznych. Limfocyty B2 kooperują z komórkami Th

i wytwarzają przeciwciała we wtórnej reakcji immunologicznej. Podobnie jak T – tworzą także komórki pamięci immunologicznej.

Pomimo dużego zróżnicowania czynnościowego, morfologia dojrzałych limfocytów przypomina komórkę macierzystą i nie pozwala na identyfikację populacji i subpopulacji limfocytów. Właściwa klasyfikacja komórek linii limfoidalnej stała się możliwa głównie dzięki wieloparametrycznej cytometrii przepływowej, wykorzystującej złożony układ detektorów elektroniczno-optycznych oraz przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromami. Metoda ta umożliwia zarówno ocenę cech morfologicznych, jak i pomiar ekspresji około 250 różnych antygenów różnicowania komórkowego CD (*cluster of differentiation*). Bezpośrednia analiza markerów komórkowych CD na powierzchni limfocytów (tzw. immunofenotypowanie) ma w medycynie coraz szersze zastosowanie diagnostyczne i badawcze. Jest powszechnie wykorzystywana do identyfikacji komórek oraz określania procentowej i bezwzględnej zawartości subpopulacji limfocytów. Markerem fenotypowym limfocytów T jest antygen CD3+, a limfocytów B – CD19+. Zbiory antygenów CD są wykorzystywane do określania poszczególnych subpopulacji limfocytów, m.in.: (CD3+CD4+TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$) – Th; (CD3+CD8+TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$) – Tc oraz (CD16+CD56+CD3-) – komórki NK. Antygeny CD stanowią też standard używany w celu identyfikacji komórek białaczkowych jako istotny parametr klasyfikacji rozrostowych chorób krwi. Jednak rola markerów leukocytarnych nie ogranicza się jedynie do identyfikacji komórek, ponieważ wielu z nich przypisano określone funkcje immunologiczne. Antygeny leukocytarne mogą odpowiadać za adhezję komórkową, a także mogą spełniać funkcje receptora lub ligandu, przez co uczestniczą w kaskadzie sygnałowej i wpływają na określone funkcje komórki. Wykazano m.in., że antygen CD4 stabilizuje kontakt pomiędzy komórką prezentującą antygen i limfocytym T, wydłużając interakcję między tymi komórkami. Domeny funkcjonalnie aktywnej cząsteczki CD4 są powiązane mechanicznie z TCR/CD3 oraz z białkami MHC klasy II, a krótki fragment wewnątrzkomórkowy oddziałuje z kinazą Lck. Rekrutacja kinazy Lck wzmacnia sygnał biegnący od receptora TCR, ułatwiając tym samym aktywację limfocyty. Obniżony poziom CD4 na limfocytach Th2 oraz limfocytach Treg jest odpowiedzialny za słabszą odpowiedź tych komórek na stymulację antygenem. CD4 może również inicjować szlaki sygnałowe niezależnie od kompleksu TCR/CD3, co prowadzi do napływu wapnia do wnętrza komórki oraz produkcji interleukiny 2. CD4 jest białkiem rutynowo oznaczanym w testach naukowych i diagnostycznych związanych z funkcją limfocytów T. Zwiększona liczba komórek wykazujących obecność CD4 jest również wiązana z niektórymi chorobami autoimmunizacyjnymi, m.in. cukrzycą typu I. Ponieważ

CD4 jest jednym z receptorów, które wiążą glikoproteinę gp120 wirusa HIV, antygen ten umożliwia wniknięcie wirusa do komórek, co skutkuje jego namnażaniem i rozwojem zakażenia. Skutkiem działania wirusa HIV jest niszczenie komórek wykazujących ekspresję CD4, stąd oznaczanie komórek CD4+ jest narzędziem diagnostycznym często używanym do monitorowania progresji infekcji wirusem HIV i wspomagającym terapię osób zarażonych.

Biorąc pod uwagę różnorodne funkcje immunologiczne przypisywane poszczególnym CD, interesującym jest poszukiwanie diagnostycznych i prognostycznych wartości wśród antygenów limfocytarnych jako potencjalnych biomarkerów zaburzeń immunologicznych w wybranych stanach klinicznych.

W pierwszym etapie badań skoncentrowałam się na ocenie zależności pomiędzy immunofenotypem białaczkowych/chłoniakowych komórek obecnych we krwi obwodowej chorych z przewlekłą białaczką limfocytową B-komórkową, a wskaźnikami zaawansowania klinicznego, morfologii komórek i apoptozy (*Utility of laboratory tests in B-CLL patients in different clinical stages. International Journal of Hematology 2011; 93: 736-44*). B-CLL stanowi 30-40% wszystkich białaczek rozpoznawanych w krajach Europy Zachodniej i Stanach Zjednoczonych i jest najczęstszą postacią białaczki u chorych powyżej 65 roku życia. W chorobie tej, prawidłowe limfocyty T zastąpione są białaczkowym klonem limfocytów B wywodzącym się z populacji CD5-dodatnich limfocytów B1, pojawiających się we wczesnym okresie ontogenezy. Komórki białaczkowe charakteryzują się wydłużonym czasem przeżycia, wynikającym z zaburzeń mechanizmu apoptozy. Ponieważ nowotworowe limfocyty B, wysoce odporne na apoptozę *in vivo*, ulegają jej spontanicznie w warunkach *in vitro*, poszukuje się dowodów na udział niezidentyfikowanych do tej pory czynników zewnątrzkomórkowych, indukujących mechanizm oporności na apoptozę. U chorych postępuje akumulacja monoklonalnych CD5-dodatnich limfocytów B w fazie G0/G1, początkowo we krwi obwodowej i szpiku kostnym, a w miarę postępu choroby również w węzłach chłonnych, śledzionie i wątrobie. U zdrowych dorosłych, antygen CD5 jest markerem limfocytów T i występuje tylko na 5-30% limfocytów B krwi obwodowej. Mimo znaczącego postępu w rozumieniu patogenezy przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej, nadal nie odkryto skutecznej terapii, ściśle związanej z prawidłową diagnostyką różnicującą B-CLL z limfocytozą nienowotworową. Błędne rozpoznanie i zbędne leczenie, dotyczy nawet 30% tych chorych. Heterogeny przebieg, mimo podobnego obrazu klinicznego i morfologii komórek białaczkowych stwarza pilną potrzebę poszukiwania czynników określających stopień zaawansowania choroby oraz dynamiki przebiegu (stabilnego lub progresywnego), decydujących w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

W badaniach własnych wykazałam, że komórki białaczkowe charakteryzowały się ekspresją antygenów CD5 i CD23 na komórkach CD19+ oraz brakiem ekspresji antygenów CD3, CD4 i CD8. Zaburzenia takie nie występują na limfocytach odczynowych. Wysoka ekspresja antygeny CD5 pozwala na wykluczenie białaczki włochatokomórkowej, a w 50% przypadków – także białaczki prolimfocytowej, gdzie ekspresja tego antygeny jest ujemna. Stwierdzona obecność CD23 na powierzchni badanych komórek wyklucza chłoniaka strefy płaszcz. Wykazałam także, że wraz z zaawansowaniem nowotworu znamienne zwiększała się bezwzględna liczba komórek o fenotypie CD5+CD19+CD23+. Podobna obserwacja dotyczyła komórek z ekspresją CD38, związaną ze stanem mutacji Ig (V)H. U pacjentów lepiej rokujących, odsetek limfocytów CD38+ był porównywalny z grupą osób zdrowych, podczas gdy liczba dodatnich komórek znamienne wzrastała wraz ze wzrostem zaawansowania nowotworu. Według danych literaturowych, grupę chorych CD38+ cechuje większa aktywność telomerazy i wyższy odsetek komórek pozytywnych dla markera Ki-67, znakującego komórki proliferujące. Wykazano także, że ekspresja CD38+ jest przejawem aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej prowadzącej do proliferacji białaczkowych komórek B, ich oporności na bodźce proapoptotyczne, a tym samym do zwiększenia agresywności nowotworu. Wnioski te są zgodne z wynikami moich badań, w których wykazałam silną korelację odsetka komórek CD38+ z wrażliwością limfocytów na apoptozę. Wyniki te są także zgodne z obserwacją, że odsetek komórek CD38+ mniejszy od 20% świadczy o lepszym rokowaniu i prognozowaniu leczenia. Zwiększonej ekspresji molekuly CD38 w białaczkowych komórkach B towarzyszy obecność antygeny ZAP-70, związanego ze zwiększoną aktywnością sygnalizacyjną zachodzącą poprzez receptor BCR. Dogodną, z punktu widzenia diagnostyki, cechą ZAP-70 jest fakt, że w odróżnieniu od CD38, ekspresja tego antygeny stwierdzona na początku choroby jest niezmienna w czasie jej trwania. Uważa się, że wysoki poziom ZAP-70 przemawia za szybką progresją B-CLL oraz skróceniem średniego czasu przeżycia, który nie zależy od zaawansowania choroby w momencie rozpoczęcia leczenia. W badanej przeze mnie grupie chorych z niskim stopniem zaawansowania nowotworu, mniej niż 10% komórek wykazywało ekspresję ZAP-70. W grupach z II/B i III, IV/C stopniem zaawansowania klinicznego, średni odsetek komórek ZAP-70 pozytywnych przekraczał 50%. Przemawia to za ZAP-dodatnią formą B-CLL (tzw. niezmutowaną), charakteryzującą się gorszym rokowaniem. Uzyskane wyniki własne wykazały także, że zarówno ekspresja CD38 jak i ZAP-70 na białaczkowych komórkach koreluje silnie ujemnie z liczbą cieni Gumprechta, jak również z podatnością limfocytów na apoptozę. Wysoki odsetek komórek z ekspresją CD38 i ZAP-70 towarzyszący klonalnej

