

Załącznik Nr 3

do wnioskuz dnia 13 grudnia 2020 roku
o przeprowadzenie postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Dr Agnieszka Śmieszek

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Biologii Eksperymentalnej

Wrocław 2020

Spis treści

1. Dane osobowe	2
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy	2
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	2
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2. Ustawy	3
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego	3
4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe	3
4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej	11
5.1. Praca we Wrocławskim Centrum Badań EIT+	11
5.2. Staż badawczy	12
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę	14
6.1. Osiągnięcia dydaktyczne	14
6.2. Osiągnięcia organizacyjne	17
6.3. Popularyzacja wiedzy	17
7. Omówienie pozostałych osiągnięć	18
7.1. Przed doktoratem – zapoznanie się z ideą medycyny regeneracyjnej i badań biomedycznych	18
7.2. Po doktoracie	20
7.2.1. Badania nad innowacyjnymi biomateriałami umożliwiające regenerację tkanek <i>in situ</i>	20
7.2.2. Mikroalgi i ich znaczenie w medycynie regeneracyjnej	22
7.2.3. Niekodujące RNA i ich rola w biologii komórek tkanki kostnej	22
8. Plany na przyszłość	23
9. Piśmiennictwo	25

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Agnieszka Śmieszek

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy

11.12.2012 – dyplom doktora nauk biologicznych; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polska Akademia Nauk we Wrocławiu;

Promotor: prof. dr hab. Jan Kuryszko; Promotor pomocniczy: dr Iwona Ewa Kochanowska

Tytuł rozprawy: *„Białka morfogenetyczne kości jako czynniki stabilizujące chondrocyty do przeszczepów autologicznych poprzez mechanizm autokrynej regulacji”*.

17.06. 2005 – dyplom magistra biologii; specjalność: Biologia stosowana; Akademia Rolnicza we Wrocławiu (obecnie: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, UPWr), Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt;

Promotor: dr Iwona Ewa Kochanowska

Tytuł pracy magisterskiej: *„Badanie aktywności komórek prekursorowych osteoklastów pochodzących z krwi obwodowej różnych gatunków zwierząt”*.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1.10.2006 – 30.09.2010; doktorant w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu;

1.10.2010 – 22.01.2011; specjalista (biolog) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu;

01.08.2012 – 15.01. 2013; pracownik naukowy w projekcie BioMed, prace zlecone realizacja zadania pt. „Ocena możliwości regeneracji uszkodzeń tkanki kostnej i nerwowej przy pomocy autologicznych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej i szpiku kostnego z zastosowaniem biomateriałów”;

1.10.2013 – 31.01.2017; asystent w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;

16.10.2013 – 31.01.2017; specjalista w Pracowni Mikroskopii Elektronowej, Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, UPWr;

16.01.2013 – 05.05.2013; specjalista ds. technicznych w zadaniu badawczym pt. „Bardzo małe komórki macierzyste przypominające komórki embrionalne VSELs jako wskaźnik potencjału regeneracyjnego organizmu”; Wrocławskie Centrum Badań EIT+ Sp. z o.o.;

06.05.2013 – 24.01.2015; specjalista ds. naukowych we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ Sp. z o.o.;

26.04.2017 – 17.07.2018; inżynier badań we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ Sp. z o.o.;

01.02.2017 – obecnie; adiunkt badawczo-dydaktyczny w Katedrze Biologii Eksperymentalnej, Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, UPWr.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2. Ustawy

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Badania nad metforminą jako czynnikiem modulującym aktywność proliferacyjną, żywotność i zdolność do różnicowania się komórek progenitorowych.

4.2. Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

W skład osiągnięcia naukowego wchodzi **sześć** oryginalnych publikacji naukowych (P1-P6) z listy JCR. W przedstawionych pracach jestem pierwszym autorem, a w pięciu z nich również autorem korespondencyjnym. Sumaryczny *Impact Factor* (IF) prac uwzględnionych w cyklu wynosi **20,388** a suma punktów MNiSW (zgodnie z wykazem MNiSW w roku publikacji) wynosi **260**.

- (P1) **Smieszek A***, Czyrek A, Basinska K, Trynda J, Skaradzinska A, Siudzinska A, Marędziak M, Marycz K: Effect of Metformin on Viability, Morphology, and Ultrastructure of Mouse Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Balb/3T3 Embryonic Fibroblast Cell Line. *BioMed Research International* **2015a** 04/2015; DOI:10.1155/2015/769402; (IF₂₀₁₅: **2,134**; IF_{5lat} = 2,149; MNiSW₂₀₁₅=20; MNiSW₂₀₁₉=70).
- (P2) **Smieszek A**, Basinska K, Chrzęstek K, Marycz K*: In Vitro and In Vivo Effects of Metformin on Osteopontin Expression in Mice Adipose-Derived Multipotent Stromal Cells and Adipose Tissue." *Journal of Diabetes Research* **2015b** 04/2015; DOI:10.1155/2015/814896; (IF₂₀₁₅= 2,431; IF_{5lat} = 2,149; MNiSW₂₀₁₅=25; MNiSW₂₀₁₉=70).
- (P3) **Smieszek A***, Strek Z, Kornicka K, Grzesiak J, Weiss C, Marycz K: Antioxidant and Anti-Senescence Effect of Metformin on Mouse Olfactory Ensheathing Cells (mOECs) May Be Associated with Increased Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels-An Ex Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*. **2017a**; 18(4). pii: E872. doi: 10.3390/ijms18040872;. (IF₂₀₁₇=3,687; IF_{5lat} =3,878; MNiSW₂₀₁₅ =30; MNiSW₂₀₁₉ =100).
- (P4) **Smieszek A***, Szydłarska J, Mucha A, Chrapiec M, Marycz K: Enhanced cytocompatibility and osteoinductive properties of sol gel-derived silica/zirconium dioxide coatings by metformin functionalization. *Journal of Biomaterials Applications* **2017b**; 32(5):570-586. doi: 10.1177/0885328217738006; (IF₂₀₁₇=2,082; IF_{5lat} =2,154; MNiSW₂₀₁₇=30; MNiSW₂₀₁₉ = 70).
- (P5) **Smieszek A***, Tomaszewski KA, Kornicka K, Marycz K: Metformin Promotes Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells and Exerts Pro-Osteogenic Effect Stimulating Bone Regeneration. *Journal of Clinical Medicine*. **2018**; 7(12). pii: E482. doi: 10.3390/jcm7120482; (IF₂₀₁₈= 5,688; MNiSW₂₀₁₈=15; MNiSW₂₀₁₉=140).
- (P6) **Smieszek A***, Kornicka K, Szłapka-Kosarzewska J, Androvic P, Valihrach L, Langerova L, Rohlova E, Kubista M, Marycz K: Metformin Increases Proliferative Activity and Viability of Multipotent Stromal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue Derived from Horses with Equine Metabolic Syndrome *Cells*. **2019**; 8(2). pii: E80. doi:10.3390/cells8020080; (IF₂₀₁₉=4,366; MNiSW₂₀₁₉ = 140).

Oznaczenia:

* autor korespondencyjny

4.3. Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Metformina (ang. metformin/MF) jest pochodną biguanidu, wobec której wykazano wysoką skuteczność i bezpieczeństwo w leczeniu cukrzycy typu II[1,2]. W ostatnich latach metformina zyskała również miano związku o działaniu plejotropowym. Szerokie spektrum działania metforminy związane jest nie tylko z obniżaniem poziomu cukru we krwi, ale również z zapobieganiem insulinooporności. Podawanie metforminy na wczesnym etapie rozwoju cukrzycy prowadzi do zmniejszenia ryzyka powikłań, które towarzyszą temu schorzeniu, m.in. osteoporozy[3,4]. Plejotropowy charakter działania metforminy dotyczy również obniżania ciśnienia tętniczego krwi oraz korzystnego wpływu na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych. Ma to też silny związek z funkcją metforminy jako czynnika poprawiającego profil lipidowy pacjentów z cukrzycą typu II. Wykazano, że metformina obniża stężenie lipoproteiny bardzo małej gęstości (ang. very low density lipoprotein/VLDL) we krwi, przy równoczesnym zwiększeniu stężenia frakcji lipoproteiny wysokiej gęstości (ang. high density lipoprotein/HDL) [5,6]. Dodatkowo wykazano, iż stosowanie metforminy u pacjentów z cukrzycą zmniejsza ryzyko wystąpienia chorób nowotworowych, w tym nowotworu piersi[7], trzustki[8], prostaty[9], czy kostniakomięsaka[10,11].

Metformina została po raz pierwszy zsyntezowana 100 lat temu, a jej znaczenie w terapii przeciwcukrzycowej potwierdził w roku 1957 francuski lekarz Jean Stern[1]. Jednak pomimo tego, że metformina jest znana i wykorzystywana od dziesiątek lat jako lek referencyjny w leczeniu cukrzycy, to jej wewnątrzkomórkowy mechanizm działania wciąż nie jest dokładnie scharakteryzowany. Wykazano, że metformina reguluje aktywność metaboliczną komórek wątroby, tkanki tłuszczowej i mięśni regulując szlak AMPK, czyli kinazy białkowej aktywowanej przez monofosforan adenozyliny (ang. adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase). Jest to podstawowy szlak związany z przemianami metabolicznymi i procesami energetycznymi organizmu[12,13]. Aktywacja tego szlaku sygnałowego, wyjaśnia plejotropowe działanie metforminy oraz jej rolę jako czynnika warunkującego proliferację i wzrost komórek.

W ostatnich latach rośnie również znaczenie metforminy w kontekście medycyny regeneracyjnej, szczególnie jako leku o działaniu zapobiegającym procesom starzenia się organizmu. Senolityczne działanie tego leku zostało potwierdzone na wielu modelach zwierzęcych, w tym *Caenorhabditis elegans*[14,15], myszach[16] oraz szczurach[17]. Ponadto, metformina zaliczana jest do grupy tzw. mimetyków restrykcji kalorycznej, czyli substancji, których efekty przypominają te obserwowane przy stosowaniu diety niskokalorycznej[18]. Z uwagi na to metforminę zaczęto postrzegać jako lek zmniejszający występowanie chorób związanych z podeszłym wiekiem.

Z pojęciem medycyny regeneracyjnej, związana jest również biologia komórek macierzystych, które z definicji wyróżnia zdolność do samoodnawiania populacji i plastyczność fenotypowa, determinująca ich hierarchię w kontekście potencjału do różnicowania się [19]. Ostatnie dwudziestolecie przyniosło istotny rozwój wiedzy na temat biologii tzw. dojrzałych komórek macierzystych, czyli multipotentnych komórek stromalnych (ang. *multipotent stromal cells*). Znaczenie terapeutyczne MSC ciągle rośnie, wykorzystywane są do leczenia przede wszystkim schorzeń aparatu ruchu, ale też w leczeniu chorób metabolicznych i kardiologicznych, w tym choroby niedokrwiennej serca i kardiomiopatii[20]. Połączenie pro-regeneracyjnych właściwości metforminy z potencjałem regeneracyjnym MSC mogłoby stanowić skuteczną strategię terapeutyczną, w leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych. Do roku 2014 wpływ metforminy na potencjał regeneracyjny komórek progenitorowych nie był szczegółowo poddawany analizie, a publikowane dane często ujawniały sprzeczne wyniki.

Nadrzędnym celem prac badawczych wchodzących w skład dorobku naukowego była ocena wpływu metforminy na parametry cytofizjologiczne komórek progenitorowych, jak również badania jej pro-regeneracyjnych właściwości i potencjalnego zastosowania jako czynnika wspierającego prawidłową przebudowę tkanek. W prowadzonych badaniach metformina została scharakteryzowana jako: (i) czynnik regulujący aktywność wydzielniczą komórek progenitorowych (badania *in vitro*) (ii) czynnik wspomagający procesy regeneracyjne organizmu (badania *in vivo*, *ex vivo*) oraz (iii) czynnik o działaniu pro-osteogennym, mogący znaleźć zastosowanie w medycynie, do funkcjonalizacji biomateriałów implantacyjnych.

W prowadzonych badaniach oceniono wpływ metforminy na żywotność, aktywność proliferacyjną i metaboliczną komórek progenitorowych, jak również ich zdolność do ukierunkowanego tkankowo różnicowania się. Ponadto, badania uwzględniały ocenę wpływu metforminy na morfologię i ultrastrukturę komórek progenitorowych – czyli parametry, które w kontekście badań związanych z oceną potencjalnej bioaktywności i/lub cytotoxyczności związków, są często pomijane. Modelem badawczym były multipotentne komórki stromalne (MSC), jak również komórki glejowe izolowane z opuszki węchowej (ang. *olfactory ensheathing cells/OECs*).

Multipotentne komórki stromalne, są określane potocznie dojrzałymi komórkami macierzystymi (ang. *adult stem cells*)[21]. Nomenklatura tych komórek zmieniała się wraz z postępem prac badawczych i wiedzy na temat ich cytofizjologii. Komórki te odkryte przez Friedensteina opisywane były jako jednostki formujące kolonie fibroblastopodobne (ang. *colony forming unit fibroblast/CFU-F*)[22]. Inne definicje tych komórek podkreślały ich pochodzenie, stąd określano je między innymi mianem szpikowych komórek stromalnych (ang. *bone marrow stromal cells/BMSC*)[23], bądź mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (ang. *mesenchymal stem cells*)[24]. Najdokładniejsza definicja zaproponowana przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowych odnosi się do plastyczności fenotypowej tych komórek – multipotencji[25].