limfocytozie, niedokrwistości i małopłytkowości, a także mała liczba cieni Gumprechta i niska aktywność apoptotyczna mogą stanowić nie tylko uzupełniające się niekorzystne czynniki rokownicze w przebiegu CLL-B i odpowiedzi na leczenie już we wczesnych stadiach zaawansowania nowotworu, ale również mogą być pomocne w zrozumieniu biologii tego nowotworu.

Otrzymane wyniki skłoniły mnie do kontynuacji badań w tej grupie chorych i uwzględnienia związku populacji limfocytów Th wykazujących ekspresję receptora programowanej śmierci PD-1 z przebiegiem klinicznym i rokowaniem chorych z B-CLL (*Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4+ T cells in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia patients. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej 2015; 125: 553-559*). Receptor programowanej śmierci (PD-1) jest immunoreceptorem ulegającym indukowanej ekspresji na limfocytach T i negatywnym regulatorem odpowiedzi immunologicznej. Oddziałując z ligandami PD-L1 i PD-L2 obecnymi w wielu typach tkanek, PD-1 uczestniczy w mechanizmach tolerancji obwodowej, hamując aktywację, proliferację i funkcję efektorowych limfocytów T. Zaburzenia funkcjonowania szlaku PD-1/PD-L prowadzą do rozwoju chorób autoimmunologicznych oraz są opisywane w wielu typach nowotworów. Komórkowa ekspresja PD-1 ma istotny wpływ na mikrośrodowisko dla reakcji odpornościowych, a także może być wiązana z ucieczką komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego. W świetle najnowszych badań, limfocyty T u pacjentów z B-CLL wykazują cechy immunologicznego „wyczerpania”, podobne do obserwowanego w przewlekłych infekcjach wirusowych, a jednym z objawów takich zaburzeń jest wzrost ekspresji PD-1. Wykazano, że blokada receptora PD-1 przeciwciałami monoklonalnymi znacznie zwiększa aktywność przeciwnowotworową zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w badaniach klinicznych. Z kolei hamowanie kompleksu PD-1/PD-L1 u myszy wiązało się z indukcją B-CLL. Nie ma wątpliwości, że wzajemne interakcje pomiędzy komórkami T i B, a także innymi elementami odpowiedzi immunologicznej mogą wpływać na regulację różnicowania, dojrzewania i przeżycia komórek, a tym samym – na przebieg kliniczny B-CLL. Co więcej wpływając na liczbę, funkcję i fenotyp prawidłowych komórek T, mogą predysponować do choroby. Uwzględniając istotną rolę limfocytów T w regulacji funkcji limfocytów B, postanowiliśmy zbadać, czy ilościowa ocena limfocytów z ekspresją antygenów TCD4/PD-1 dokonana w chwili rozpoznania przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej u 56 pacjentów z różnym stadium zaawansowania choroby może mieć znaczenie rokownicze. Oceniliśmy także wpływ chemoterapii immunosupresyjnej na poziom limfocytów TCD4+PD-1+ we krwi

obwodowej. Wykazaliśmy, że we krwi obwodowej chorych w pośrednim i wysokim stadium przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej występuje znamienne większa liczba limfocytów T CD4+ z ekspresją PD-1+ w porównaniu z pacjentami z niskim stopniem zaawansowania choroby. Cecha ta charakteryzowała pacjentów zakwalifikowanych do natychmiastowego leczenia, w odróżnieniu od chorych pozostawionych do dalszej obserwacji. Co istotne, w przypadku pacjentów nieleczonych, u których w momencie diagnozy stwierdzono zwiększoną liczbę limfocytów T CD4+PD-1+, czas do rozpoczęcia leczenia był statystycznie krótszy w porównaniu z chorymi wykazującymi małą liczbę limfocytów T CD4+PD-1+. Wyniki badań własnych wykazały, że w CLL-B wzrost liczby limfocytów z ekspresją antygenów CD4+PD-1 powyżej 15,79% można uznać za niekorzystny czynnik rokowniczy, wskazujący na skrócenie okresu między rozpoznaniem a wdrożeniem leczenia. Potwierdzeniem tej tezy jest ścisła korelacja liczby limfocytów TCD4+PD-1+ z uznanymi czynnikami rokowniczymi, takimi jak leukocytoza, ogólna liczba limfocytów i stężenie hemoglobiny. Nie stwierdziliśmy natomiast związku ekspresji TCD4+PD-1+ ze stężeniem białka C-reaktywnego czy mutacjami w obrębie chromosomu 13 (delecja 17p) i 22 (trisomia 12, delecja 11q) sygnalizującymi odpowiednio: obecność infekcji lub innych czynników wiązanych z gorszym rokowaniem u pacjentów z B-CLL. Dalszych badań wymaga odpowiedź na pytanie, czy podwyższona liczba krążących limfocytów T CD4+PD-1+ u pacjentów z tą białaczką jest przyczyną, czy raczej konsekwencją dysregulacji i wyczerpania immunologicznego związanego z tym nowotworem.

Dalsze badania nad biomarkerami zaburzeń immunologicznych kontynuowałam w grupie chorych z najczęstszą postacią chłoniaka nieziarniczego, jakim jest agresywny chłoniak z dużych komórek B (*Flow-cytometry-based evaluation of peripheral blood lymphocytes in prognostication of newly diagnosed DLBCL patients. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2016; 59: 92-96*). Rozwój i różnicowanie nowotworowych komórek B (CD19^{high}CD20^{high}CD22^{high}CD23⁻) związane jest z szeregiem mutacji w obrębie immunoglobulin i białek anty-apoptotycznych, prowadzących do oporności komórek B na apoptozę. Ostatnio wiele uwagi poświęca się roli Treg w przebiegu tego chłoniaka. Komórki te znane są z aktywności immunosupresyjnej, wynikającej z ich profilu cytokinowego. Wydzielane IL-10, TGF- β i IL-35 hamują syntezę cytokin w TCD4+ i monocytach, indukują przetrwałą anergię komórek CD4+ i CD8+, a także ekspresję cząstek adhezyjnych, kostymulujących i MHCII na komórkach prezentujących antygen. TGF- β hamuje także proliferację limfocytów T oraz różnicowanie T1 i Th2. Wzrost liczby Treg infiltrujących tkankę guza wiązany jest z gorszym rokowaniem w większości nowotworów nie

wywodzących się z komórek krwi. Tymczasem, chorzy z guzami B-komórkowymi i zwiększonym poziomem Treg naciekających guz rokują lepiej niż ci z niską liczbą Treg, a przyczyna tego zjawiska nie jest poznana. Wiadomo, że Treg charakteryzują się obecnością antygenów CD4, CD25, CD3, CTLA4 i Foxp3. W zależności od ekspresji Foxp3, wśród Treg wyróżnia się populację komórek pierwotnych i/lub spoczynkowych z niską ekspresją Foxp3 oraz populację komórek efektorowych i/lub aktywowanych z Foxp3^{high}. Uwzględniając fakt, że funkcja antygeny Foxp3 wiązana jest ze zdolnością limfocytów Treg do tworzenia kompleksu Fas z receptorem CD95L inicjującym apoptozę i lizę komórki, można założyć, że w chłoniakach B-komórkowych limfocyty Treg, obok aktywności supresorowej mogą wykazywać zdolność do indukcji apoptozy zarówno prawidłowych jak i chłoniakowych komórek B na drodze perforyna/granzymy lub kompleksu Fas-FasL. Ostatnio stwierdzono także, że subkliniczne nawroty DLBCL poprzedza spadek liczby limfocytów krwi obwodowej, choć nie ustalono, jakie zaburzenia subpopulacji limfocytów leżą u podłoża limfopenii u chorych z DLBCL. Postanowiłam więc zbadać, czy ilościowa ocena limfocytów Treg CD4⁺/CD25⁺⁺⁺/FOXP3^{high}, limfocytów Tc z ekspresją antygenów CD3⁺/CD4⁺/CD5⁺/CD8⁺ oraz komórek B CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD79a⁺ może poprawić prognozowanie nowo zdiagnozowanych pacjentów z DLBCL. Jako pierwsza wykazałam, że znacząco zmniejszona bezwzględna liczba CD4⁺CD25⁺⁺⁺FOXP3^{high} we krwi obwodowej wiąże się ze złym rokowaniem w DLBCL. Zmniejszonej liczbie krążących komórek CD4⁺CD25⁺⁺⁺FOXP3^{high} towarzyszyła limfopenia i znamienne zmniejszenie odsetka komórek apoptotycznych, również nie obserwowane w grupach małego i średniego ryzyka. Spadek poziomu Treg we krwi obwodowej może być następstwem zwiększonej infiltracji tych komórek w węzłach chłonnych. Znaczący wzrost liczby krążących limfocytów Treg obserwowany w grupach małego i średniego ryzyka po chemioterapii może wynikać z wyraźnego zmniejszenia tkanki nowotworowej i braku sekwestracji Treg w mikrośrodowisku guza. U chorych z zaawansowaną postacią chłoniaka, pomimo leczenia, całkowita liczba Treg pozostawała znamienne niższa w porównaniu z innymi grupami pacjentów z DLBCL, co korespondowało ze słabą odpowiedzią na leczenie. Całkowita remisja (CR) po upływie 2 lat od leczenia w tej grupie chorych wyniosła 0%, podczas gdy w grupie średniego ryzyka sięgała 40%, a w grupie małego ryzyka wynosiła 82%. Współczynnik T: B był obniżony we wszystkich grupach chorych z DLBCL, ale po leczeniu pozostawał na najniższym poziomie jedynie w grupie wysokiego ryzyka. Co więcej, podczas gdy w grupach pacjentów małego i średniego ryzyka chemioterapia redukowała liczbę komórek chłoniakowych odpowiednio: kilkadziesiąt-kilkanaście razy, w grupie wysokiego

ryzyka liczba komórek nowotworowych zmniejszyła się jedynie do połowy. Wyniki moich badań wskazują, że obok limfopenii i obniżonego odsetka komórek apoptotycznych, zmniejszenie bezwzględnej liczby Treg CD4+CD25+++FOXP3^{high} może stanowić użyteczny wskaźnik oceny zaawansowania i prognozowania przebiegu chłoniaka DLBCL.

Problem poszukiwania nowych czynników prognostycznych i rokowniczych w nowotworach układu krwiotwórczego nie traci na aktualności, mimo dużej przydatności markerów cytogenetycznych i molekularnych. Wynika to m.in. z dużej heterogenności tych markerów, jak i z faktu, że znaczny odsetek chorych nie wykazuje zmian fenotypu cytogenetycznego lub molekularnego, jak to ma miejsce np. w przypadku 50% chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML). Nadal też nie stwierdzono związku przyczynowego między niekorzystnym rokowaniem a przebiegiem leczenia w AML. W tej grupie chorych przeprowadziłam badania nad przydatnością antygeny CD25, pełniącego funkcję receptora IL-2 wiązającego m.in. z podatnością limfocytów na aktywację i proliferację (*Enhanced pretreatment CD25 expression on peripheral blood CD4+ T cells predicts shortened survival in acute myeloid leukemia patients receiving induction chemotherapy. Pharmacological Reports 2016; 68: 12-19*). Po raz pierwszy zbadaliśmy ekspresję tego antygeny na krążących limfocytach TCD4+ u 46 pacjentów z nowo rozpoznaną ostrą białaczką szpikową, klasyfikowaną w oparciu o kryteria WHO. Chorych z korzystnym rokowaniem identyfikowano na podstawie mutacji [t (8; 21)], z pośrednim – na podstawie diploidalnych cech kariotypowych, duplikacji kinazy tyrozynowej typu FMS 3, z mutacją t(9, 11) oraz z innymi nieprawidłowościami, które nie zostały przypisane do pozostałych grup. Do grupy o niekorzystnym rokowaniu włączono chorych z del (5q) i del (7q). Wyniki naszych badań wykazały, że ryzyko zgonu po wprowadzeniu standardowej chemioterapii indukującej było niezależne od wyników badań cytogenetycznych, a korelowało dodatnio ze wzrostem ekspresji CD25 na limfocytach TCD4+. Dane te wskazują, że CD25 może stać się nowym, łatwo dostępnym markerem prognostycznym skróconego przeżycia pacjentów z AML poddawanych standardowej terapii cytotoksycznej. Analiza ekspresji CD25 może więc stanowić cenną część schematu prognostycznego nowo rozpoznanych pacjentów z AML. Rola ścieżek zależnych od CD25 i/lub IL-2 w patogenezie AML nie została jeszcze szczegółowo określona. Wiadomo, że IL-2 stymuluje cytotoksyczne limfocyty T i komórki NK swoiste dla nowotworu. Metaanaliza danych z badań klinicznych nad terapeutycznym potencjałem IL-2 nie wykazała jednak pozytywnych skutków podawania tej interleukiny chorym z AML. Podobnie niejasne jest, dlaczego zwiększona gęstość antygeny CD25 na powierzchni limfocytów TCD4+, a także zwiększona liczba limfocytów TCD4+/CD25+

wykazana u chorych z AML przed leczeniem, wiąże się z większym ryzykiem zgonu w indukcyjnej fazie chemioterapii u nowo zdiagnozowanych pacjentów. W przyszłości planuję kontynuację badań m.in. w celu oceny, czy zwiększona ekspresja CD25 na limfocytach TCD4+ wiąże się z podwyższonym stężeniem IL-2 we krwi chorych z nowo diagnozowaną AML.

Dalsze badania nad użytecznością diagnostyczną antygenów limfocytarnych jako biomarkerów zaburzeń immunologicznych prowadziłam u osób z wtórnym niedoborem odporności nie związanym z nowotworową transformacją komórek immunologicznych. Grupę badaną stanowiły dzieci z najbardziej znanym zaburzeniem chromosomowym u ludzi, jakim jest zespół Downa (DS). Towarzyszy mu zwiększona częstość występowania zakażeń bakteryjnych i wirusowych, manifestujących się klinicznie przewlekłymi infekcjami górnych i dolnych dróg oddechowych, w tym przewlekłym nieżytem nosa, zapaleniem i przerostem migdałków oraz zapaleniem ucha środkowego. W DS częściej występują także choroby autoimmunologiczne, m.in. choroba Hashimoto, Gravesa-Basedowa, cukrzyca typu I, zapalenie wątroby, celiakia, łysienie plackowate i bielactwo. Występujące w tym zespole mechanizmy dysfunkcji immunologicznej są złożone i związane z dodatkową sekwencją genową chromosomu 21 i drugorzędnymi zaburzeniami interakcji międzykomórkowych. Większości zaburzeń ekspresji genów odpowiedzialnych za niedobory odporności u osób z DS nie poznano w pełni. Sugeruje się, że znaczącą rolę w rozwoju tych zaburzeń może odgrywać IL-17A wytwarzana przez limfocyty Th17. Będąc członkiem zespołu prowadziłam nowatorskie badania u dzieci z Zespołem Downa, oceniające ekspresję genu IL17A w locus chromosomu 6p12i, a także wewnątrzkomórkowy poziom białka IL-17A w krążących limfocytach TCD4+ klasyfikowanych jako komórki Th17 (*Decrease of interleukin (IL)17a gene expression in leucocytes and in the amount of IL-17a protein in CD4+ T cells in children with Down syndrome. Pharmacological Reports 2015; 67: 1130-1134*). Według najnowszych doniesień, limfocyty Th17 odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób zapalnych i autoimmunologicznych. Są funkcjonalnie zaangażowane w odpowiedź immunologiczną przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym i mają zdolność wydzielania IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-23. Jako pierwsi wykazaliśmy zmniejszoną ekspresję mRNA IL-17A w leukocytach krwi obwodowej dzieci z DS oraz współistniejące obniżenie komórkowego poziomu IL-17A. Wyniki naszych badań mogą tłumaczyć przyczynę defektu wczesnego etapu odpowiedzi zapalnej, w którym efektywna aktywacja neutrofilów, kooperacja makrofagów i właściwy poziom mediatorów zapalenia zależą od ścieżki sygnałowej indukowanej przez IL-17A. Tak więc, zmniejszenie ekspresji IL-17A

w limfocytach Th17 może odgrywać znaczącą rolę w etiologii zakażeń u dzieci z Zespołem Downa.