Komórki te wywodzą się z różnych niszy tkankowych, jednak najczęściej identyfikowane są w tkankach o pochodzeniu mezenchymalnym[26]. MSC cechują się wysoką aktywnością proliferacyjną i zdolnością do różnicowania się w komórki ukierunkowane tkankowo, takie jak komórki tkanki kostnej, chrzęstnej czy tłuszczowej[20,25–27]. W przedstawionych pracach zbadano populacje MSC, które pochodziły z dwóch niszy tkankowych - szpiku kostnego (BMSC) oraz tkanki tłuszczowej (ASC). Źródłem MSC mogą być również inne tkanki, takie jak tkanka łączna galaretowata występująca w miazdze zębów[28] i sznurze pępowinowym (galareta Whartona)[29], czy błona maziowa[30]. Badane populacje MSC mają istotne znaczenie terapeutyczne, co wiąże się z ich aktywnością wydzielniczą m.in. z produkcją czynników wzrostu i cytokin, które warunkują również ich właściwości immunomodulujące[31].

Zgodnie z rekomendacjami Towarzystwa Terapii Komórkowych[25] wykorzystywane w naszych badaniach MSC były identyfikowane na podstawie ich specyficznego fenotypu. Wyizolowane MSC pochodziły z tkanek mysich [P1-P3], szczurzych [P5], ludzkich [P4] i końskich [P6]. W warunkach *in vitro* otrzymane MSC wykazywały zdolność adhezji do naczynia hodowlanego, fibroblastopodobny morfotyp i potencjał proliferacyjny. Specyficzny fenotyp komórek, związany z ekspresją markerów potwierdzających ich mezenchymalne pochodzenie m.in. CD73, CD90, CD105, identyfikowano w oparciu o techniki immunocytochemiczne i cytometryczne. Dodatkowo, badane populacje MSC nie wykazywały ekspresji markerów CD31, CD34 oraz CD45. Plastyczność fenotypowa MSC oceniana była na podstawie ich potencjału do różnicowania się w komórki kościotwórcze, tłuszczowe i chrzęstne. Efektywność różnicowania MSC w hodowlach osteogennych, chondrogennych i adipogennych była analizowana na podstawie specyficznego barwienia umożliwiającego detekcję głównych składników macierzy

Ag

zewnątrzkomórkowej. Mineralizację macierzy w hodowlach osteogennych identyfikowano na podstawie wyniku barwienia Alizarin Red, obecność proteoglikanów oceniano na podstawie barwienia macierzy z wykorzystaniem safraniny, natomiast wakuole lipidowe wykrywano z wykorzystaniem barwnika Oil-Red-O lub LipidTox.

W eksperymentach, których wyniki zaprezentowano w dwóch pierwszych publikacjach [Śmieszek i wsp., 2015a (P1); Śmieszek i wsp., 2015b (P2)] cyklu habilitacyjnego, modelem badawczym były mysie komórki progenitorowe izolowane ze szpiku kostnego (mBMSC) i tkanki tłuszczowej (mASC). Komórki te były izolowane z tkanek 4-tygodniowych myszy szczepu C57BL/6. W badaniach tych wykazano, że metformina w stężeniach 1 mM, 5 mM i 10 mM obniża aktywność proliferacyjną, metaboliczną i wydzielniczą zarówno mBMSC jak i mASC. Cytotoksyczność metforminy przejawiała się również zmianami w morfologii komórek i nietypowym charakterem wzrostu hodowli komórek progenitorowych. W hodowlach, w których stężenie metforminy wynosiło 5 mM i 10 mM komórki nie tworzyły charakterystycznych rozbudowanych kolonii. Efektem toksycznego działania metforminy było również ograniczenie połączeń międzykomórkowych i zmiany apoptotyczne, związane z fragmentacją jądra komórkowego i formowaniem się ciałek apoptotycznych, jak również zaburzeniami w morfologii mitochondriów (pęcznienie, obrzęk).

Badania *in vivo* z wykorzystaniem modelu myszy C57BL/6 wykazały, że metformina, może wpływać na budowę histologiczną podskórnej tkanki tłuszczowej, zwiększając jej heterogenność wyrażoną rozmiarem adipocytów. Zwierzęta w grupie eksperymentalnej (n=9) otrzymywały metforminę w dawce dziennej równiej 2,8 mg, przez osiem tygodni. W obrazach histologicznych tkanek zwierząt skarmianych metforminą zaobserwowaliśmy istotne zmniejszenie się średnicy adipocytów, jak również istotny spadek masy ciała. Analizy immunohistochemiczne wykazały, że metformina wpływa na obniżenie ekspresji markerów związanych z aktywnością proliferacyjną komórek. Adipocyty w tkance zwierząt przyjmujących metforminę, wykazywały obniżoną ekspresję markera Ki-67 oraz cząsteczki CD105. Metformina, nie tylko miała wpływ na ograniczoną zdolność komórek do podziału, ale również obniżała ich żywotność, co związane było ze wzrostem ekspresji kaspazy 3 w tkance tłuszczowej zwierząt eksperymentalnych. Badania prowadzone w modelu *in vivo* potwierdziły anty-proliferacyjne i pro-apoptotyczne działanie metforminy względem mBMSC i mASC.

Dodatковым celem badań opisanych w publikacji P2[32], było określenie wpływu metforminy na poziom ekspresji osteopontyny (ang. *osteopontin*/OPN). Jest to białko, którego aktywność wiązana jest głównie z metabolizmem i przebudową tkanki kostnej. Jednak rola osteopontyny nie ogranicza się tylko do regulacji aktywności komórek kościotwórczych. Wzrost ekspresji osteopontyny związany jest również ze zmianami metabolicznymi tkanki tłuszczowej, wynikającymi z nasilonych procesów zapalnych towarzyszących otyłości[33,34]. Nasze badania wykazały, że metformina reguluje ekspresję osteopontyny na poziomie lokalnym (w tkance tłuszczowej), jak również ogólnoustrojowym, obniżając jej stężenie we krwi.

Prowadzone badania [Śmieszek i wsp., 2015a (P1); Śmieszek i wsp., 2015b (P2)] potwierdziły doniesienia innych grup badawczych, wskazujące na to, że metformina działa na komórki progenitorowe w sposób zależny od dawki, a efekt ten może być dodatkowo modulowany czasem ekspozycji komórek na lek. Analiza ultrastruktury komórek przeprowadzona z wykorzystaniem mikroskopii skaningowej oraz transmisyjnej wykazała, że aktywność wydzielnicza mysich BMSC i ASC, wzrasta w hodowlach z metforminą w stężeniu 1 mM przez 24 godziny. W hodowlach tych komórki progenitorowe charakteryzowały się zwiększoną produkcją mikropęcherzyków błonowych. Otrzymany wynik, był przesłanką do dalszych badań, w których testowałam metforminę w stężeniach nieprzekraczających 1 mM.

Pierwszymi opisanymi komórkami o cechach multipotentnych komórek stromalnych były komórki wywodzące się ze szpiku kostnego. Wczesne odkrycie wyjątkowych właściwości BMSC, spowodowało, że badania związane z biologią tych komórek, jak również ich potencjałem regeneracyjnym stały się wiodącym tematem nad ich wykorzystaniem w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej[23,35]. Inwazyjna metoda pobierania szpiku kostnego, jak również stosunkowo niska efektywność izolacji komórek (BMSC stanowią 0,001–0,01% komórek jądrzastych szpiku kostnego), spowodowała, że zaczęto poszukiwać innych niszy tkankowych MSC[36].

Z kolei multipotentne komórki stromalne izolowane z tkanki tłuszczowej, fenotypowo zbliżone do BMSC wykazują wysoką aktywność proliferacyjną w warunkach *in vitro*[37]. Potencjał regeneracyjny przeszczepów opartych o wykorzystanie MSC, w dużej mierze zależy od potencjału proliferacyjnego komórek i ich aktywności wydzielniczej, związanej z produkcją czynników o działaniu pro-regeneracyjnym i immunomodulującym[20,26]. Ponadto, wysoka dostępność tkanki tłuszczowej, będącej źródłem ASC, wpływa na to, iż obecnie komórki te postrzegane są jako doskonałe narzędzie terapeutyczne. Z zastosowaniem przeszczepów przygotowanych na bazie ASC leczonych jest wiele schorzeń, jak chociażby osteoartroza[38], czy retinopatia cukrzycowa[39]. Przeszczepy ASC podawane są pacjentom zarówno w formie przeszczepów autologicznych, jak również allogenicznych, czemu sprzyja właśnie ich immunomodulujący charakter. Jak wykazały badania naszego zespołu plastyczność fenotypowa ASC odzwierciedlona ich różnicowaniem się w komórki kościotwórcze, obniża się wraz z wiekiem dawcy. Co więcej, proces komórkowego starzenia się ASC związany jest ze wzrostem ekspresji b-galaktozydazy (ang. *senescence associated β -galactosidase/SA- β -Gal*), akumulacją reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species/ROS*) i zwiększonym potencjałem adipogennym[27].

Dlatego, też kolejnym problemem badawczym, którego rozwiązania się podjęto, była ocena wpływu metforminy na metabolizm ASC i ich zdolność do różnicowania się w komórki kościotwórcze. Celem badań [Śmieszek i wsp., 2018; (P5)] było określenie, czy metformina może regulować plastyczność fenotypową ASC w hodowlach przygotowawczych, co mogłoby mieć znaczenie dla zwiększenia powodzenia terapii komórkowych z wykorzystaniem tej populacji komórek. Osteogenny potencjał metforminy oceniany był z wykorzystaniem szczurzych komórek ASC (rASC), jak również modelu krytycznego ubytku kości czaszki przeprowadzonym na szczurach Wistar.

Istotnym aspektem badań prowadzonych w modelu *in vitro* było określenie stężenia metforminy promującego różnicowanie się hodowli rASC i formowanie funkcjonalnej macierzy kostnej. Metformina testowana była w stężeniach 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M oraz 1000 μ M, a jej wpływ oceniany był we wczesnej i późnej fazie osteogenezy. Najkorzystniejszy wpływ metforminy na metabolizm rASC wykazałam w hodowlach ASC poddawanych działaniu leku w stężeniu równym 500 μ M. Osteogenne działanie metforminy, związane było z istotnym zwiększeniem aktywności alkalicznej fosfatazy (ang. *alkaline phosphatase/ALP*) we wczesnej fazie osteogenezy, jak również produkcją białek późnej osteogenezy, w tym białka morfogenetycznego izoformy 2 (ang. *bone morphogenetic protein isoform 2/BMP-2*) i osteokalcyny (ang. *osteocalcin/OCL*). Ponadto, analiza składu macierzy zewnątrzkomórkowej w hodowli prowadzonej z 500 μ M dodatkiem metforminy wykazała jej istotną mineralizację, obecność złogów wapnia i fosforu typowych dla tkanki kostnej (Alizarin Red oraz SEM-EDX). Analizy morfometryczne wykazały, że obszary mineralizacji macierzy (nodule kostne) są bardziej rozbudowane, jak również liczniejsze w hodowlach ASC z 500 μ M dodatkiem metforminy, niż w pozostałych analizowanych warunkach hodowlanych. Wyniki badań prowadzonych w modelu *in vitro* umożliwiły wybranie dawki leku do dalszych badań z zastosowaniem modelu *in vivo*.

AS

Dodatkowo potwierdziliśmy, że metformina może regulować metabolizm komórek progenitorowych - rASC powodując fosforylację AMPK.

Przygotowując się do badań z zastosowaniem modelu *in vivo*, na podstawie danych literaturowych obliczono, iż aby uzyskać 500 μM stężenie metforminy w surowicy krwi zwierząt, powinny one przyjmować lek w dawce dziennej równej 250 mg/kg masy. Ponadto, do badań wytypowano grupę zwierząt przyjmującą metforminę w dawce dziennej równej 100 mg/kg masy ciała – wybór tego modelu badawczego, został podyktowany koniecznością weryfikacji wcześniejszych danych literaturowych. Otrzymane przeze mnie wyniki wykazały, że suplementacja szczurów metforminą w dawce 250 mg/kg masy ciała na dzień wpływa pozytywnie na potencjał regeneracyjny uszkodzonej tkanki kostnej. Badania histochemiczne wykazały, że w miejscach ubytków kości odnotowano formowanie się tkanki o charakterze kości gąbczastej. Dodatkowo wyniki mikrotomografii komputerowej uwidocznily wzrost gęstości nowopowstałej kości w ubytkach szczurów przyjmujących metforminę. Odnotowano również osteoprotekcyjne działanie metforminy, które może być związane z zahamowaniem aktywności resorpcyjnej komórek kościogubnych - osteoklastów. Dowodem na to są wyniki specyficznego barwienia wykrywającego marker aktywnych osteoklastów, tj. winianooporna kwaśna fosfataza (*ang.* tartrate-resistant acid phosphatase/TRAP). W miejscu ubytku kostnego, w grupie szczurów przyjmujących metforminę w dawce 250 mg/kg masy ciała, liczba komórek TRAP-dodatnich, uległa istotnemu obniżeniu. Wyniki badań *in vivo* wskazują, iż zastosowanie terapii farmakologicznej metforminą może wzmacniać osteogenną aktywność endogennych komórek progenitorowych, warunkować właściwą przebudowę tkanki kostnej, tym samym może stać się wartościowym uzupełnieniem (leczenie pomocnicze) w terapiach komórkowych opartych o transplantację MSC.