Istotnym problemem klinicznym pozostaje immunosupresja towarzysząca zabiegom chirurgicznym wykonywanym w znieczuleniu (*Total knee replacement induces peripheral blood lymphocytes apoptosis and it is not prevented by regional anesthesia - a randomized study. Revista Brasileira de Anestesiologia 2015; 66: 133-139*). Wiadomo, że taki zabieg wiąże się zarówno z bezpośrednim uszkodzeniem tkanek, z hipotermią, unieruchomieniem i z wpływem znieczulenia, a czasami nawet z miejscowym niedokrwieniem i wpływem transfuzji krwi. W sumie, zabieg chirurgiczny wywołuje kompleksową odpowiedź systemową, obejmującą aktywację układu współczulnego, hormonalnego oraz immunologicznego. Mechanizmy immunologiczne powinny sprostać zarówno potencjalnym infekcjom związanym z bezpośrednim uszkodzeniem naturalnych barier obronnych skóry i błon śluzowych, jak również – zapewnić ochronę przed odpowiedzią autoimmunologiczną, stymulując procesy rozpoznawania własnych antygenów. Wobec znanego od dawna zjawiska limfopenii pooperacyjnej nasilającej się proporcjonalnie do rozległości urazu oraz potrzeby optymalizacji wyboru środków i metod znieczulenia, interesującą wydaje się ocena ilościowych zmian subpopulacji limfocytów oraz dynamiki apoptozy u osób operowanych. Chociaż badania nad wpływem anestezji na żywotność limfocytów w warunkach *in vitro* potwierdzają proapoptotyczne działanie niemal wszystkich środków znieczulających, obserwacje kliniczne zmierzające do określenia środka i rodzaju znieczulenia minimalizującego działanie immunosupresyjne, pozostają niejednoznaczne. W badaniach własnych prześledziliśmy immunofenotyp i żywotność limfocytów krwi obwodowej u 45 pacjentów poddanych całkowitej wymianie stawu kolanowego. Wykazaliśmy znamienne spadki liczby krążących limfocytów T CD3/4 i T CD3/8 tuż po zamknięciu rany pooperacyjnej. Obniżona liczba Th utrzymywała się w pierwszej dobie po operacji, ale istotnie wzrastała 7 dni po zabiegu, osiągając poziom sprzed operacji. Natomiast obniżona liczba limfocytów cytotoksycznych utrzymywała się nawet po tygodniu od operacji, stąd może być odpowiedzialna za utrzymującą się limfopenię pooperacyjną, tym bardziej, że populacja limfocytów B uległa normalizacji już w dobie po zabiegu, a liczba komórek NK nie zmieniała się istotnie w ciągu całego okresu obserwacji. Ocena apoptozy limfocytów u pacjentów w grupach ze znieczuleniem ogólnym, podpajęczynówkowym oraz podpajęczynówkowo-zewnątrzoponowym wykazała zwiększony odsetek komórek apoptotycznych już po zakończeniu zabiegu, a tendencja ta utrzymywała się nawet po 7 dniach od operacji, zwłaszcza u osób po znieczuleniu ogólnym. Ocena różnic nasilenia

apoptozy uwzględniająca rodzaj znieczulenia nie wykazała istotności statystycznych i wymaga poszerzenia grupy badanej. Uzyskane wyniki wskazują na związek apoptozy limfocytów CD3/8⁺ z czynnikami pozaoperacyjnymi, takimi jak m.in.: długotrwałe unieruchomienie, obecność implantu stawu kolanowego lub pooperacyjna antybiotykoterapia, profilaktyka przeciwzakrzepowej i przeciwbólowa, a potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Ciekawych danych dostarczyły badania związku antybiotykoterapii z immunofenotypem leukocytów krwi obwodowej i mikrobiotą jelit (*The effect of penicillin administration in early life on murine gut microbiota and blood lymphocyte subsets. Anaerobe 2017; 47: 18-24*). Kolonizacja przewodu pokarmowego przez różnorodne drobnoustroje jest znanym od dawna mechanizmem chroniącym organizm przed rozwojem patogennej flory jelitowej. Badania ostatnich lat dostarczają wielu nowych dowodów na istotny związek wrodzonych i nabytych mechanizmów odpornościowych z mikrobiomem jelit. Wykazano m.in., że zaburzenia równowagi w obrębie flory jelitowej wywołane zmianą nawyków żywieniowych w ciągu pierwszych dwóch lat życia lub przyjmowanymi antybiotykami mogą predysponować do zaburzeń immunologicznych, takich jak cukrzyca typu 1, reumatoidalne zapalenie stawów, choroby wątroby, celiakia i nieswoiste zapalenie jelit. Istotne i przetrwałe nawet do 2 lat, zmiany w składzie mikroflory jelit powodował nawet jednodobny cykl antybiotykoterapii. Potwierdzono również, że antybiotyki stosowane w pierwszym roku życia zwiększają ryzyko rozwoju astmy. Uwzględniając te fakty, postanowiliśmy określić wpływ podawania penicyliny na mikrobiom jelit oraz immunofenotyp krążących leukocytów u młodych samców myszy C57BL6/J/cmdb, hodowanych przez 4 tygodnie w wolnych od patogenów klatkach wentylacyjnych i traktowanych niską dawką penicyliny (1µg/1g masy ciała). W tkance okrężnicy oraz w stolcu wykazaliśmy selektywny wzrost anaerobowych, Gram-ujemnych bakterii *Parabacteroides goldsteinii*, współistniejący ze zwiększonym odsetkiem limfocytów B we krwi obwodowej, obniżonym poziomem limfocytów CD4⁺ i istotnymi zaburzeniami w obrębie subpopulacji Treg, Th1 i Th2. Bakterie *Parabacteroides goldsteinii* są obecne także w ludzkich jelitach, a także są izolowane z ropni jamy brzusznej i otrzewnej, z płynu gromadzącego się w przebiegu zapalenia uchyłka, zapalenia jelita grubego i martwicy jelita krętego. Wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują na znaczący wpływ penicyliny na komórkowy kompartment mechanizmów immunologicznych u młodych myszy, a ten efekt można wiązać z dysbiozą, przejawiającą się ekspansją *Parabacteroides goldsteinii*. W dobie łatwego dostępu do antybiotyków oraz ich powszechnego nadużywania, badania wpływu

antybiotyków na status immunologiczny komórek odpornościowych zyskują istotny wymiar kliniczny. Określenie immunofenotypu limfocytów w trakcie antybiotykoterapii może stanowić ważne narzędzie diagnostyczne, przydatne w ocenie zagrożeń powikłaniami antybiotykoterapii, takimi jak rozwój chorób autoimmunologicznych lub alergicznych.