Z uwagi na potencjalne osteogenne właściwości metforminy, lek ten wykorzystałam również jako czynnik umożliwiający funkcjonalizację zol-żelowych powłok tlenkowych (cyrkonioowo-krzemionkowych), którymi pokryto biomateriały wykonane ze stali austenitycznej (SS316L). Bioaktywność powłok zol-żelowych zostały zbadane przez naszą grupę wcześniej, wskazując na ich potencjalne zastosowanie jako matryc promujących wzrost komórek progenitorowych na podłożach metalicznych czy pełniących funkcje nośników leków i/lub czynników chemotaktycznych[40–42]. W pracy opublikowanej w *Journal of Biomaterials Applications* [Śmieszek i wsp., 2017b (P4)] przeprowadzono szczegółową analizę właściwości fizykochemicznych biomateriałów funkcjonalizowanych metforminą. Badania te uwzględniały ocenę morfologii, topografii, zwilżalności oraz składu chemicznego powłok, jak również uwalniania się metforminy. Cytokompatybilność otrzymanych powłok badałam z wykorzystaniem ludzkich multipotentnych komórek stromalnych izolowanych z tkanki tłuszczowej (hASC). Przeprowadzone analizy wykazały, że obecność metforminy w powłokach biomateriału sprzyjała adhezji, proliferacji komórek, warunkując ich prawidłowy wzrost i morfologię. W warunkach osteogennych komórki hodowane na powierzchni sfunkcjonalizowanego biomateriału ulegały zróżnicowaniu tworząc zmineralizowaną macierz bogatą w hydroksyapatyt. Osteogenny potencjał hASC modulowany obecnością metforminy uwolnionej z powłok zol-żelowych, wyrażał się również wzrostem aktywności transkrypcyjnej i wydzielniczej. Wzrost ekspresji markerów osteogenezy tj. ALP, BMP-2 i OPN odnotowano zarówno na poziomie mRNA jak i białka wydzielonego przez komórki do pożywki hodowlanej.

Rolę metforminy jako czynnika warunkującego proliferację i żywotność komórek oceniono również z wykorzystaniem modelu multipotentnych komórek stromalnych izolowanych z tkanki tłuszczowej koni z syndromem metabolicznym (EqASC_{EMS}) (Śmieszek i wsp., 2019 (P6)). Komórki te charakteryzują się obniżonym potencjałem regeneracyjnym, co wynika z zaburzeń

metabolizmu mitochondrialnego, powiązane ze stresem siateczki śródplazmatycznej i akumulacją reaktywnych form tlenu (ROS)[43]. Zaburzenia metabolizmu komórek progenitorowych, analiza mechanizmów regulacji podstawowych szlaków zaangażowanych w utrzymanie prawidłowej aktywności komórek, jak również homeostazy ich niszy tkankowej, to tematy, które szczególnie mnie interesują, gdyż dostarczają kluczowej wiedzy o znaczeniu podstawowym oraz klinicznym.

Ocena wpływu metforminy na aktywność cytofizjologiczną EqASC_{EMS} uwzględniała analizę ich statusu proliferacyjnego wyrażonego czasem podwojenia populacji (ang. *population doubling time/PDT*), jak również rozkładem komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Oceniono również wpływ metforminy na żywotność EqASC_{EMS}, potencjał ich błony mitochondrialnej, akumulację markerów stresu oksydacyjnego i aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase/SOD*). Badania te miały również na celu identyfikację potencjalnego mechanizmu działania metforminy względem EqASC_{EMS}, dlatego analizie poddano profil ekspresji wybranych komponentów szlaku sygnałowego Wnt-3a. Uzupełnieniem analiz była ocena ekspresji markerów związanych z programowaną śmiercią komórki, co analizowano zarówno na poziomie mRNA, jak i małych, niekodujących RNA (mikroRNA/miRNA). Badania ekspresji miRNA przeprowadzono techniką Two-tailed RT-qPCR w Laboratorium Ekspresji Genów, znajdującym się w Centrum Biotechnologii i Biomedycyny Akademii Nauk Uniwersytetu Karola w Vestec (BIOCEV) w Czechach we współpracy z Zespołem Profesora Kubisty.

Wyniki eksperymentów, dowiodły, że metformina w stężeniu równym 500 μ M istotnie podwyższa aktywność proliferacyjną końskich komórek progenitorowych, skracając czas hodowli potrzebny do podwojenia populacji komórek, jak również promując przejście komórek z fazy G0/G1 cyklu komórkowego do fazy S. Dodatkowo w hodowlach EqASC_{EMS} poddawanych działaniu metforminy odnotowano wzrost metabolizmu mitochondrialnego i ilości mitochondriów, jak również istotny spadek markerów stresu oksydacyjnego tj. ROS i tlenku azotu (NO), co korelowało ze wzrostem aktywności SOD.

Analiza profilu apoptozy wykazała, że metformina w hodowlach EqASC_{EMS} przyczynia się do wzrostu żywotności komórek, obniżając odsetek komórek wczesno- i późno-apoptotycznych. Anty-apoptotyczne działanie metforminy względem EqASC_{EMS} korespondowało z obniżonym współczynnikiem *BAX/BCL-2* i spadkiem poziomów pro-apoptotycznych miRNA tj. miR-16-5p, miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-140-3p oraz miR-145-5p. Dodatkowo wykazałam, że metformina w komórkach EqASC reguluje aktywność szlaku Wnt/ β -katenina, istotnego w kontekście aktywności proliferacyjnej, regulacji cyklu komórkowego i zdolności różnicowania się komórek progenitorowych, m.in. w komórki kościotwórcze.

Kolejnym aspektem znaczenia metforminy jako czynnika warunkującego aktywność komórek progenitorowych, były badania przeprowadzone z wykorzystaniem modelu *ex vivo*, których celem było określenie przeciwutleniających i przeciwstarzeniowych właściwości metforminy względem mysich glejowych komórek progenitorowych izolowanych z opuszki węchowej (ang. *mice olfactory ensheathing cells/mOECs*) [Śmieszek i wsp., 2017a (P3)]. Komórki te izolowane były z tkanek myszy skarmianych metforminą wg. wcześniej ustalonego protokołu tj. w dawce 2,8 mg /dzień.

Komórki mOECs izolowane od zwierząt skarmianych metforminą w hodowlach *in vitro* wyróżniały się obniżoną aktywnością proliferacyjną, wyrażoną dłuższym czasem potrzebnym do podwojenia populacji (współczynnik PDT), spadkiem ilości komórek aktywnie syntezujących DNA, jak również obniżonym potencjałem klonogennym. Jednocześnie komórki te charakteryzował pożądaną fenotyp komórkowy, tj. wzrost ekspresji receptora neurotrofin p75 (ang. *p75 neurotrophin receptor/ p75^{NTR}*), spadek odsetka komórek wykazujących aktywność



kaspazy 3 i obniżona aktywność SA- β -Gal. Ponadto profil ekspresji genów pro-apoptotycznych *BAX* i *BAD* oraz anty-apoptotycznego *BCL-2*, jak również charakter wzrostu hodowli mOECs promujący oddziaływania międzykomórkowe wskazuje, że metformina poprawiła żywotność komórek. Ocena sieci mitochondrialnej połączona z analizą akumulacji markerów stresu oksydacyjnego wykazała, że metformina usprawnia metabolizm mOECs. co związane było ze wzrostem potencjału błony mitochondrialnej, poprawą statusu antyoksydacyjnego komórek i aktywności wydzielniczej, przejawiającej się zwiększoną produkcją neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor/BDNF*). Wzrost BDNF odnotowałam również w surowicy krwi zwierząt.

Podsumowując rezultaty badań przedstawionych w ramach cyklu habilitacyjnego stanowią znaczący wkład do aktualnych zagadnień związanych z rolą metforminy jako czynnika o potencjalnym znaczeniu w medycynie regeneracyjnej. W przedstawionym cyklu pracach habilitacyjnych, wykazano, że działanie metforminy jest ukierunkowane na wiele szlaków komórkowych, ściśle związanych z procesami regeneracyjnymi - warunkującymi przeżycie komórek progenitorowych, proliferację, obronę przed stresem oksydacyjnym i różnicowanie się.

Szczególnie interesujący i nowatorski charakter badań odnosi się do funkcji metforminy jako czynnika:

- regulującego potencjał proliferacyjny i aktywność metaboliczną multipotentnych komórek stromalnych;
- promującego proces kościotworzenia komórek progenitorowych - *in vitro* oraz *in vivo*;
- wpływającego na przebudowę tkanki tłuszczowej i tkanki kostnej;
- odwracającego efekty stresu oksydacyjnego komórek progenitorowych;
- o działaniu senolitycznym względem komórek progenitorowych;
- mogącego znaleźć zastosowanie jako element triady inżynierii tkankowej, zarówno pod postacią leku sprzyjającego mobilizacji i ukierunkowanemu różnicowaniu się komórek progenitorowych, jak również funkcjonalnego składnika biomateriałów implantacyjnych.

Część badań przedstawionych w cyklu habilitacyjnym (P4 oraz P5) była realizowana w ramach projektu pt. „Wpływ metforminy na odbudowę tkanki kostnej – implikacje dla medycyny regeneracyjnej”, finansowanego ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii (Załącznik 4; II.7.2.1).

Dodatkowo, potencjał senolityczny metforminy był też tematem badań prowadzonych we Wrocławskim Centrum Badań EIT+. Wyniki tych prac zostały przedstawione w formie zgłoszenia patentowego pt. „Preparat do mobilizacji małych komórek pluripotentnych (VSEL) oraz komórek macierzystych progenitorowych (HSPC) CD34+ ze szpiku kostnego do krwi obwodowej i zastosowanie metforminy (N, N-dimetylobiguanidu)” - PCT/IB2015/057834 (Załącznik 4; III.3.2.2).

Ponadto, bioaktywność metforminy w kompleksie z metyl- β -cyklodekstryną była badana przeze mnie z wykorzystaniem modelu komórek progenitorowych izolowanych z jaj pszczoł, w ramach współpracy z firmą Bioscentia. Projekt finansowany był przez Polską Agencję Rozwoju Przedsiębiorczości (PARP), a jego wynikiem jest zgłoszenie patentowe przygotowywane przez firmę Bioscentia (Załącznik 4; II.7.2.2).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

5.1. Praca we Wrocławskim Centrum Badań EIT+

W latach 2012-2015 oraz 2017-2018 byłam zatrudniona we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ (szczegółowy wykaz zatrudnienia został wskazany w punkcie nr 3 tego załącznika). W pierwszym okresie zatrudnienia realizowałam badania prowadzone w ramach dwóch zadań projektu BioMed, których kierownikiem był Profesor Krzysztof Marycz.

Badania prowadzone we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ były ściśle związane z poszukiwaniem nowych rozwiązań terapeutycznych dla medycyny regeneracyjnej, szczególnie w zakresie wspomagania procesów naprawy i gojenia się uszkodzeń tkanki kostnej. Głównym celem prowadzonych badań było opracowanie biomateriałów metalicznych, funkcjonalizowanych tlenkowymi powłokami zol-żelowymi, usprawniających proces regeneracji trudno gojących się ubytków tkanki kostnej i nerwowej poprzez promowanie wzrostu, jak również ukierunkowanego tkankowo różnicowania się komórek progenitorowych. W projekcie byłam odpowiedzialna za projektowanie i wykonanie eksperymentów, mających na celu ocenę cytokompatybilności otrzymanych biomateriałów i charakterystykę ich właściwości biologicznych. Badania prowadzone były z wykorzystaniem dwóch populacji komórek progenitorowych, zarówno ASC jak i BMSC, co pozwoliło określić potencjalne różnice w odpowiedzi komórkowej na testowane powłoki, tym samym lepiej scharakteryzować ich właściwości biologiczne. Dodatkowo do moich zadań w projekcie należała realizacja zamówień odczynników i materiałów niezbędnych do przeprowadzania badań, raportowanie, pisanie publikacji i rozliczanie projektu.

Wynikiem badań było stworzenie bazy danych zawierającej szczegółową charakterystykę właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych biomateriałów i bioaktywnych powłok. Baza ta pozwoliła wyróżnić grupy materiałów do zastosowania w różnych gałęziach medycyny regeneracyjnej, szczególnie w ortopedii i stomatologii. Rezultatem projektu było również przedstawienie wyników w formie publikacji i prezentacji na konferencjach [40,41,44–48]. Uczestniczyłam również w badaniach okołokomercyjnych dot. „Wytworzenia biodegradowalnego, bioaktywnego, dwufazowego rusztowania o funkcji chemotaktycznej do regeneracji chrzęstno-kostnej” (wyniki przedstawione w punkcie 7.2). W ramach drugiego zadania projektu BioMed, badano wykorzystanie małych embrionalnopodobnych komórek macierzystych (ang. *very small embryonic-like stem cells/VSEL*) jako wskaźnika potencjału regeneracyjnego organizmu. Komórki VSEL wyróżnia wysoka plastyczność fenotypowa, warunkowana ekspresją markerów pluripotencji w tym OCT-4 (ang. *octamer-binding transcription factor 4*), SOX-2 (ang. *sex determining region Y-box 2*), NANOG. Badania prowadzone w ramach tego zadania pozwoliły zidentyfikować czynniki wpływające na mobilizację komórek VSEL do krwioobiegu. Wykazaliśmy między innymi, że długotrwały wysiłek fizyczny skutkuje zwiększonym krążeniem komórek VSEL we krwi obwodowej, jak również promuje różnicowanie się komórek progenitorowych szpiku w komórki kościotwórcze [49,50]. Potencjał osteogeny komórek macierzystych mobilizowanych wysiłkiem związany był ze wzrostem ekspresji i produkcji alkalicznej fosfatazy, osteokalcyny (OCL), jak również osteopontyny (OPN). Co więcej, zaobserwowaliśmy również zmiany w obrębie komórek szpiku kostnego, dotyczące zmniejszonego udziału komórek tłuszczowych (adipocyty).

Wynikiem projektu było również przygotowanie zgłoszenia patentowego, w którym udokumentowaliśmy znaczenie metforminy jako czynnika wpływającego na mobilizację komórek VSEL oraz hematopoetycznych komórek macierzystych. Wykazaliśmy, że senolityczny mechanizm

działania metforminy może być związany ze stabilizacją pluripotentego fenotypu komórek VSEL, przejawiającego się wzrostem ekspresji markerów OCT-4, SOX-2 ORAZ NANOG. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że zwierzęta skarmiane metforminą wykazują obniżone stężenie insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I (IGF-1) w surowicy[51] (Załącznik 4, III. 3.2.2).