WNIOSKI:

- zwiększenie bezwzględnej liczby limfocytów z immunofenotypem CD5+CD19+CD23+ może być biomarkerem wzrostu zaawansowania przewlekłej białaczki limfocytowej B-komórkowej (B-CLL);
- wysoki odsetek komórek z ekspresją CD38 i ZAP-70 towarzyszący klonalnej limfocytozie, a także mała liczba cieni Gumprechta i niska aktywność apoptotyczna krążących limfocytów mogą stanowić uzupełniające się, niekorzystne czynniki rokownicze we wczesnych stadiach zaawansowania B-CLL oraz odpowiedzi na leczenie;
- wzrost limfocytów z ekspresją antygenów CD4+PD-1 powyżej 15,79% można uznać za niekorzystny czynnik rokowniczy w B-CLL, wskazujący na skrócenie okresu między rozpoznaniem a wdrożeniem leczenia. Ekspresja antygenów TCD4+PD-1+ nie ma związku z uznanymi niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak stężenie CRP i mutacje w obrębie chromosomu 13 (delecja 17p) oraz 22 (trisomia 12, delecja 11q);
- w chłoniaku z dużych komórek B, obok limfopenii i obniżonego odsetka komórek apoptotycznych, zmniejszenie bezwzględnej liczby komórek z immunofenotypem CD4+CD25+++FOXP3^{high} może stanowić użyteczny wskaźnik oceny zaawansowania i prognozowania przebiegu chłoniaka DLBCL;
- CD25 może pełnić rolę nowego, łatwo dostępnego i niezależnego od wyników badań cytogenetycznych, biomarkera skróconego czasu przeżycia chorych poddawanych standardowej terapii indukującej w nowo rozpoznanej ostrej białaczce szpikowej (AML);
- zmniejszona ekspresja mRNA IL-17A w limfocytach krwi obwodowej oraz współistniejące obniżenie komórkowego poziomu IL-17A może odgrywać znaczącą rolę w etiologii zakażeń u dzieci z Zespołem Downa;
- zjawisko limfopenii pooperacyjnej wiąże się głównie z apoptozą limfocytów CD3+/CD8+, indukowaną zarówno czynnikami okołooperacyjnymi, jak i pozaoperacyjnymi;

- wpływ antybiotykoterapii na status immunologiczny można wiązać z zaburzeniami ilości, składu i funkcjonowania mikroflory jelitowej.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

A. Dane bibliometryczne.

Jestem autorem i współautorem 41 publikacji naukowych, w tym 36-u prac oryginalnych, z których w 13 jestem pierwszym lub drugim autorem. Ponadto, jestem współautorem 48 krajowych i zagranicznych doniesień zjazdowych (Austria, Dania, Czechy, Niemcy, Włochy, USA) opublikowanych w czasopismach lub materiałach zjazdowych.

Mój łączny dorobek naukowy określają następujące wskaźniki:

- Impact factor IF ISI: **64.32**
- Punkty wg MNiSW: **700**
- Indeks Hirscha wg Web of Science: **7**
- Liczba cytowań wg Web of Science: **161**

B. Tematyka prac badawczych (nie wchodzących w skład osiągnięcia wymienionego w punkcie 4).

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład osiągnięcia wymienionego w punkcie 4 dotyczy czterech głównych nurtów tematycznych:

- zaburzeń równowagi immunologicznej w chorobach autoimmunologicznych u dzieci i młodzieży oraz w reakcjach alergicznych u dorosłych,
- apoptozy w warunkach *in vivo* i *in vitro*,
- laboratoryjnych markerów aktywacji płytek krwi.

Zaburzenia równowagi immunologicznej w chorobach autoimmunizacyjnych u dzieci i młodzieży.

Zaburzenia równowagi między subpopulacjami limfocytów T odgrywają znaczącą rolę w patogenezie autoimmunizacyjnych chorób tarczycy: chorobie Hashimoto i chorobie Graves-Basedowa. Ostatnio wiele uwagi poświęca się subpopulacji Th17, sklasyfikowanej na podstawie powierzchniowych markerów CD196, IL-23R, IL-12Rbeta2 i CD161 jako nowa linia Th, odmienna od limfocytów Th1, Th2 i komórek Treg (*IIB7, IIIA30, IIIA34, IIIA35, IIIA39, IIIA41*). Ustalono, że komórki te są zaangażowane w odpowiedź immunologiczną na patogeny pozakomórkowe i mają zdolność wydzielania cytokin: IL-17, IL-17F, IL-22 i IL-21.

U pacjentów z nieleczoną chorobą Hashimoto stwierdziliśmy istotny statystycznie wzrost odsetka komórek Th17 o fenotypie CD4+CD161+CD196+ i CD4+IL-17+ w porównaniu do grupy kontrolnej. Przeprowadzona ocena zależności między stężeniem przeciwciał przeciwtarczycowych anty-TPO a odsetkiem limfocytów Th17 wykazała dodatnią korelację. U dzieci z chorobą Graves-Basedowa nie wykazano istotnych zmian w obu populacjach komórek zarówno przed jak i w trakcie leczenia nadczynności tarczycy. Uzyskane wyniki wskazują na udział krążących komórek Th17 CD4+CD161+CD196+ i CD4+IL17+ w rozwoju autoimmunizacyjnego procesu zapalnego w chorobie Hashimoto. Oceniliśmy też limfocyty T regulatorowe, które odgrywają wiodącą rolę w mechanizmach tolerancji immunologicznej (*IIA9*). U nieleczonych pacjentów z chorobą Graves-Basedowa i Hashimoto zaobserwowano znaczne zmniejszenie populacji limfocytów Treg CD4+FoxP3+ i CD4+CD25 w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Po 6-12 miesiącach terapii L-tyroksyną fenotyp Treg ulegał normalizacji jedynie u dzieci z chorobą Hashimoto.

Oceniając udział subpopulacji limfocytów T w zaburzeniach towarzyszących autoagresji u dzieci, zbadaliśmy również ekspresję CD127 na komórkach CD4+, CD4+CD25+ i CD8+ w przebiegu cukrzycy typu 1 (T1D) w odniesieniu do parametrów metabolicznych, zapalnych i naczyniowych (*IIA10*, *IIIA38*). Uzyskane wyniki wykazały znaczący spadek ekspresji CD127 na limfocytach CD4+ w porównaniu do CD8+, świadcząc o odmiennych sposobach modulacji ekspresji tego antygeny na limfocytach T CD4+ i CD8+ w przebiegu T1D. Spostrzeżenie to uzupełnia obecny stan wiedzy, wg której obie subpopulacje komórek pełnią różne role w patogenezie cukrzycy typu 1. Uzyskane dane Brak korelacji między poziomem CD127 obu subpopulacji limfocytów a BMI, hsCRP i liczbą krwinek białych nie potwierdza związku CD127 ze zmianami metabolitycznymi i/lub zapalnymi. Poziomy CD127 na limfocytach T CD4+ jak i CD8+ nie korelowały również z HbA1C. Co ciekawe, ekspresja CD127 na limfocytach CD4+ korelowała z komórkami Treg o fenotypie CD4+CD25+CD127-, a te – z poziomem komórek progenitorowych śródbłonna CD34+CD144+. Z kolei, ekspresja CD127 na limfocytach CD8+ była zależna od stężenia VEGF i triglicerydów. Te ostatnie dane były przyczynkiem do powstania kolejnej publikacji poświęconej komórkom progenitorowym śródbłonna (EPC) i ich związku z zaburzeniami funkcji i struktury naczyń u dzieci z T1D (*IIA11*). EPC identyfikowano przeciwciałami anty-CD34, anty-CD144 (kadheryna VE) i anty-CD309 (VEGFR-2). Częstość występowania komórek z dodatnim antygenem CD34 była podobna w grupach dzieci zdrowych i chorych, ale liczba komórek CD34+VE+ była znamienne większa u dzieci z T1D. Podobnie, u chorych dzieci stwierdzono zwiększoną liczbę komórek CD34+VEGFR+. Jednocześnie,

u dzieci z T1D stwierdzono zaburzenie funkcji śródbłonna, ocenianej ultrasonograficznie rozszerzeniem tętnicy ramiennej (*flow-mediated dilatation*) oraz większą grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej (*intima-media thickness*) tętnicy szyjnej. Wykazano też istotny związek pomiędzy komórkami CD34+VEGFR-2+ a BMI, HDL, sICAM-1 i FMD. Podobnie, BMI i FMD korelował z ekspresją CD34+VE+. Tym samym wykazano, że wyższy poziom komórek progenitorowych śródbłonna u dzieci z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego może stanowić niekorzystny czynnik prognostyczny, wskazując kierunek dalszych badań.

Związek EPC z parametrami stanu zapalnego, wskaźnikami rozwoju miażdżycy tętnic oraz leczeniem przeciwzapalnym badaliśmy także u chorych z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (JIA) (*IIA16*). JIA może być związane z uszkodzeniem warstwy śródbłonna, którego struktura i funkcja zależą od naprawczych zdolności komórek progenitorowych (EPC). U dzieci z JIA liczba EPC nie odbiegała od normy, nie stwierdzono także zależności liczby EPC z aktywnością choroby. Ponadto nie znaleziono znaczących relacji pomiędzy EPC i parametrami rozwoju miażdżycy tętnic FMD i IMT. Poziom EPC u pacjentów z JIA był ujemnie skorelowany ze wskaźnikiem oporności na insulinę i TNF-alfa, pomimo faktu, że poziom insuliny endogennej u pacjentów z JIA był porównywalny do poziomu widocznego u dzieci zdrowych. Wykazaliśmy też, że podawanie GC wiązało się z obniżeniem liczby EPC, zwłaszcza w terapii skojarzonej z metotreksatem i etanerceptem.