W latach 2017-2018 zostałam zatrudniona we Wrocławskim Centrum Badań EIT+ na stanowisku Inżyniera badań. Do moich obowiązków należała obsługa bieżących zleceń, dbanie o terminowość ich realizacji i zachowanie ciągłości prac badawczych prowadzonych w laboratorium hodowli komórkowych, które działało w ramach Laboratorium Mikroskopii Elektronowej BIO. Realizowane zadania badawcze dotyczyły przede wszystkim badań, których celem była analiza cytotoksyczności substancji biologicznych/chemicznych oraz biomateriałów, w oparciu o wykorzystanie technik hodowli komórkowej, mikroskopii świetlnej i skaningowej, jak również biologii molekularnej.

5.2. Staż badawczy

W roku 2017 zainicjowałam współpracę z grupą kierowaną przez Profesora Mikaela Kubistę. Umożliwiło mi to realizację piętnastotygodniowego stażu badawczego w Laboratorium Ekspresji Genów znajdującym się w Centrum Biotechnologii i Biomedycyny Akademii Nauk Uniwersytetu Karola w Vestec (BIOCEV) w Czechach. Kierownikiem tego Laboratorium jest właśnie Profesor Mikael Kubista, a opiekunem mojego stażu był dr Lukas Valihrach.

Profesor Mikael Kubista (h-index=50) jest cenionym naukowcem, uważanym za pioniera w zakresie analizy ekspresji mRNA i miRNA z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym (inaczej ilościowego PCR/qPCR). Jest współautorem tzw. MIQE, czyli międzynarodowych standardów/wytycznych dotyczących publikowania danych uzyskanych metodą qPCR (publikacja cytowana min. 25 razy w tygodniu)[52]. Profesor Kubista jest naukowcem, który jest szczególnie zaangażowany w rozwój technologii qPCR. Jest odpowiedzialny za opracowywanie i kreowanie innowacyjnych aplikacji qPCR, w tym służących ocenie ekspresji miRNA. Zespół kierowany przez Profesora Kubistę zajmuje się analizą transkryptomu, w tym rzadkich transkryptów i oceny ekspresji genów na poziomie pojedynczej komórki. Z uwagi na charakter prac badawczych realizowanych przeze mnie w ramach grantów i grupy Reg-Med-Lab, moim zadaniem podczas stażu było opanowanie metod i protokołów umożliwiających specyficzną detekcję miRNA. Ponadto, Zespół Profesora Kubisty specjalizuje się w analizie transkryptomu technologią RNA-Seq (sekwencjonowania nowej generacji/NGS). Jest to technika, którą planujemy w najbliższym czasie wykorzystywać w naszych badaniach. Staż ten był dla mnie cennym doświadczeniem związanym również z możliwością zapoznania się z podstawami metod opartych o sekwencjonowanie nowej generacji, praktycznymi aspektami przygotowywania bibliotek do analiz NGS. Z uwagi na ogromne doświadczenie zespołu Profesora Kubisty w optymalizacji protokołów stosowanych do oceny transkryptomu (RT-qPCR i NGS), wsparcie tego zespołu ma dla mnie duże znaczenie, szczególnie w kontekście umiejętnej analizy danych i wiarygodności otrzymywanych wyników.

W związku z kierowaniem projektem PARP nr POIR.02.03.02-30-0050/17 oraz pełnieniem funkcji głównego wykonawcy w projektach NCN OPUS 10 oraz Harmonia 9 (Projekty wykazane w Załączniku 4; II.7.2) staż był realizowany w etapach.

Najważniejszym celem stażu było opanowanie metody Two-tailed RT-qPCR opracowanej przez zespół Profesora Kubisty do ilościowej oceny ekspresji miRNA[53,54]. Pracując w ramach stażu, otrzymałam wsparcie techniczne i merytoryczne, które umożliwiło opracowanie testów pozwalających na specyficzną detekcję miRNA w końskich komórkach progenitorowych. W trakcie stażu zrealizowałam trzy tematy projektowe. Pierwszy projekt polegał na określeniu profilu ekspresji cząsteczek miRNA-16-5p, miR-21-5p; mir-29a-3p; mir-140-3p oraz 145-5p w



komórkach progenitorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej koni zdrowych oraz koni z syndromem metabolicznym. Opracowany protokół to wysoce czuły test pozwalający określić minimalne różnice w profilu wybranych cząsteczek miRNA. Optymalizacja protokołu polegała na przeprowadzeniu licznych eksperymentów z zastosowaniem techniki RT-qPCR, w tym reakcji z sondami kontrolnymi (ang. *spikes*), co pozwoliło określić specyficzność i wydajność analizy, tym samym rzetelnie określić poziom badanych cząsteczek.

Kolejny temat badawczy realizowany w ramach stażu dotyczył oceny efektywności zahamowania ekspresji cząsteczki miR-21-5p (miR-21) w komórkach progenitorowych osteoblastów tj. linii MC3T3-E1. Był to kluczowy etap badań realizowanych w ramach projektu Harmonia 9, kierowanego przez Profesora Marycza (Załącznik 4, II. 7.2.10). Badania te pozwoliły scharakteryzować poziomy miRNA w komórkach MC3T3-E1, tym samym uzyskać wiarygodny model badawczy do testowania biomateriałów opracowywanych w ramach projektu Harmonia 9. Badania prowadzone w ramach stażu badawczego przyczyniły się do opracowania metody efektywnego wyciszenia ekspresji miR-21 w komórkach linii MC3T3-E1, co pozwoliło otrzymać model charakteryzujący się obniżonym potencjałem osteogennym, koniecznym w aspekcie testowania biomateriałów do regeneracji kości osteoporotycznej. Wyniki tych badań zostały uwzględnione w publikacji pt. „*The role of miR-21 in osteoblasts–osteoclasts coupling in vitro*”[55], a model badawczy wykorzystaliśmy również do testowania nanometrycznych powłok tlenkowych uzyskanych techniką osadzania warstw atomowych ALD (ang. *atomic layer deposition*)[56].

Kolejnym projektem, który zrealizowałam we współpracy z Laboratorium Ekspresji Genów była analiza cząsteczek miRNA zawartych w zewnątrzkomórkowych mikropęcherzykach błonowych pozyskanych z nasienia ogierów. Do oceny poziomu ekspresji miRNA wykorzystano również technologię *Two-tailed RT-qPCR*. Badania miały charakter analizy wysokoprzepustowej. Określałam poziom ekspresji dwudziestu cząsteczek miRNA, w tym molekuł z rodziny let-7 (let-7a, -7b, -7c), miR-16-5p, miR-20a-5p, miR-21a-5p, miR-23a-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-122, miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-133b, miR-140-3p, miR-145, miR-155, miR-181a-5p, miR-320-3p, miR-486-5, miR-497a-5p. Dodatkowo analiza uwzględniała ocenę wpływu transferu mikropęcherzyków błonowych na poziom ekspresji wybranych miRNA w multipotentnych komórkach stromalnych izolowanych z endometrium klaczy. Wyniki analiz zostały przygotowane do zaprezentowania w formie wykładu pt. „*Obesity-induced changes in metabolism of equine endometrial multipotent stromal cells are ameliorated by seminal extracellular vesicles*” podczas konferencji „*Precision Diagnostics Europe*”, która miała się odbyć w Pradze w maju 2020 roku. Jednak z uwagi na sytuację epidemiczną konferencja została przełożona na rok 2021. Wyniki dotyczące profilu ekspresji miRNA w mikrofragmentach błonowych izolowanych z nasienia, jak również ich modulującej roli względem komórek endometrium będą również stanowiły część publikacji przygotowywanej do recenzji (praca nad wersją roboczą artykułu).

Bardzo ważnym aspektem stażu było również zapoznanie się z metodami analizy bardzo rzadkich transkryptów, jak również optymalizacja protokołów wymagających tzw. preamplifikacji. Protokoły te wykorzystałam podczas określania ekspresji genów pluripotencji, takich jak *OCT-4A*, *OCT-4B*, *NANOG*, *SOX-2* w komórkach progenitorowych pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) w ramach badań prowadzonych w projektach finansowanych przez Polską Agencję Rozwoju Przedsiębiorczości (Załącznik 4; II.7.2.2 oraz II.7.2.8). Podczas stażu zapoznałam się również z protokołami umożliwiającymi przygotowanie bibliotek do analiz NGS, czy metodami oceny ekspresji genów na poziomie pojedynczej komórki z wykorzystaniem platformy BIOMARK (Fluidigm).

AS

Podczas stażu uczestniczyłam w szkoleniach prowadzonych przez specjalistów z TATAA Biocenter. Szkolenia te dotyczyły metod analizy ekspresji genów opartych o technikę PCR w czasie rzeczywistym i uwzględniały omówienie metod przygotowywania materiału badawczego, panelu kontrolnego (*ang.* quality controls/QC), analiz niekodujących RNA i technologii wykorzystywanych do oceny transkryptomu na poziomie pojedynczej komórki. Szczegółowa tematyka szkoleń została przedstawiona w Załączniku nr 4 (II.9.2.2.1).

Współpraca z zespołem kierowanym przez Profesora Kubistę jest przeze mnie kontynuowana, a dalsze plany naukowe obejmują realizację badań opartych o analizę transkryptomu z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (RNA-Seq). Wspólnie z zespołem Profesora Kubisty, planujemy przygotować wniosek grantowy w konkursie OPUS LAP.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Prowadzone kursy

Jestem autorką i współautorką opracowań kursów realizowanych dla studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Przygotowałam i prowadziłam następujące kursy:

Histologia dla studentów kierunku Biologia - studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2013/2014. Przedmiot realizowany jest przeze mnie w formie ćwiczeń audytoryjnych i praktycznych (2013/2014-2015/2016), dodatkowo od roku akademickiego 2017/2018 realizuję przedmiot również w formie wykładów. Jestem współautorką sylabusu do tego przedmiotu.

Biologia rozwoju zwierząt/Embriologia dla studentów Biologii - studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot był prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2013/2014 do 2018/2019. Przedmiot realizowałam w formie ćwiczeń audytoryjnych i praktycznych (2013/2014-2015/2016). Od roku 2016/2017 – 2018/2019 przedmiot był realizowany przeze mnie również w formie wykładów. Jestem współautorką sylabusu do tego przedmiotu. Kurs ten był również realizowany przeze mnie w języku angielskim dla studentów z wymiany studenckiej realizowanej w ramach programu ERASMUS+.

Biologia komórki i histologia I oraz II dla studentów kierunku Biologii człowieka - studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2015/2019 do chwili obecnej. Przedmiot realizuję w formie ćwiczeń audytoryjnych i praktycznych oraz w formie wykładów. Jestem autorką aktualnie obowiązującego sylabusu do tego przedmiotu.

Molekularna struktura komórki eukariotycznej dla studentów kierunku Biologia człowieka – studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot fakultatywny, który jest prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2016/2017. Przedmiot ten jest realizowany przeze mnie w formie ćwiczeń audytoryjnych i praktycznych, jak również wykładów. Jestem autorką aktualnie obowiązującego sylabusu do tego przedmiotu. W roku akademickim 2017/18 przedmiot ten był również realizowany w języku angielskim dla studentów Biologii (English Division).

Ekspresja mRNA i mikroRNA oraz ich wzajemne interakcje dla studentów II stopnia Bioinformatyki oraz studentów II stopnia Biologii - specjalność Techniki laboratoryjne. Przedmiot fakultatywny prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2018/19. Przedmiot realizuję we współpracy z innym adiunktem. Realizuję zarówno część ćwiczeniową, jak i wykładową prowadzonego kursu.

Jestem współautorką sylabusu do tego przedmiotu. W roku akademickim 2018/19 przedmiot ten był również realizowany w języku angielskim dla studentów Biologii (English Division).

Planowanie doświadczeń/Experimental design dla doktorantów I roku szkoły doktorskiej, w roku akademickim 2019/2020 oraz 2020/2021. Zajęcia prowadzone w języku polskim i w języku angielskim. Jestem autorką sylabusu do tego przedmiotu.

Jestem też wykładownicą i współautorką sylabusu do przedmiotu „**Wybrane aspekty i trendy w nanobiologii eksperymentalnej**”, realizowanego w szkole doktorskiej prowadzonej w ramach projektu "Multidyscyplinarne studia doktoranckie - nanotechnologia w biomedycynie" w ramach programu POWER 2014-2020, Oś III "Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju", Działanie 3.2 "Studia doktoranckie".

Dodatkowo prowadziłam zajęcia w ramach następujących kursów:

- (1) Inżynieria tkankowa dla studentów kierunku Bioinformatyka, II stopnia (w roku akademickim 2015/16);
- (2) Inżynieria tkankowa z wykorzystaniem komórek macierzystych dla studentów kierunku Bioinformatyka, II stopnia (w roku akademickim 2016/17 oraz 2017/18)
- (3) Techniki znakowania cząstek biologicznych dla studentów kierunku Biologia specjalność Techniki laboratoryjne II stopnia (w roku akademickim 2015/16 oraz 2016/2017);
- (4) Techniki laboratoryjne w medycynie dla studentów kierunku Biologia człowieka, I stopnia (w roku akademickim 2016/17).

Opiekun prac dyplomowych

Prace licencjackie

- (1) **Joanna Nowicka**: „Analiza wybranych algorytmów służących do oceny temperatury topnienia sekwencji nukleotydowych”. Data egzaminu dyplomowego: czerwiec 2014;
- (2) **Zuzanna Stręk**: „Wpływ metforminy na ekspresję neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF) w tkankach i komórkach mysich”. Data egzaminu dyplomowego: 4 lipca 2016;
- (3) **Jakub Milewski**: „Wpływ dasatinibu na aktywność proliferacyjną multipotentnych komórek stromalnych izolowanych z tkanki tłuszczowej koni z syndromem metabolicznym”. Data egzaminu dyplomowego: 10 lipca 2017;
- (4) **Bartosz Brzózka**: „Wpływ nanohydroksyapatytu oraz nanohydroksyapatytu funkcjonalizowanego resweratolem w stężeniach 0.1µM, 0.5 µM i 1µM na morfologię, aktywność metaboliczną i transkrypcyjną ludzkich komórek stromalnych izolowanych z tkanki tłuszczowej”. Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2018;
- (5) **Norbert Urbaniak**: „Profil ekspresji miR-21-5p, mir-124-3p oraz mir -320-3p w komórkach zaangażowanych w regenerację tkanki kostnej”. Data egzaminu dyplomowego: 3 lipca 2019;
- (6) **Katarzyna Krajewska**: „Ekspresja białek morfogenetycznych kości i ich receptorów w wybranych liniach komórkowych kostniakomięsaka”. Data egzaminu dyplomowego: 26 czerwca 2019;
- (7) **Aleksandra Jaworska**: „Profil ekspresji miR-21, -124, -223, -320 w wybranych liniach kostniakomięsaka”. Data egzaminu dyplomowego: 2 lipca 2019;
- (8) **Natalia Pietrkowska**: „Ocena wpływu zahamowania ekspresji cząsteczki miR-21 na żywotność mysich preosteoblastów linii MC3T3. Data egzaminu dyplomowego”: 15 lipca 2020

- (9) **Wojciech Traczyk:** „Ocena modulującego działania cząsteczki miR-21 na aktywność metaboliczną i żywotność komórek linii MC3T3”. Data egzaminu dyplomowego: 20 lipca 2020
- (10) **Klaudia Buś:** „Ocena wpływu zahamowania ekspresji cząsteczki miR-21 na aktywność metaboliczną mysich preosteoblastów linii MC3T3”. Data egzaminu dyplomowego: 14 lipca 2020
- (11) **Krzysztof Data:** „Ocena wpływu nadekspresji miRNA-21 na aktywność proliferacyjną mysich preosteoblastów linii MC3T3”. Data egzaminu dyplomowego: 13 lipca 2020
- (12) **Natalia Romek:** „Rola długich niekodujących cząsteczek RNA (lncRNA) w biologii komórek progenitorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej”. Planowana data egzaminu dyplomowego lipiec 2021

Prace magisterskie

- (1) **Ewa Giezek:** „Ocena aktywności biologicznej substancji o potencjale antyoksydacyjnym – poszukiwanie związków senolitycznych modulujących aktywność proliferacyjną i wydzielniczą multipotentnych komórek stromalnych”. Data egzaminu dyplomowego: 8 września 2017;
- (2) **Rafeeq Khader Hussain:** “The influence of metformin on viability of canine osteosarcoma cell line and expression of chosen miRNA targeting bone morphogenetic proteins”. Data egzaminu dyplomowego: 20 września 2019; Praca w języku angielskim;
- (3) **Vruti Raj Lakhani:** “The influence of metformin on proliferative status of canine osteosarcoma cell line - profound analysis of miRNA and mRNA transcriptome profile associated with cell cycle”. Data egzaminu dyplomowego: 4 lipca 2019; Praca w języku angielskim.
- (4) **Martyna Monika Murat:** “Anti-apoptotic and senolytic activity of metformin toward equine adipose-derived multipotent stromal cells (EqASC)”. Data egzaminu dyplomowego: 20 września 2019; Praca w języku angielskim.
- (5) **Mateusz Sikora:** „Cytokompatybilność polimerowych biomateriałów opartych o nanohydroksyapatyt stosowanych w teranostyce”. Data egzaminu dyplomowego: 5 lipca 2019;
- (6) **Natalia Pokusa:** „Mikropęcherzyki błonowe izolowane z nasienia, źródłem małych niekodujących RNA (mikroRNA), modelujących aktywność metaboliczną komórek progenitorowych endometrium”. Data egzaminu dyplomowego: 7 lipca 2020
- (13) **Katarzyna Krajewska:** „Rola układu molekularnego lncRNA MEG3-miR-19a-BMP4 w biologii komórek tkanki kostnej”. Planowana data egzaminu dyplomowego lipiec 2021
- (7) **Norbert Urbaniak:** „Wpływ zaburzeń metabolicznych na proliferację i plastyczność fenotypową końskich komórek progenitorowych izolowanych z endometrium”. Planowana data egzaminu dyplomowego: lipiec 2021

Pełniłam również funkcję **recenzenta**, oceniając łącznie 14 prac dyplomowych – cztery prace licencjackie oraz dziesięć prac magisterskich – w tym dwóch anglojęzycznych.

Prace doktorskie

Pełnię funkcję promotora pomocniczego w dwóch przewodach doktorskich - jeden przewód doktorski otwarty w dn. 7 marca 2019, drugi ma planowane otwarcie na rok akademicki 2021/2022.

Byłam również opiekunem **praktyk zawodowych** i **wolontariatów** realizowanych przez studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt w Katedrze Biologii Eksperymentalnej – łącznie 9 osób.

6.2 Osiągnięcia organizacyjne

- (1) Zastępowanie kierownika Katedry Biologii Eksperymentalnej – Profesora Krzysztofa Marycza na czas Jego nieobecności w okresach:
 - 19-21.01.2019, 01-10.02.2019, 01-10.03.2019, 02-09.04.2019
 - 06.05-05.06.2019, 06.06.-04.08.2019
 - 12-21.08.2019, 23-30.09.2019, 21-28.10.2019, 25.11-02.12.2019
- (2) Członkini Rady Programowej dla kierunków Biologia i Biologia człowieka
 - Od 1 września 2019 roku do 31 sierpnia 2020
 - Od 1 września 2020 do 31 sierpnia 2024
- (3) Członkini Zespołu ds. strategii Centrum Biologii Doświadczalnej CBS od 2019 – obecnie; praca związana z organizacją laboratorium Centrum Badań Przedklinicznych, przygotowaniem postępowania przetargowego związanego z zakupem kluczowej aparatury badawczej (sekwenator NGS, sorter komórkowy – umowy zrealizowane)
- (4) Członkini Rektorskiej Komisji ds. przeciwdziałania dyskryminacji od 2019 - obecnie
- (5) Sekretarz w Komisji Konkursowej powołanej do przeprowadzenia postępowania konkursowego na stanowisko: adiunkta i adiunkta (*post-doc*) w Katedrze Biologii Eksperymentalnej (postępowanie w roku 2017);
- (6) Członkini Komisji Konkursowej powołanej do przeprowadzenia postępowania konkursowego na stanowisko: adiunkta (*post-doc*) w Katedrze Biologii Eksperymentalnej (postępowanie w roku 2020);
- (7) Egzaminator w komisji przeprowadzającej dyplomowy egzamin licencjacki na studiach stacjonarnych I stopnia na kierunku Biologia – w roku akademickim 2016/2017 (1 komisja) oraz w roku akademickim 2019/2020 (2 komisje).
- (8) Współzałożycielka i opiekun pomocniczy Interdyscyplinarnego Koła Naukowego Biomedyków.
- (9) Recenzent publikacji w zagranicznych czasopiśmie naukowych (41 recenzji; Załącznik 4, II.11.2) oraz pełnienie funkcji edytora gościnnego i członka panelu recenzenckiego (Załącznik 4, II.10.2).
- (10) Recenzent wniosków grantowych dla Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbrighta w ramach programów: Senior Award 2020-21 (1 recenzja) oraz Graduate Student Award 2021-2022 (1 recenzja) (Załącznik 4, II.14.2).

6.3. Popularyzacja wiedzy

- (1) Prowadzenie warsztatów naukowych w laboratoriach Uniwersytetu Przyrodniczego w ramach projektu „Badacz i humanista – Wrocławski GIM” – 02-03-2013 do 06-04-2013.
- (2) Wywiad w radio Eska dot. wykorzystania alg morskich w diecie; 26.02.2016: <http://wroclaw.eska.pl/newsy/swietny-srodek-na-odchudzanie-znalezli-wroclawscy-naukowcy-w-baltyku-wideo-zdjecia-audio/119370>
- (3) Wywiad w telewizji Wrocław dot. planów badawczych w projekcie Sonata Bis; 06.06.2016 <http://wroclaw.tvp.pl/25670635/glony-z-baltyku-dobre-na-wszystko>
- (4) Współautor artykułu popularno-naukowego: Pielok Ariadna, Śmieszek Agnieszka: MiRNA: przełom w diagnostyce i terapii schorzeń koni?; Świat Koni: Ogólnopolski Magazyn Hippiyczny, nr 8 (184), 2019, ss. 38-41;
- (5) Wykład na zaproszenie pt. „Nowatorskie antyoksydanty jako innowacyjny składnik w paszach St. Hippolyt” przeprowadzony podczas III Konferencji naukowej partnerów HippoVet+ oraz St. Hippolyt; 1-2 kwietnia 2017, Wrocław.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć

7.1. Przed doktoratem – zapoznanie się z ideą medycyny regeneracyjnej i badań biomedycznych

W trakcie jednolitych studiów magisterskich, które podjęłam na kierunku biologia stosowana przystąpiłam do Koła Naukowego działającego przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Jako uczestnik Koła Naukowego, otrzymałam możliwość udziału w pracach badawczych prowadzonych w Zakładzie Terapii Doświadczalnej, w Laboratorium Immunobiologii. Opiekunem mojego wolontariatu była dr Iwona Ewa Kochanowska, która zaangażowała mnie w badania realizowane w ramach grantu pt.: „Badania aktywności komórek prekursorowych osteoklastów zawartych we krwi obwodowej pacjentów z osteoporozą menopauzalną, wywołaną długotrwałym leczeniem sterydami lub o innej etiologii”, którego kierownikiem był Profesor Kazimierz Ostrowski.

Następnie praktyki studenckie, które odbywałam w Instytucie stały się przyczynkiem do badań składających się na moją pracę magisterską pt. „Badania aktywności komórek prekursorowych osteoklastów pochodzących z krwi obwodowej różnych gatunków zwierząt”. Promotorem pracy była dr Iwona E. Kochanowska. Realizacja badań w ramach pracy dyplomowej pozwoliła mi zapoznać się z molekularnymi aspektami regulującymi aktywność komórek kościotwórczych (osteoblastów) i kościogubnych (osteoklastów), a przede wszystkim zapoznać się ze specyfiką badań biomedycznych, metodami hodowli komórkowych, technikami opartymi o wykorzystanie przeciwciał (ELISA, Western blot) i badaniami ekspresji genów w oparciu o technikę PCR. Wyniki pracy magisterskiej zostały zaprezentowane w formie publikacji Załącznik 4, (II.4.2.1.1), wykładu (Załącznik 4, II.5.1.1), jak również doniesienia konferencyjnego (Załącznik 4, II.5.1.4).

Moje zaangażowanie w prace badawcze zespołu dr Kochanowskiej przyczyniło się do tego, że po obronie tytułu magistra biologii zostałam włączona w realizację projektu pod tytułem „Ocena aktywacji genów dla białek morfogenetycznych kości (BMPs) w regeneracji szkieletu osiowego i obwodowego, którego kierownikiem był Profesor Andrzej Wojtowicz z Akademii Medycznej w Warszawie. Realizacja prac zleconych w ramach projektu pozwoliła mi poszerzyć wiedzę z zakresu osteoimmunologii, roli białek morfogenetycznych kości w kościotworzeniu, jak również była okazją do doskonalenia przeze mnie technik stosowanych w biologii molekularnej oraz w hodowlach komórkowych.

W październiku 2006 roku zostałam słuchaczką Studium Doktoranckiego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Promotorem mojej pracy doktorskiej był Profesor Jan Kuryszek z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Temat mojej dysertacji odnosił się do roli BMP w stabilizacji fenotypu komórek chrząstki stawowej tj. chondrocytów. Badania wykonywane w trakcie doktoratu realizowane były we współpracy z katowickim Bankiem Tkanek i zespołem dr Henryka Bursiga, który opracował nowatorską procedurę przygotowania chondrocytów do autologicznego przeszczepu na bazie fibrynowego kleju tkankowego. Przygotowane w Banku Tkanek przeszczepy wykorzystywano w leczeniu ubytków chrząstki u pacjentów z martwicą chrzęstno-kostną (OCD, Osteochondritis dissecans). Uszkodzenia chrzęstno-kostne dotyczą głównie ludzi młodych czynnie uprawiających sport. Temat, który znalazł się w polu mojego zainteresowania był szczególnie aktualny, gdyż problematyka profilaktyki i leczenia chorób chrząstki stawowej stanowiła znaczącą część programu „Dekada kości i stawów” przeprowadzonego w latach 2000 do 2010.

Chrząstka stawowa jest unikalną tkanką, którą cechuje ogromna wytrzymałość mechaniczna, odporność na ścieranie oraz sprężystość. Na wyjątkowe właściwości tej tkanki ma



wpływ jej złożona budowa histologiczna oraz duża zawartość proteoglikanów (głównie agrekanu) i białek kolagenowych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Uszkodzenia chrząstki stawowej są trudnym problemem terapeutycznym, głównie ze względu na ograniczone zdolności regeneracyjne tej tkanki. Skuteczność przeszczepów autologicznych chondrocytów przygotowywanych w katowickim Banku Tkanek potwierdzały rezultaty kliniczne i histopatologiczne. Niemniej jednak, istniało ryzyko, że chondrocyty mogą ulegać odróżnicowywaniu wskutek hodowli *in vitro* i licznych ich pasażów, które są istotną i nieodzowną częścią procedury przygotowywania komórek do przeszczepów. Z tego też powodu niezbędne było monitorowanie fenotypu komórek.