Wpływ hormonów płciowych na komórki EPC opisaliśmy w kolejnej pracy, poświęconej mobilizacji komórek macierzystych u kobiet (*IIA20*). Wyniki badań wykazały, że o ile terapia klinicznie stosowanymi dawkami FSH powodowała znamienny wzrost liczby komórek o fenotypie Lin-CD235a-CD45-CD133+ (VSEL) oraz Lin-CD235a-CD45+CD133+ (HSPC), to pozostawała bez wpływu na poziom komórek progenitorowych śródbłonna. Tym samym, FSH może stać się obiecującym narzędziem do mobilizacji HSPC i VSEL, wspierających rozwój komórek pochodzenia germinального.

Zaburzenia równowagi immunologicznej w reakcjach alergicznych u dorosłych.

Rola układu immunologicznego w reakcjach alergicznych pozostaje nadal niejasna. W cyklu prac poświęconych tej tematyce poszukiwano mechanizmów aktywacji poszczególnych składowych reakcji alergicznych oraz ich regulatorów. Zbadano rolę receptora dla IL-7R (*IIA13*), znaczenie CD25, jako kluczowego markera aktywacji limfocytów T (*IIB8*) oraz związek T CD4+ zdolnych do wytwarzania IL-10 z komórkami odpowiadającymi na działanie tej cytokiny (*IIA14*).

Interleukina 7 odpowiada przede wszystkim za przeżycie limfocytów antygenowo dziewiczych, spoczynkowych limfocytów T i komórek pamięci. Wykazano, że u zwierząt z niedoborem IL-7 żywotność limfocytów T jest upośledzona, natomiast nadekspresja IL-7 prowadzi do zwiększonej proliferacji komórek T. Receptor tej cytokiny jest zbudowany z łańcucha α (IL-7R α , CD127, wspólnego z limfopoetyną grasiczą) i łańcucha γ (CD122), znanego jako wspólny łańcuch receptorowy gamma, identyczny z podjednostkami dla receptorów IL-2, -4, -9, -15 i -21. Przekazywanie sygnałów przez receptor interleukiny-7 (IL-7R) jest niezbędny do regulacji homeostazy limfocytów T i ich przeżycia (*IIA13*). Na wcześniejszym etapie badań wykazaliśmy obniżone stężenie IL-7R w zakażeniu małpim wirusem nabytego upośledzenia odporności (SIV, z ang. *simian immunodeficiency virus*). Dotychczas nie wyjaśniono, czy zmiany w ekspresji IL-7R można powiązać również z nieinfekcyjnymi chorobami zapalnymi lub z leczeniem przeciwwzapalnym. Zbadaliśmy więc ekspresję IL-7R na powierzchni limfocytów CD4⁺ i CD4⁻ u chorych z astmą, wykazując znamienne zmniejszenie ekspresji IL-7R na limfocytach T CD4⁺ u pacjentów z łagodną i umiarkowaną postacią astmy. Po leczeniu wziewnymi dawkami GC w obu grupach badanych poziom IL-7R normalizował się. W surowicy i płwocinie chorych z astmą oskrzelową nie stosujących GC nie obserwowano zmian w stężeniu IL-7, z kolei - nawet krótkotrwałe podawanie doustne GC pacjentom z astmą prowadziło do istotnego zwiększenia IL-7R.

Interleukina 2 (IL-2) zidentyfikowana jako czynnik wzrostu komórek T (TCGF- *T cell growth factor*) aktywuje i wydłuża czas przeżycia komórek efektorowych oraz wzmaga efektywność ich działania, stymulując syntezę szeregu cytokin, m.in. czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF α , ang. *Tumor necrosis factor*), interferon gamma (IFN γ), GM-CSF. W kolejnej pracy oceniono poziom ekspresji podjednostki alfa receptora dla IL-2 (CD25) na powierzchni limfocytów T CD4⁺ krwi obwodowej pacjentów z astmą (*IIB8*). Stan zapalny leżący u podłoża astmy związany jest z aktywacją różnych komórek immunologicznych, w tym limfocytów T obecnych w dolnych drogach oddechowych. Badaniami objęto grupę 63 pacjentów z łagodną, umiarkowaną lub ciężką astmą atopową, nieleczoną oraz leczoną wziewnymi i/lub systemowymi glikokortykosteroidami (GKS). W żadnej z badanych grup nie obserwowano zmian w ekspresji kluczowego wskaźnika aktywacji limfocytów, co sugeruje, że w astmie nie dochodzi do zaburzenia homeostazy immunologicznej angażującej limfocyty CD4⁺. W następnej pracy przeprowadziliśmy kompleksową analizę zależności między tempem rozwoju odpowiedzi astmatycznej po prowokacji alergenem a cytokinową odpowiedzią komórek Th (*IIA14*). U pacjentów z astmą obserwowano znaczną ekspansję

limfocytów T CD4+CD25-CD127- w 6 h po podaniu leków, a powrót do wartości wyjściowych następował w ciągu 24 godzin. W grupie badanej zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek CD4+CD25+CD127+ i CD4+CD25-CD127+ po 24 h od podania leku. Co ciekawe, w początkowej fazie, pomimo porównywalnych poziomów IL-10, u pacjentów z astmą zaobserwowano niższe poziomy wszystkich podgrup komórek T CD4+CD210+. W grupie badanej liczba tych komórek uległa dalszemu zmniejszeniu po prowokacji oskrzeli, czemu towarzyszyło zmniejszenie stężenia IL-10 w surowicy. Nasze wyniki sugerują, że dynamiczne interakcje pomiędzy komórkami CD4+ odpowiadającymi na wytwarzanie IL-10 mogą sprzyjać patogenezie astmy u osób atopowych, a strategii terapeutyczne celowane na oś IL-10 / IL-10R mogłyby być pomocne w łagodzeniu intensywności reakcji oskrzeli po narażeniu na alergen.

W ostatniej pracy z tego cyklu przeprowadziliśmy symultaniczną analizę korelacji pomiędzy poziomami antygenów CD14, CD16, CD163, CD206, CD124 (IL-4R), CD210 (IL-10R) oraz CD25, CD124, CD127 (IL-7R) i CD210 na limfocytach T CD4+ oraz monocytach u 50 nieleczonych chorych na alergiczne nieżyty nosa (*IIA12*). Okazało się, że ekspresja antygeny CD163 na monocytach w grupie chorych koreluje dodatnio z monocytową IL-10R, a w mniejszym stopniu, również z ekspresją CD206. Ponadto, liczba monocytów z ekspresją CD124 (IL-4R) i CD210 (IL-10R) dodatnio korelowała z ekspresją tych antygenów na komórkach T CD4+ u chorych i zdrowych. Tym samym wykazano, że alergiczny nieżyt nosa wiąże się z wieloma fenotypowymi zmianami krążących monocytów i limfocytów T CD4+ co może wpływać na zaburzenia kooperacji między komórkami immunologicznymi, a tym samym ścieżek sygnałowych odpowiedzi immunologicznej. Warto też wspomnieć o zaobserwowanej interferencji niektórych antykoagulantów na pomiar ekspresji powierzchniowych antygenów monocytarnych. Problem ten opisaliśmy w pracy poświęconej cytometrycznej analizie receptorów CD163 i CD36 (*IIA2*). Wykazaliśmy, że ekspresja CD163 oceniona za pomocą przeciwciała barwionego fikoerytryną (PE) o klonie GHI/ 61 wyraża się znacznie większą intensywnością na monocytach pochodzących z krwi wersenianowej, niż z krwi pobranej na heparynę czy cytrynian. Jednocześnie, monocyty izolowane w gradiencie gęstości charakteryzowały się bardzo niską ekspresją CD163, niezależnie od stosowanego antykoagulantu. Różnic takich nie obserwowaliśmy w przypadku receptora CD36 barwionego allofikocyjaniną (APC) o klonie NL07 (CD38).

Ocena apoptozy w warunkach in vivo i in vitro

Ważnym kierunkiem mojej pracy badawczej była programowana śmierć komórkowa, a wyniki badań z tego zakresu przedstawiłam w 11 publikacjach. Apoptoza odgrywa ważną rolę nie tylko w eliminacji uszkodzonych komórek, ale również warunkuje prawidłową budowę narządów i tkanek, usuwając zbędne komórki podczas rozwoju i wzrostu organizmu. Potwierdzono doświadczalnie, że nasiloną apoptoza może być przyczyną chorób degeneracyjnych czy bezpłodności, a zahamowanie tego procesu może prowadzić do rozwoju nowotworów. Wyróżnia się dwa główne szlaki aktywacji apoptozy: zewnętrzny (związany z receptorami śmierci) oraz wewnętrzny (mitochondrialny). Do receptorów toru zewnątrzkomórkowego należą białka nadrodziny czynnika nekrozy TNF (m.in. TNFR1, TNFR2, Fas/CD95/Apo1, TRAIL/Apo2) zbudowane z domen zewnątrzkomórkowych, transbłonowych i cytoplazmatycznych. Receptor związany ze swoim ligandem uruchamia kaskadę sygnałową, w której C-końcowa domena DD (*death domain*) białka adaptorowego FADD, łączy się z odcinkiem DED prokaspazy 8 lub 10. Następuje aktywacja kaskady kaspaz wykonawczych, prowadzących do śmierci komórki. Szlak receptorowy może się łączyć ze szlakiem wewnętrznym poprzez białko Bid, które ulega proteolizie do postaci tBid (*truncated Bid*). Skrócona postać tego peptydu przemieszcza się na powierzchnię mitochondrium i aktywuje wewnętrzny szlak apoptozy, którego najważniejszym elementem są mitochondrialne megakanały (ang. *PTP – permeability transition pore*), umiejscowione na styku dwóch błon. Otwarte – uwalniają do cytoplazmy cytochrom c (Apaf 2), który przy udziale energii, może się połączyć z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf 1 oraz kaspazą 9. W powstałym kompleksie, zwanym apoptosomem lub kołem śmierci, kaspaza 9 ulega aktywacji. W ciągu kilku godzin, jakie mijają od momentu pobudzenia do rozpadu komórki, obserwuje się charakterystyczne zmiany morfologiczne, takie jak: obkurczanie i zaokrąglenie komórki, kondensacja chromatyny i fragmentacja jądra. W przeciwieństwie do martwicy, błona komórkowa zachowuje swoją integralność aż do końcowego etapu, kiedy następuje rozpad komórki i formowanie ciałek apoptotycznych.

Badania apoptozy zostały ujęte w dwa cykle tematyczne. Pierwszy dotyczy ekspresji antygenów komórek obecnych w ostrych białaczkach u dorosłych, drugi obejmuje zmiany ekspresji fostatydyloseryny w komórkach poddanych działaniu różnych związków chemicznych.

W pracy dotyczącej oceny nasilenia apoptozy leukocytów u 70 chorych z ostrą białaczką szpikową (AML) zróżnicowanych pod kątem czasu przeżycia, skupiliśmy się na określeniu ekspresji Bcl-2 i Bax przed i po terapii indukcyjnej (IIA1, IIIA17). U pacjentów z dłuższym

czasem przeżycia zaobserwowaliśmy po leczeniu indukcyjnym wzrost leukocytów apoptotycznych, z towarzyszącą normalizacją rutynowych testów laboratoryjnych. W tej grupie chorych stosunek Bcl-2/Bax był podobny do kontroli i nie zmienił się po leczeniu. U pacjentów z krótszym czasem przeżycia wskaźnik Bcl-2/Bax był wyższy zarówno przed, jak i po zakończeniu terapii indukcyjnej. W obu grupach chorych analiza Western blot wykazała obecność prążków reagujących z przeciwciałem anti-Bcl-2 lub anti-Bax, nieobecnych u osób zdrowych. Podsumowując, niski odsetek leukocytów apoptotycznych po terapii indukcyjnej, zwiększony stosunek Bcl-2/Bax oraz obecność prążków elektroforetycznych Bcl-2 i Bax u chorych z AML mogą być rozważane jako niekorzystne czynniki prognostyczne. W kolejnej pracy (*IIB4, IIIA1, IIA4, IIIA5, IIIA18, IIIA20*) sprawdziłam związek wybranych białek uczestniczących w kaskadzie sygnałowej kinaz z rodziny MAP z nasileniem spontanicznej i indukowanej apoptozy leukocytów u chorych z AML. Apoptozę identyfikowałam metodą cytometrii przepływowej, a białka ERK i JNK oceniałam za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i Western-blottu. Wykazałam znamienne nasilenie indukowanej apoptozy u chorych lepiej rokujących, a także istotną różnicę aktywności ERK między grupami chorych. U pacjentów z lepszym rokowaniem występował wzrost aktywności ERK. Analiza określonych regulatorów apoptozy umożliwia lepsze zrozumienie biologii komórki białaczkowej oraz może być podstawą do definiowania nowych podgrup chorych i nowych koncepcji terapeutycznych. Takie wnioski wynikają również z badań prowadzonych w ostrej białaczce limfoblastycznej B i T-komórkowej, gdzie wykazaliśmy znamienne wzrost odsetka komórek CD34+, zwiększoną ekspresję wewnątrzkomórkowego Bcl-2, wskaźnika DNA i aktywności proliferacyjnej przy niskiej ekspresji FasR i obniżonym indeksie apoptotycznym (*IIF1, IIIA15, IIIA16, IIIA20*). Limfoblasty wywodzące się z linii T charakteryzowały się znamienne wyższym indeksem DNA, dwukrotnie wyższym odsetkiem komórek FasR+ oraz znamienne wyższym indeksem apoptotycznym w porównaniu z B-ALL.

Uczestniczyłam także w badaniach na hodowlach komórkowych, oceniających wpływ potencjalnych chemioterapeutyków na ekspresję komórkowej fosfatydoseryny. Dzięki eksternalizacji fosfatydoseryny, komórki apoptotyczne mogą być rozpoznawalne przez receptory komórek fagocytykujących, a następnie pochłaniane. Zapobiega to uwolnieniu czynników prozapalnych do otaczającej tkanki i warunkuje niski stopień immunogenności tej formy śmierci komórki. Efektem prac finansowanych z grantów MNiSW: 2P05F 017. 27 i N N405 355537 było opracowanie syntezy i zbadanie zależności między strukturą i aktywnością związków wpływających na komórki raka sutka (*IIA3, IIA4, IIIA21, IIIA22*,

IIIA29). W pracy opisaliśmy syntezę analogów netropsyny i distamycyny, związków które selektywnie wiążą się z węższą bruzdą B-DNA. Distamycyna i netropsyna są naturalnymi antybiotykami o silnym działaniu przeciwnowotworowym, izolowanymi z *Streptomyces netropsis* i *Streptomyces distallicus*. Netropsyna hamuje wzrost bakterii G(+) i G(-), prątków kwasoodpornych pierwotniaków i namnażanie się wirusów zwierzęcych. Distamycyna hamuje syntezę DNA Herpes simplex, a także wiąże się z fragmentami retrowirusa HIV-1. Zsyntezowano i zbadano 14 pochodnych obu antybiotyków. Wszystkie karbocykliczne analogi distamycyny miały właściwości antyproliferacyjne wobec linii komórkowych raka sutka oraz wywoływały śmierć komórek na drodze apoptozy, potwierdzonej zarówno metodą mikroskopii fluorescencyjnej, jak i cytometrii przepływowej. Karbocykliczne analogi distamycyny, netropsyny oraz innych związków wiążących się z węższą bruzdą DNA stanowią grupę potencjalnych środków przeciwnowotworowych o wielokierunkowym działaniu. Hamują działanie topoizomerazy, a poprzez selektywne wiązanie z DNA mogą też hamować działanie enzymów restrykcyjnych. Oba czyste antybiotyki wykazują właściwości cytotoksyczne *in vitro* i *in vivo* w stosunku do nowotworów Ehrlicha i Walkera. Z powodu dużej toksyczności nie znalazły zastosowania w praktyce klinicznej, ale pełnią rolę sond DNA w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych, stabilizatorów hybrydyzacji DNA oraz wzorców i nośników grup czynnych. W kolejnej pracy z tego cyklu potwierdziliśmy skuteczność wiązania pochodnych distamycyny z wolnymi grupami aminowymi z DNA i ich interakcje z enzymami zaangażowanymi w procesy działania leków przeciwnowotworowych (*IIA18*). Pochodne distamycyny nie blokowały regionów DNA bogatych w GC, ale hamowały katalityczne działanie endonukleaz w miejscach restrykcyjnych AA, AT, TT i AG. Wszystkie związki wykazywały aktywność przeciwko topoizomerazie II w stężeniu 10 μM , lecz nie hamowały aktywności topoizomerazy I. Działały antyproliferacyjnie i cytotoksycznie w stężeniach od 81,70 μM do 200 μM . Testowane analogi distamycynowe z wolnymi grupami aminowymi mogą być stosowane jako nośniki grup aktywnych o różnorodnym zastosowaniu. Obiecujące wyniki uzyskano po przeprowadzeniu syntezy analogów aminowych pentamidyny z łańcuchem polimetylenowym i pochodnych chlorambucylu (*IIA8*, *IIIA28*). Związki wykazały działanie cytotoksyczne w odniesieniu do komórek ludzkiego raka piersi MCF-7, wiązały się z DNA i ingerowały *in vitro* w aktywność topoizomerazy I i II. Przeprowadzone badania ponownie dowiodły, iż zmiana budowy związków przyczynia się do zmian właściwości biologicznych, a co za tym idzie, do zmian ich funkcji. Fakt ten skłania do dalszych poszukiwań nowych analogów aminowych pentamidyny z łańcuchem

polimetylenowym i ich pochodnych chlorambucylu, które mogą mieć silniejsze działanie apoptotyczne i przeciwnowotworowe.