W swojej pracy doktorskiej analizowałam profil ekspresji genów kodujących główne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej produkowanej przez chondrocyty tj. ekspresję mRNA dla agrekanu i kolagenu typu II. Materiał badawczy stanowiły chondrocyty propagowane w warunkach *in vitro*, celem przygotowania autologicznego przeszczepu. Komórki izolowane były z chrząstki stawowej pacjentów (n=12) z martwicą chrzęstno-kostną. Średnia wieku pacjentów wynosiła 20 lat (± 4 lata). Przeprowadzone przeze mnie analizy wykazały, że badane chondrocyty uległy częściowemu odróżnicowaniu. Spośród dwóch markerów charakterystycznych dla chondrocytów odnotowałam jedynie ekspresję mRNA agrekanu, której towarzyszył wzrost ekspresji mRNA dla kolagenu typu I, charakterystycznego dla chrząstki włóknistej.

Wiele prac naukowych wskazywało na to, iż korzystny, modulujący wpływ na fenotyp chondrocytów, jak również na produkcję podstawowych komponentów macierzy chrzęstnej, mają białka morfogenetyczne kości (ang. *bone morphogenetic proteins/BMP*), które działając pośrednio lub bezpośrednio na chondrocyty hamują proces odróżnicowywania. Białka morfogenetyczne kości są wielofunkcyjnymi molekułami, zaliczanymi do nadrodziny transformujących czynników wzrostu typu beta (ang. *transforming growth factor β /TGF- β*), w której stanowią największą rodzinę cząsteczek sygnałowych. Dotychczas zidentyfikowano i opisano ponad dwadzieścia białek morfogenetycznych kości, spośród których szczególne znaczenie w stabilizacji wyjściowego fenotypu chondrocytów mają BMP-2 i BMP-4. Białka morfogenetyczne kości zaangażowane są we wszystkie etapy chondrogenyzy, co oznacza, że ich aktywność jest nieodzowna dla właściwego formowania się tkanki chrzęstnej. Proces odróżnicowania chondrocytów jest nieunikniony i następuje już po pierwszym pasażu, o czym świadczą wyniki badań wielu zespołów naukowych. W większości światowych doniesień naukowych stabilność chondrocytów wykazywano głównie po stymulacji hodowli przy użyciu rekombinowanych białek morfogenetycznych kości.

W pracy doktorskiej sformułowałam hipotezę, która zakładała udział autokrynych białek morfogenetycznych kości w prawidłowym różnicowaniu i dojrzewaniu chondrocytów. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że chondrocyty człowieka przygotowywane do autologicznych przeszczepów, nawet po wielu pasażach są zdolne do produkcji aktywnych biologicznie BMP. W szczególności, skupiłam się na badaniu ekspresji BMP-2 i BMP-4. Białka te obok BMP-6 i BMP-7 są najważniejszymi białkami odgrywającymi rolę w rozwoju tkanki chrzęstnej. O ile endogenna ekspresja BMP-6 i -7 w chondrocytach została szeroko przebadana i opisana w literaturze, o tyle ekspresja BMP-2 i BMP-4 została udowodniona w chondrocytach jedynie na poziomie mRNA. Mnie udało się oznaczyć nie tylko ekspresję mRNA *BMP-2* i *BMP-4*, ale również zidentyfikować oba białka w formie aktywnej cząsteczki.

Przy użyciu uznanego testu biologicznego, wykrywającego aktywność alkalicznej fosfatazy wykazałam, że białka morfogenetyczne kości syntetyzowane przez chondrocyty są aktywne biologicznie. Badane chondrocyty wykazywały ekspresję mRNA receptorów dla białek morfogenetycznych kości. Pośrednio w teście ALP wykazałam obecność receptorów na

powierzchni chondrocytów. Co więcej udowodniłam, że na skutek reakcji z BMP w chondrocytach uruchamiany jest szlak przekazywania sygnału z udziałem specyficznych białek Smad. Równoczesna obecność receptorów BMP na powierzchni chondrocytów oraz synteza aktywnych biologicznie BMP jest dowodem na możliwość autokrynnej regulacji komórek, niezmiernie istotnej dla zachowania właściwego fenotypu komórki.

Pomimo tego, że badane chondrocyty nie wykazały ekspresji kolagenu typu II, wnioskowałam, że użycie ich w formie autologicznych przeszczepów jest w pełni uzasadnione ze względu na potencjał proliferacyjny utrzymywany przez autogenne BMP.

Część wyników otrzymanych w toku prac badawczych związanych z pracą doktorską zostało zaprezentowanych w formie plakatu podczas Kongresu Europejskiej Federacji Towarzystw Biochemicznych, FEBS (Załącznik 4, II.5.1.6), jak również w formie prezentacji ustnej na Forum Biologii Eksperymentalnej (Załącznik 4, II.5.1.3). Dodatkowo referat pt. „Przeszczepy autologicznych chondrocytów w fibrynogenowym kleju tkankowym” prezentowany przez Zespół dr Henryka Bursiga, w którym zawarto część wyników mojej pracy doktorskiej, został wyróżniony przez Komitet Międzynarodowego Kongresu Transfuzjologii Klinicznej (Załącznik 4, II. 5.1.7).

7.2. Po doktoracie

7.2.1. Badania nad innowacyjnymi biomateriałami umożliwiające regenerację tkanek *in situ*

Obecnie jestem zaangażowana w badania realizowane w ramach Wiodącego Zespołu Badawczego Reg-Med-Lab, którego kierownikiem jest Profesor Krzysztof Marycz. Jednym z głównych nurtów tam realizowanych jest opracowywanie nowatorskich strategii terapeutycznych opartych o wykorzystanie kluczowych elementów triady inżynierii tkankowej tj. biomateriałów, biomolekuł i multipotentnych komórek stromalnych. Celem prowadzonych badań jest m.in. projektowanie rusztowań wspomagających procesy samonaprawy uszkodzonej tkanki, jak również rusztowań sterujących procesami regeneracji tkanek poprzez mobilizację komórek progenitorowych w miejsce uszkodzenia. W projektach, które realizujemy w zespołach interdyscyplinarnych, jestem osobą inicjującą nowe rozwiązania biomedyczne i metody biologiczne, których celem jest otrzymanie i dokładna charakterystyka biomateriałów/bioaktywnych rusztowań.

Badania takie realizujemy między innymi w ramach projektu OPUS 10 (B080/0015/16) pt. „Otrzymywanie i badania biokompozytów na bazie nanoapatytów przeznaczonych do teranostyki”, którego kierownikiem jest Profesor Rafał J. Wiglus z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN (Załącznik 4, II.7.2.7). Projekt ten jest kontynuacją działania okołokomercyjnego pt. „Wytworzenie biodegradowalnego, bioaktywnego, dwufazowego rusztowania o funkcji chemotaktycznej do regeneracji chrzęstno-kostnej”, którego kierownikiem był Profesor Krzysztof Marycz, a w którym uczestniczyłam pracując we Wrocławskim Centrum Badań EIT+. W ramach działania okołokomercyjnego został stworzony prototyp konstruktu hybrydowego – mieszanin polimerowych tj. termoplastycznego poliuretanu (PU) z polilaktydem (PLA), które funkcjonalizowane były przez nas z wykorzystaniem nanohydroksyapatytu (nHAp)[57]. Cytokompatybilność rusztowań oceniona została z wykorzystaniem ludzkich multipotentnych komórek stromalnych (hASC). Biologia tych komórek była badana w wielu aspektach, m.in. w kontekście wpływu wieku dawcy komórek na ich potencjał regeneracyjny, wrażony poprzez podstawowe parametry cytofizjologiczne, takie jak aktywność wydzielnicza i zdolność do podziałów oraz potencjał do różnicowania się[27]. Z uwagi na wysoką aktywność proliferacyjną i plastyczność fenotypową ASC są doskonałym modelem do badań cytotoksyczności bioaktywnych rusztowań[40,48].

Badania okołokomercyjne wykazały, że otrzymane przez nas prototypy biomateriałów dwufazowych cechują się wysoką cytokompatybilnością, wyrażoną wzrostem aktywności metabolicznej komórek progenitorowych hASC, jak również ich ukierunkowanym tkankowo różnicowaniem się, związanym z produkcją specyficznego macierzy tkankowej w warunkach *in vitro*. Przeprowadzone badania pozwoliły wytypować optymalny układ polimerów domieszkowanych nHAp do konstrukcji dwufazowych rusztowań o potencjalnym zastosowaniu w regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych. Efektywność różnicowania się komórek na rusztowaniach oceniana była na podstawie charakteru wzrostu hodowli, ekspresji genów towarzyszących różnicowaniu się komórek i sekrecji białek macierzy (w tym BMP-2, BMP-4, agrekanu oraz białek kolagenowych), jak również stopnia mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej.

W projekcie OPUS 10 opracowaliśmy trójwymiarowe rusztowania polimerowe tworzone z poli-L-laktydu (PLLA), które również zostały wzbogacone nanohydroksyapatytami (nHAp). Funkcjonalizacja rusztowań PLLA dodatkiem nHAp (10% wag.) sprzyjała adhezji hASC, promowała ich proliferację, usprawniała metabolizm mitochondrialny stabilizując status oksydacyjny komórek i produkcję reaktywnych form tlenu (ROS)[58]. Biomateriały o właściwościach antyoksydacyjnych są szczególnie pożądane z uwagi na to, że obniżają skutki stresu oksydacyjnego, który towarzyszy uszkodzeniu tkanek. Dlatego, też w ramach projektu OPUS 10 stworzyliśmy również hydrożele, pochodne D-glukozy z dodatkiem nHAp. Biomateriały te wykorzystaliśmy jako nośniki dla bioaktywnego związku - rezweratrolu o właściwościach antyoksydacyjnych. Wyniki naszych badań wykazały, że rusztowania te mają istotny wpływ na wzrost żywotności hASC, co związane było m.in. z obniżeniem się odsetka komórek wczesno- i późno-apoptotycznych w hodowlach prowadzonych na rusztowaniach oraz obniżeniem ekspresji markerów pro-apoptotycznych, zarówno na poziomie mRNA (*Bax*) jak i mikroRNA (miR-223 and miR-320).

Nadrzędnym zadaniem projektu OPUS 10 było otrzymanie trójwymiarowych rusztowań PLLA, funkcjonalizowanych nHAp domieszkowanym jonami lantanowców. Funkcjonalizacja ta pozwoliła nam uzyskać biomateriały teranostyczne, dzięki którym możliwe jest kontrolowanie ich integracji z tkanką, jak również monitorowanie procesu regeneracji ubytków chrzęstno-kostnych[59]. W naszej opinii prowadzone prace są kluczowe w kontekście rozwoju spersonalizowanej medycyny regeneracyjnej i teranostyki. Ze względu na właściwości fizykochemiczne i biologiczne, otrzymane przez nas rusztowania stwarzają odpowiednie mikrośrodowisko dla wzrostu komórek progenitorowych (tu: hASC) stymulując je do produkowania składników macierzy zewnątrzkomórkowej w tym agrekanu, kolagenu typu II, czy BMP-7 i odbudowy funkcjonalnej tkanki. Wykazaliśmy również, że otrzymane rusztowania mogą mieć znaczenie w leczeniu nowotworów kości. Ich aktywność ma charakter selektywny, związany z promowaniem wzrostu multipotentnych komórek stromalnych i jednoczesnym hamowaniem proliferacji komórek nowotworowych - kostniakomięsaka[60]. Potencjalne selektywne działanie otrzymanych rusztowań testowaliśmy z wykorzystaniem trzech ludzkich linii kostniakomięsaka: U2 OS, Saos-2 oraz MG63. Komórki te różnią się istotnie potencjałem migracyjnym i proliferacyjnym, co ma związek z ich fenotypem osteoblastycznym wyrażonym ekspresją markerów kościotworzenia. W badaniach wykazaliśmy, że otrzymane biomateriały hamują wzrost komórek kostniakomięsaka, modulując ich aktywność transkrypcyjną, m.in. związaną ze wzrostem ekspresji kaspazy 8 (*Casp-8*) i genu kodującego *BAX*.

7.2.2 Mikroalgi i ich znaczenie w medycynie regeneracyjnej

W latach 2015 - 2017 byłam również wykonawcą prac badawczych realizowanych w ramach projektu Sonata Bis 5 (B080/0010/16) pt. „Wpływ bioaktywnych alg wzbogaconych na drodze biosorpcji w jony Cr(III), Mn(II) i Mg(II) na status gospodarki węglowodanowej w przebiegu syndromu metabolicznego koni (ang. *equine metabolic syndrome/EMS*). Ocena *in vitro* oraz *in vivo*, którego kierownikiem była Profesor Izabela Michalak z Politechniki Wrocławskiej. Celem tego projektu było opracowanie nowatorskich strategii żywieniowych dla koni z syndromem metabolicznym. Badanym surowcem paszowym były algi wzbogacone na drodze biosorpcji w wybrane składniki mineralne (Cr(III), Mg(II), Mn(II)). Konceptcja projektu ściśle odnosiła się do żywienia terapeutycznego, którego celem było złagodzenie objawów klinicznych u koni ze zdiagnozowanym EMS, zarówno na poziomie komórkowym, jak i molekularnym. Celem zadania badawczego, w którym brałam udział była ocena wchłaniania substancji aktywnych zawartych w ekstraktach otrzymanych z modyfikowanych alg. Badania były prowadzone z wykorzystaniem modelu *in vitro* z zastosowaniem linii Caco-2, tj. ludzkich komórek gruczołakoraka jelita grubego oraz komórek progenitorowych izolowanych z tkanki tłuszczowej koni z syndromem metabolicznym (EqASC_{EMS}). Aktywność biologiczna makro i mikroalg oceniana była w oparciu o ich wpływ na proliferację i metabolizm komórek, status oksydacyjny, ekspresję genów szklaku insulinowego i produkcję białek modulujących aktywność insulinopodobnego czynnika wzrostu. Dodatkowo badano ekspresję genów i sekrecję cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz adipokin kluczowych w powstawaniu insulinoooporności. Wyniki badań, w których uczestniczyłam zostały opublikowane w formie trzech oryginalnych prac badawczych [61–63]. Dodatkowo wykazałam, że filtraty pozyskiwane z hodowli mikroalg *Spirulina platensis* mają działanie przeciwnowotworowe, obniżając aktywność migracyjną i proliferacyjną komórek Caco-2. Przeciwnowotworowe i pro-apoptotyczne działanie filtratów *S.platensis* związane było również z obniżeniem aktywności mitochondrialnej, oraz ze wzrostem ekspresji markerów pro-apoptotycznych na poziomie mRNA i miRNA [62].