Kolejną grupą związków chemicznych, ocenionych pod względem aktywacji procesu apoptozy były dendrymery poliamidoaminowe 2 i 3 generacji, które mogą być stosowane jako nośniki leków i genów, czynniki kontrastujące lub wskaźniki jonów metali (*IIA5*, *IIIA27*). Wykazaliśmy, że dendrymery zakończone grupą aminową były bardziej cytotoksyczne wobec komórek raka piersi MCF-7 i MDA-MB-231 niż te zakończone grupą hydroksylową. Badaliśmy także cytotoksyczność chitozanu i jego polimeru (β -glicerofosforanu), które stosowane są jako składniki hydrożelów, wobec komórek błony śluzowej pochwy CRL 2616 (*A25*, *49*). Wykazaliśmy, że modyfikacja chitozanu β -GP poprawiła właściwości sprężyste i mechaniczne hydrożelów przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości mukoadhezyjnych polimerów. Stwierdziliśmy także, że sam chitozan wykazywał większą cytotoksyczność niż jego polimer β -GP, co wiązaliśmy ze sterycznym efektem dodatniego ładunku polimeru β -GP i mniejszej interakcji z błoną komórkową. W tym samym zespole badawczym oceniliśmy działanie leków alkilujących z grupy iperytów azotowych, które stosowane są w leczeniu niektórych chorób nowotworowych (*IID3*). Przeprowadzone badania wykazały, że amidynowy analog melfalanu (AB2) silniej indukował proces apoptozy komórek raka piersi MCF-7 i MDA-MB 231, w porównaniu ze związkiem macierzystym. Natomiast w komórkach fibroblastów ludzkiej skóry proces apoptozy był aktywniej indukowany przez melfalan. Silniejsza indukcja apoptozy przez amidynowy analog melfalanu (AB2) w badanych komórkach nowotworowych koreluje z uzyskanymi wynikami badań dotyczących wpływu analogu melfalanu (AB2) na ekspresję receptora IGF-I i MAP-kinaz ERK1 i ERK2.

W kolejnej pracy określono wpływ związków z rodziny witaminy A: retinolu, beta-karotenu, likopenu, kwasu all-trans-, 9-cis- i 13-cis-retinowego, na wzrost i proliferację endometriozy oraz proces apoptozy w linii komórkowej raka jajnika CRL-11731 oraz aktywność docetakselu i estradiolu w tej hodowli (*IIE1*). Dane literaturowe potwierdzają wpływ witaminy A na proliferację, różnicowanie się i apoptozę komórek prawidłowych i nowotworowych. Retinoidy również zmieniają działanie cytotoksyczne chemioterapeutyków, m.in. docetakselu w komórkach raka jajnika. Z tych względów mogą być potencjalnymi kandydatami do nowych strategii leczenia raka jajników. Badania oparto na teście inkorporacji [³H] tymidyny i aktywności proliferacyjnej komórek PCNA i Ki67-dodatnich, indeksie apoptozy i ocenie ekspresji antygenów Bcl-2 i p53 w komórkach CRL-11731. Wśród związków należących do rodziny witaminy A, wyłączając retinol,

zaobserwowaliśmy zahamowanie wzrostu komórek rakowych w sposób zależny od dawki. Działanie antyproliferacyjne samego likopenu i skojarzonego z docetakselem potwierdziliśmy w badaniu immunohistochemicznym, gdzie zaobserwowaliśmy zmniejszenie odsetka komórek pozytywnych dla PCNA i Ki67. Beta-karoten, likopen i kwas trans-retinowy w monoterapii oraz w skojarzeniu z docetakselem wywierały wpływ na ekspresję antygenu Bcl-2 i p53 w badanych komórkach. Wyniki naszych badań uzasadniły ważną rolę witaminy A w patofizjologii raka jajników.

Grupą leków, które mogą wpływać na zmiany ekspresji fosfotydyloseryny na powierzchni neuronów hipokampa są cynaryzyna i jej pochodna – flunaryzyna oraz nimodypina, stosowane w leczeniu wielu chorób neurologicznych (*IICI*). W hodowlach zawierających flunaryzynę, apoptoza indukowana glutaminianem została zahamowana w 62%, cynaryzyna pozostała bez wpływu na apoptozę neuronów, podczas gdy nimodypina nasiliła apoptotyczną ścieżkę śmierci komórkowej o 26%. Zastosowanie cynaryzyny lub nimodipiny chroniło neurony przed nekrozą indukowaną glutaminianem. Uzyskane wyniki sugerują korzystny potencjał antyapoptotyczny flunaryzyny i potencjał antynekrotyczny cynaryzyny. Nimodipina wykazuje niekorzystny efekt proapoptotyczny obserwowany w doświadczalnym modelu uszkodzenia neuronów.

Laboratoryjne markery aktywacji płytek krwi

Praktycznym wymiarem mojej działalności badawczej było określenie laboratoryjnych wskaźników aktywacji płytek krwi. Ponieważ aktywacja płytek krwi prowadzi do nadkrzepliwości i leży u podłoża wielu patologii, wykrycie jej ma istotne znaczenie kliniczne. Ocena adhezji, agregacji i wydzielania płytkowego, a także zmian ekspresji antygenów płytkowych należy do trudno dostępnych, kosztownych i metodycznie niewystandaryzowanych badań specjalistycznych. W naszej pracy wykorzystaliśmy rutynowe parametry morfologii płytek krwi: MPV, L-PLT, MPC, które skorelowaliśmy z cytometryczną oceną ekspresji płytkowych receptorów: CD41a, CD61, CD42b, CD62P u pacjentów z nadkrzepliwością w przebiegu choroby nowotworowej (*IIA7, IIIA25*). Średnia objętość płytek oraz bezwzględna liczba płytek „olbrzymich” dobrze korelowała z liczbą cząsteczek CD62P, potwierdzając przydatność rutynowych testów laboratoryjnych w ocenie stanu czynnościowego płytek krwi. Co więcej, zaobserwowaliśmy, że ocena tych parametrów u chorych z rakiem żołądka zakwalifikowanych do radykalnej operacji, może mieć istotne znaczenie w prognozowaniu powikłań zakrzepowych. W pracy poglądowej (*IID4*) zwróciliśmy uwagę na związek markerów aktywacji płytek ze stężeniem mieloperoksydazy,

enzymu sprzyjającego destabilizacji i pękaniu blaszki miażdżycowej, a także osłabiającego funkcje naczyniorozszerzające i przeciwzapalne. W kolejnej pracy opisaliśmy związek MPV ze stężeniem glukozy (*IIA21, IIIA50*). Wykazaliśmy, że po kilkugodzinnej ekspozycji na wysokie stężenia glukozy objętość płytek wyraźnie rośnie w skutek nasilonego procesu depolimeryzacji tubuliny. Zmiany te prowadzą do znacznie łatwiejszej aktywacji płytek w odpowiedzi na niskie stężenia fizjologicznych stymulatorów. Skutkuje to zaburzeniami hemostazy, często występującymi w przebiegu cukrzycy, gdzie obserwuje się nasilenie krzepnięcia i upośledzenie fibrynolizy. W warunkach hiperglikemii powstają skrzepy o znacznie bardziej rozbudowanej strukturze/elastyczności, które następnie ulegają znacznie wolniejszej retrakcji.

Handwritten signature of Małgorzata Rusak in black ink.