7.2.3 Niekodujące RNA i ich rola w biologii komórek tkanki kostnej

Znaczenie niekodujących RNA (ang. non-coding RNA/ncRNA) w regulacji ekspresji genów znacząco rośnie, przede wszystkim w kontekście ich roli jako biomarkerów w chorobach nowotworowych, ale ostatnio również w zakresie medycyny regeneracyjnej i metabolizmu komórek tkanki kostnej. Niekodujące RNA, w tym miRNA i lncRNA regulują wiele procesów kluczowych dla utrzymania homeostazy tkanek i organizmu. Rola ncRNA w regulacji osteogenezy związana jest z modulacją ekspresji genów, których produkty warunkują przeżycie, proliferację i różnicowanie się komórek progenitorowych tkanki kostnej – zarówno w komórki kościotwórcze, jak i kościogubne. Wgląd w szlaki molekularne regulowane przez sieć miRNA-lncRNA umożliwia rozwój technik biologii molekularnej, przede wszystkim opartych o sekwencjonowanie nowej generacji umożliwiających analizę transkryptomu (RNASeq). Najważniejsze szlaki molekularne regulowane osi lncRNA-miRNA-mRNA, o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego metabolizmu kości i jej homeostazy podsumowaliśmy w pracy przeglądowej opublikowanej w *Molecular Therapy - Nucleic Acids* [64].

Zaplanowano również realizację projektów związanych z poznaniem biologicznych funkcji ncRNA, a także ich powiązań, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezy chorób kości. Uważamy również, że wiedza ta może doprowadzić do opracowania innowacyjnych narzędzi diagnostycznych i podejść terapeutycznych w chorobach metabolicznych kości, jak osteoporoza oraz nowotworowych m.in. osteosarkoma.

Potencjalne wykorzystanie miRNA jako narzędzia terapeutycznego jest też obiektem badań prowadzonych w ramach projektu Harmonia 9 pt. „Nowe, dwustopniowe rusztowania na bazie nanoapatytu wapnia (nHAp) inkorporowanego nanotlenkami żelaza ($\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$) z funkcją kontrolowanego uwalniania miRNA w statycznym polu magnetycznym do regeneracji złamań kostnych u pacjentów osteoporotycznych”. W projekcie tym Zespół pracuje nad nowatorską metodą dostarczania miRNA w miejsce ubytku kości. Celem projektu jest stworzenie biomateriału, bazującego na nanostrukturalnym hydroksyapatycie i nanocząsteczkach magnetycznych $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$. Opracowywany system pozwoli kontrolować proces przebudowy kości i jej homeostazę, odpowiednio aktywując komórki kościotwórcze i obniżając rekrutację oraz dojrzewanie komórek kościogubnych. Antagonistyczne działanie dwóch cząsteczek miRNA, tj. miR-21-5p oraz miR-124-3p będzie sprzyjać prawidłowej regeneracji i przebudowie kości osteoporotycznej. Nasze badania wskazują również, że należąca do rodziny onkomiR, cząsteczka miR-21 może odgrywać istotną rolę w regulacji interakcji komórek kościotwórczych i kościogubnych. Testy funkcjonalne, związane z wyciszeniem ekspresji miR-21 w pre-osteoblastach linii MC3T3-E1 wskazują, że cząsteczka ta reguluje między innymi ekspresję osteopontyny (OPN), jednocześnie wpływając na różnicowanie osteoblastów i determinując przeżycie osteoklastów[55].

8. Plany na przyszłość

Obecnie pełnię funkcję kierownika zadania badawczego realizowanego w ramach niekomercyjnego badania klinicznego finansowanego przez Agencję Badań Medycznych (ABM). Projekt ten kierowany jest przez Panią Profesor Annę Raciborską z Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Interdyscyplinarny charakter projektu, wiąże się ze współpracą z wiodącymi ośrodkami klinicznymi i badawczymi w kraju w tym „Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytutem Badawczym” oraz Siecią Badawczą Łukasiewicz – Instytutem Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego. Udział naszego zespołu badawczego i zaproszenie Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu do współpracy przy realizacji tego projektu jest wyróżnieniem i ogromną szansą na rozwój naukowy naszego Zespołu. W projekcie wykorzystam wiedzę i umiejętności z zakresu technik hodowli komórkowych i tkankowych, cytometrycznych oraz biologii molekularnej. Projekt ten jest też dla mnie okazją do rozwoju naukowego, szczególnie w kontekście biologii komórek nowotworowych i patogenezy histiocytozy. Jest to też dla mnie okazja do rozwoju własnej grupy badawczej.

Celem projektu będzie „Optymalizacja postępowania oraz leczenia małych pacjentów z rozrostami z komórek histiocytarnych - pierwsze polskie niekomercyjne badanie kliniczne POL HISTIO”. W ramach współpracy z Profesorem Raciborską i kierowanym przez nią Zespołem, zainicjowałam badania, których celem będzie otrzymanie unieśmiertelnionej linii komórkowej izolowanej z tkanek objętych histiocytozą z komórek Langerhansa (ang. Langerhans-cell histiocytosis/LCH). Na realizację projektu Zespół otrzymał finansowanie w wysokości 19 954 352zł, z czego 1 332 490 zł przeznaczone jest na realizację zadania badawczego, którym kieruję. Molekularne mechanizmy patogenezy LCH są wciąż niedostatecznie poznane, co ogranicza właśnie brak dobrze opisanego modelu badawczego, który pozwoliłby na prowadzenie zaawansowanych i powtarzalnych badań biomedycznych z zastosowaniem modelu in vitro. W ramach projektu powołałam zespół badawczy, którego zadaniem będzie wyprowadzenie linii o cechach LCH. Jest to ważny aspekt badań przedklinicznych, gdyż umożliwi testowanie nowych leków/rozwiązań terapeutycznych o potencjalnym znaczeniu w leczeniu tej choroby. Ponadto badania prowadzone w ramach zadania badawczego będą miały na celu określenie profilu

nowych biomarkerów o potencjale diagnostycznym i prognostycznym poprzez analizę poziomów niekodujących RNA (miRNA oraz lncRNA). Badania te mogą przyczynić się do opracowania testów wspomagających wczesne diagnozowanie pacjentów z LCH. Zakładamy, że określanie profili ekspresji miRNA/lncRNA pozwoli monitorować efekty leczenia LCH, a w konsekwencji przyczyni się do poprawy rokowania, poprzez szybszą interwencję lekarza i wcześniejsze wdrożenie właściwego leczenia. Celem badań będzie również poznanie mechanizmów przekazywania sygnałów międzykomórkowych poprzez analizę zawartości mikrofragmentów błonowych uwalnianych przez komórki LCH w mikrośrodowisku tkankowym. Uważamy, że prowadzone przez nas badania pozwolą odkryć nowe czynniki warunkujące transformację komórek LC, tym samym pozwolą odkryć nowe, potencjalne terapie celowane. Zakładamy, że strategie terapeutyczne i diagnostyczne, które planujemy opracowywać i rozwijać w ramach projektu przyczynią się do stworzenia skutecznych terapii celowanych w leczeniu rozrostów histiocytarnych, jak również nowych, molekularnych testów diagnostycznych pozwalających na nieinwazyjne monitorowanie efektów leczenia, co jest wyjątkowo ważne w onkologii dziecięcej.

Mój rozwój naukowy związany jest z zaangażowaniem w realizację aktualnych projektów badawczych w grupie Reg-Med-Lab, uwzględniając pozyskiwanie finansowania na nowe projekty, inicjację współpracy wielozespołowej, zarówno z zespołami badawczymi w kraju jak i zagranicą. Prace badawcze realizowane w ramach zespołu Reg-Med-Lab skupiają się na opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych opartych m. in. o wykorzystanie nanometrycznych biomateriałów, pełniących funkcję rusztowań sterujących procesem odbudowy tkanek, głównie z przeznaczeniem do regeneracji kości i zastosowań teranostycznych. Badania te prowadzimy w współpracy z Instytutem Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, tj. zespołem kierowanym przez Profesora Rafała J. Wiglusza, jak również Instytutem Fizyki PAN i zespołem kierowanym przez Profesora Marka Godlewskiego. W ramach tych współprac inicjuję i uczestniczę w badaniach związanych z opracowywaniem strategii biomedycznych, z zakresu inżynierii tkankowej, wspierających koncepcje regeneracji i utrzymania funkcji tkanek.

Moją misją jest też inspiracja młodych naukowców, studentów i doktorantów do rozwoju i nauki. Wiąże się to z moim dalszym zaangażowaniem w realizację prac dyplomowych, rozwój Interdyscyplinarnego Koła Naukowego Biomedyków, jak również opracowywanie nowych, aktualnych i ciekawych kursów dla studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt.

Wykaz osiągnięć przedstawionych w autoreferacie, jak również pozostałe wyniki aktywności naukowej zostały dodatkowo zestawione w Załączniku nr 4. Moje osiągnięcia publikacyjne zostały nagrodzone przez JM Rektora UPWr w latach 2015-2019.

13.12.2020 r.
A. Śmieszek

9. Piśmiennictwo

1. Bailey, C.J. Metformin: historical overview. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1566–1576, doi:10.1007/s00125-017-4318-z.
2. Scherthaner, G.; Scherthaner, G.-H. The right place for metformin today. *Diabetes Res Clin Pract* **2020**, *159*, 107946, doi:10.1016/j.diabres.2019.107946.
3. Markowicz-Piasecka, M.; Sadkowska, A.; Huttunen, K.M.; Podsiedlik, M.; Mikiciuk-Olasik, E.; Sikora, J. An investigation into the pleiotropic activity of metformin. A glimpse of haemostasis. *Eur J Pharmacol* **2020**, *872*, 172984, doi:10.1016/j.ejphar.2020.172984.
4. Zhao, J.; Li, Y.; Zhang, H.; Shi, D.; Li, Q.; Meng, Y.; Zuo, L. Preventative effects of metformin on glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. *J Bone Miner Metab* **2019**, *37*, 805–814, doi:10.1007/s00774-019-00989-y.
5. Zhou, L.; Liu, H.; Wen, X.; Peng, Y.; Tian, Y.; Zhao, L. Effects of metformin on blood pressure in nondiabetic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hypertens* **2017**, *35*, 18–26, doi:10.1097/HJH.0000000000001119.
6. Eppinga, R.N.; Hartman, M.H.T.; van Veldhuisen, D.J.; Lexis, C.P.H.; Connelly, M.A.; Lipsic, E.; van der Horst, I.C.C.; van der Harst, P.; Dullaart, R.P.F. Effect of Metformin Treatment on Lipoprotein Subfractions in Non-Diabetic Patients with Acute Myocardial Infarction: A Glycometabolic Intervention as Adjunct to Primary Coronary Intervention in ST Elevation Myocardial Infarction (GIPS-III) Trial. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0145719.
7. Roshan, M.H.; Shing, Y.K.; Pace, N.P. Metformin as an adjuvant in breast cancer treatment. *SAGE Open Med* **2019**, *7*, doi:10.1177/2050312119865114.
8. Xin, W.; Fang, L.; Fang, Q.; Zheng, X.; Huang, P. Effects of metformin on survival outcomes of pancreatic cancer patients with diabetes: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol* **2018**, *8*, 483–488, doi:10.3892/mco.2017.1541.
9. He, K.; Hu, H.; Ye, S.; Wang, H.; Cui, R.; Yi, L. The effect of metformin therapy on incidence and prognosis in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 2218, doi:10.1038/s41598-018-38285-w.
10. Li, Z.; Wang, L.; Luo, N.; Zhao, Y.; Li, J.; Chen, Q.; Tian, Y. Metformin inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by suppressing the phosphorylation of Akt. *Oncol Lett* **2018**, *15*, 7948–7954, doi:10.3892/ol.2018.8297.
11. Bahrambeigi, S.; Yousefi, B.; Rahimi, M.; Shafiei-Irannejad, V. Metformin; an old antidiabetic drug with new potentials in bone disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2019**, *109*, 1593–1601, doi:10.1016/j.biopha.2018.11.032.
12. Zhou, G.; Myers, R.; Li, Y.; Chen, Y.; Shen, X.; Fenyk-Melody, J.; Wu, M.; Ventre, J.; Doebber, T.; Fujii, N.; et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 1167–1174.
13. Rena, G.; Hardie, D.G.; Pearson, E.R. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* **2017**, *60*, 1577–1585, doi:10.1007/s00125-017-4342-z.
14. Chen, J.; Ou, Y.; Li, Y.; Hu, S.; Shao, L.-W.; Liu, Y. Metformin extends *C. elegans* lifespan through lysosomal pathway. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.31268.
15. Glossmann, H.H.; Lutz, O.M.D. Metformin and Aging: A Review. *Gerontology* **2019**, *65*, 581–590, doi:10.1159/000502257.
16. Martin-Montalvo, A.; Mercken, E.M.; Mitchell, S.J.; Palacios, H.H.; Mote, P.L.; Scheibye-Knudsen, M.; Gomes, A.P.; Ward, T.M.; Minor, R.K.; Blouin, M.-J.; et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* **2013**, *4*, 2192, doi:10.1038/ncomms3192.
17. Garg, G.; Singh, S.; Singh, A.K.; Rizvi, S.I. Antiaging Effect of Metformin on Brain in Naturally Aged and Accelerated Senescence Model of Rat. *Rejuvenation Research* **2016**, *20*, 173–182, doi:10.1089/rej.2016.1883.
18. Shintani, H.; Shintani, T.; Ashida, H.; Sato, M. Calorie Restriction Mimetics: Upstream-Type Compounds for Modulating Glucose Metabolism. *Nutrients* **2018**, *10*, 1821, doi:10.3390/nu10121821.
19. Rajabzadeh, N.; Fathi, E.; Farahzadi, R. Stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Invest* **2019**, *6*, doi:10.21037/sci.2019.06.04.
20. Rodríguez-Fuentes, D.E.; Fernández-Garza, L.E.; Samia-Meza, J.A.; Barrera-Barrera, S.A.; Caplan, A.I.; Barrera-Saldaña, H.A. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research* **2020**, doi:10.1016/j.arcmed.2020.08.006.

21. Rohban, R.; Pieber, T.R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int* **2017**, *2017*, 5173732, doi:10.1155/2017/5173732.
22. Friedenstein, A.J. Precursor Cells of Mechanocytes. In *International Review of Cytology*; Bourne, G.H., Danielli, J.F., Jeon, K.W., Eds.; Academic Press, 1976; Vol. 47, pp. 327–359.
23. Bianco, P.; Riminucci, M.; Gronthos, S.; Robey, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* **2001**, *19*, 180–192, doi:10.1634/stemcells.19-3-180.
24. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* **1991**, *9*, 641–650, doi:https://doi.org/10.1002/jor.1100090504.
25. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317, doi:10.1080/14653240600855905.
26. Sagaradze, G.D.; Basalova, N.A.; Efimenko, A.Yu.; Tkachuk, V.A. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, doi:10.3389/fcell.2020.576176.
27. Kornicka, K.; Marycz, K.; Tomaszewski, K.A.; Marędzia, M.; Śmieszek, A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, *2015*, 309169, doi:10.1155/2015/309169.
28. Rajendran, R.; Gopal, S.; Masood, H.; Vivek, P.; Deb, K. Regenerative potential of dental pulp mesenchymal stem cells harvested from high caries patient's teeth. *J Stem Cells* **2013**, *8*, 25–41.
29. Marino, L.; Castaldi, M.A.; Rosamilio, R.; Ragni, E.; Vitolo, R.; Fulgione, C.; Castaldi, S.G.; Serio, B.; Bianco, R.; Guida, M.; et al. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells* **2019**, *12*, 218–226, doi:10.15283/ijsc18034.
30. Li, N.; Gao, J.; Mi, L.; Zhang, G.; Zhang, L.; Zhang, N.; Huo, R.; Hu, J.; Xu, K. Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Research & Therapy* **2020**, *11*, 381, doi:10.1186/s13287-020-01885-3.
31. Weiss, A.R.R.; Dahlke, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01191.
32. Śmieszek, A.; Basińska, K.; Chrzęstek, K.; Marycz, K. In Vitro and In Vivo Effects of Metformin on Osteopontin Expression in Mice Adipose-Derived Multipotent Stromal Cells and Adipose Tissue. *J Diabetes Res* **2015**, *2015*, 814896, doi:10.1155/2015/814896.
33. Kahles, F.; Findeisen, H.M.; Bruemmer, D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab* **2014**, *3*, 384–393, doi:10.1016/j.molmet.2014.03.004.
34. De Fusco, C.; Messina, A.; Monda, V.; Viggiano, E.; Moscatelli, F.; Valenzano, A.; Esposito, T.; Sergio, C.; Cibelli, G.; Monda, M.; et al. Osteopontin: Relation between Adipose Tissue and Bone Homeostasis. *Stem Cells Int* **2017**, *2017*, 4045238, doi:10.1155/2017/4045238.
35. Bianco, P.; Robey, P.G.; Simmons, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 313–319, doi:10.1016/j.stem.2008.03.002.
36. Mohamed-Ahmed, S.; Yassin, M.A.; Rashad, A.; Espedal, H.; Idris, S.B.; Finne-Wistrand, A.; Mustafa, K.; Vindenes, H.; Fristad, I. Comparison of bone regenerative capacity of donor-matched human adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* **2020**, doi:10.1007/s00441-020-03315-5.
37. Liao, H.-T.; Chen, C.-T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* **2014**, *6*, 288–295, doi:10.4252/wjsc.v6.i3.288.
38. Song, Y.; Du, H.; Dai, C.; Zhang, L.; Li, S.; Hunter, D.J.; Lu, L.; Bao, C. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med* **2018**, *13*, 295–307, doi:10.2217/rme-2017-0152.
39. Yang, Z.; Li, K.; Yan, X.; Dong, F.; Zhao, C. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2010**, *248*, 1415–1422, doi:10.1007/s00417-010-1384-z.
40. Śmieszek, A.; Donesz-Sikorska, A.; Grzesiak, J.; Krzak, J.; Marycz, K. Biological effects of sol-gel derived ZrO₂ and SiO₂/ZrO₂ coatings on stainless steel surface--In vitro model using mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl* **2014**, *29*, 699–714, doi:10.1177/0885328214545095.
41. Donesz-Sikorska, A.; Grzesiak, J.; Śmieszeka, A.; Krzak, J.; Marycz, K. The influence of sol-gel-derived silica coatings functionalized with betamethasone on adipose-derived stem cells (ASCs). *J Biomater Appl* **2014**, *29*, 465–476, doi:10.1177/0885328214534003.

42. Marycz, K.; Krzak, J.; Marędzia, M.; Tomaszewski, K.A.; Szczurek, A.; Moszak, K. The influence of metal-based biomaterials functionalized with sphingosine-1-phosphate on the cellular response and osteogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stem cells in vitro. *J Biomater Appl* **2016**, *30*, 1517–1533, doi:10.1177/0885328216628711.
43. Marycz, K.; Weiss, C.; Śmieszek, A.; Kornicka, K. Evaluation of Oxidative Stress and Mitophagy during Adipogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from Equine Metabolic Syndrome (EMS) Horses. *Stem Cells International* **2018**, *2018*, 5340756, doi:10.1155/2018/5340756.
44. Marędzia, M.; Marycz, K.; Lewandowski, D.; Siudzińska, A.; Śmieszek, A. Static magnetic field enhances synthesis and secretion of membrane-derived microvesicles (MVs) rich in VEGF and BMP-2 in equine adipose-derived stromal cells (EqASCs)-a new approach in veterinary regenerative medicine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2015**, *51*, 230–240, doi:10.1007/s11626-014-9828-0.
45. Marycz, K.; Śmieszek, A.; Grzesiak, J.; Siudzińska, A.; Marędzia, M.; Donesz-Sikorska, A.; Krzak, J. The Osteogenic Properties of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Cultures on TiO₂ Sol-Gel-Derived Biomaterial. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 651097, doi:10.1155/2015/651097.
46. Marędzia, M.; Marycz, K.; Śmieszek, A.; Lewandowski, D.; Toker, N.Y. The influence of static magnetic fields on canine and equine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2014**, *50*, 562–571, doi:10.1007/s11626-013-9730-1.
47. Marycz, K.; Krzak-Roś, J.; Donesz-Sikorska, A.; Śmieszek, A. The morphology, proliferation rate, and population doubling time factor of adipose-derived mesenchymal stem cells cultured on to non-aqueous SiO₂, TiO₂, and hybrid sol-gel-derived oxide coatings. *J Biomed Mater Res A* **2014**, *102*, 4017–4026, doi:10.1002/jbm.a.35072.
48. Marycz, K.; Śmieszek, A.; Grzesiak, J.; Donesz-Sikorska, A.; Krzak-Roś, J. Application of bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells for testing the biocompatibility of metal-based biomaterials functionalized with ascorbic acid. *Biomed Mater* **2013**, *8*, 065004, doi:10.1088/1748-6041/8/6/065004.
49. Marędzia, M.; Śmieszek, A.; Chrzęstek, K.; Basinska, K.; Marycz, K. Physical Activity Increases the Total Number of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Enhances Their Osteogenic Potential, and Inhibits Their Adipogenic Properties. *Stem Cells International* **2015**, *2015*, 379093, doi:10.1155/2015/379093.
50. Marycz, K.; Mierzejewska, K.; Śmieszek, A.; Suszynska, E.; Malicka, I.; Kucia, M.; Ratajczak, M.Z. Endurance Exercise Mobilizes Developmentally Early Stem Cells into Peripheral Blood and Increases Their Number in Bone Marrow: Implications for Tissue Regeneration. *Stem Cells Int* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/5756901.
51. Preparation for pluripotent very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELS) and hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) CD34+ mobilisation from bone marrow to peripheral blood and the use of metformin (n,n-dimethylbiguanide) - Dimensions Available online: <https://app.dimensions.ai/details/patent/WO-2016059554-A1> (accessed on Dec 9, 2020).
52. Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellems, J.; Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **2009**, *55*, 611–622, doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
53. Androvic, P.; Valihrach, L.; Elling, J.; Sjoback, R.; Kubista, M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, e144, doi:10.1093/nar/gkx588.
54. Androvic, P.; Romanyuk, N.; Urdzikova-Machova, L.; Rohlova, E.; Kubista, M.; Valihrach, L. Two-tailed RT-qPCR panel for quality control of circulating microRNA studies. *Sci Rep* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-40513-w.
55. Śmieszek, A.; Marcinkowska, K.; Pielok, A.; Sikora, M.; Valihrach, L.; Marycz, K. The Role of miR-21 in Osteoblasts–Osteoclasts Coupling In Vitro. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9020479.
56. Seweryn, A.; Pielok, A.; Lawniczak-Jablonska, K.; Pietruszka, R.; Marcinkowska, K.; Sikora, M.; Witkowski, B.S.; Godlewski, M.; Marycz, K.; Śmieszek, A. Zirconium Oxide Thin Films Obtained by Atomic Layer Deposition Technology Abolish the Anti-Osteogenic Effect Resulting from miR-21 Inhibition in the Pre-Osteoblastic MC3T3 Cell Line. *Int J Nanomedicine* **2020**, *15*, 1595–1610, doi:10.2147/IJN.S237898.
57. Marycz, K.; Marędzia, M.; Grzesiak, J.; Lis, A.; Śmieszek, A. Biphasic Polyurethane/Poly(lactide) Sponges Doped with Nano-Hydroxyapatite (nHAp) Combined with Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Stem Cells for Regenerative Medicine Applications. *Polymers* **2016**, *8*, doi:10.3390/polym8100339.

58. Smieszek, A.; Marycz, K.; Szustakiewicz, K.; Kryszak, B.; Targonska, S.; Zawisza, K.; Watras, A.; Wiglusz, R.J. New approach to modification of poly (l-lactic acid) with nano-hydroxyapatite improving functionality of human adipose-derived stromal cells (hASCs) through increased viability and enhanced mitochondrial activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2019**, *98*, 213–226, doi:10.1016/j.msec.2018.12.099.
59. Marycz, K.; Smieszek, A.; Targonska, S.; Walsh, S.A.; Szustakiewicz, K.; Wiglusz, R.J. Three dimensional (3D) printed polylactic acid with nano-hydroxyapatite doped with europium(III) ions (nHAp/PLLA@Eu3+) composite for osteochondral defect regeneration and theranostics. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *110*, 110634, doi:10.1016/j.msec.2020.110634.
60. Sikora, M.; Marcinkowska, K.; Marycz, K.; Wiglusz, R.J.; Śmieszek, A. The Potential Selective Cytotoxicity of Poly (L- Lactic Acid)-Based Scaffolds Functionalized with Nanohydroxyapatite and Europium (III) Ions toward Osteosarcoma Cells. *Materials (Basel)* **2019**, *12*, doi:10.3390/ma12223779.
61. Michalak, I.; Dmytryk, A.; Śmieszek, A.; Marycz, K. Chemical Characterization of Enteromorpha prolifera Extract Obtained by Enzyme-Assisted Extraction and Its Influence on the Metabolic Activity of Caco-2. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18030479.
62. Śmieszek, A.; Giezek, E.; Chrapiec, M.; Murat, M.; Mucha, A.; Michalak, I.; Marycz, K. The Influence of Spirulina platensis Filtrates on Caco-2 Proliferative Activity and Expression of Apoptosis-Related microRNAs and mRNA. *Mar Drugs* **2017**, *15*, doi:10.3390/md15030065.
63. Nawrocka, D.; Kornicka, K.; Śmieszek, A.; Marycz, K. Spirulina platensis Improves Mitochondrial Function Impaired by Elevated Oxidative Stress in Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells (ASCs) and Intestinal Epithelial Cells (IECs), and Enhances Insulin Sensitivity in Equine Metabolic Syndrome (EMS) Horses. *Mar Drugs* **2017**, *15*, doi:10.3390/md15080237.
64. Sikora, M.; Marycz, K.; Smieszek, A. Small and Long Non-coding RNAs as Functional Regulators of Bone Homeostasis, Acting Alone or Cooperatively. *Mol Ther Nucleic Acids* **2020**, *21*, 792–803, doi:10.1016/j.omtn.2020.07.017.

