

Jolanta Kaszuba-Zwońska  
Katedra Patofizjologii  
Wydziału Lekarskiego  
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medium

## AUTOREFERAT

W latach 1982-87 studiowałam biologię na Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Studia ukończyłam z wyróżnieniem uzyskując tytuł magistra ze specjalnością biologia molekularna. Tematem mojej pracy magisterskiej było: „Zastosowanie chromatografii powinowactwa do oczyszczania 3,4-dioksygenazy protokatechanowej z komórek *Nocardia opaca* DSM43202”. Uzyskane wyniki badań były prezentowane na XXIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego - Białystok 1987.

W latach 1987-1989 pracowałam jako asystent w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Lublinie, gdzie prowadziłam zajęcia ze studentami na Wydziale Lekarskim oraz zajmowałam się diagnostyką bakteryjną i grzybiczą infekcji górnych dróg oddechowych.

W październiku 1989 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w dziedzinie biologii molekularnej na Uniwersytecie Jagiellońskim. Pracę doktorską pt. „Aktywność efektorowa kompleksów immunologicznych stabilizowanych barwnikami dwuazowymi” wykonałam w Instytucie Biochemii Lekarskiej UJCM pod kierunkiem Prof. dr hab. med. Leszka Koniecznego. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskałam 27 października 1993 roku. Bezpośrednio po studiach doktoranckich zostałam asystentem w II Katedrze Chorób Wewnętrznych UJCM, w Zakładzie Immunochemii Klinicznej, gdzie pracowałam nad wykorzystaniem barwników dwuazowych takich jak czerwien Kongo, błękit Evansa czy błękit trypanu do wzmocnienia czułości testów immunologicznych opartych na reakcji antygen przeciwciała – immunoprecypitacji i immunoektroforezy rakietskowej.

Po roku otrzymałam 2-letnie (1994-1996) stypendium podoktorskie i odbyłam staż na Uniwersytecie w Wiedniu, w Instytucie Mikrobiologii i Genetyki, w Vienna Biocenter. Pracowałam w zespole kierowanym przez Prof. Manuelę Baccarini w koprojekcie powiązany z zespołem Prof. Alexandra von Gabain. Projekt badań miał na celu wykazanie obecności aktywności RNasy E w komórkach eukariotycznych, która jest enzymem regulującym degradację mRNA u *Escherichia coli* i swojego własnego mRNA. Do tego celu wykorzystano myszą linię makrofagową - BAC, z której wykonywano ekstrakty cytoplazmatyczne i jądrowe, a następnie sprawdzano ich aktywność endonukleolityczną na sekwencjach oligonuleotydowych (wyznakowanych radioaktywnie) bogatych w zasady AU, zawierających różną ilość ich powtórzeń jak ma to miejsce w naturalnym substracie RNasy E, regionie nie podlegającym translacji - 5'UTR. Produkty reakcji były rozdzielane na żelach poliakrylamidowych z mocznikiem. Przeprowadzona analiza produktów reakcji wykazała w ekstraktach otrzymywanych z linii BAC obecność aktywności podobnej do bakteryjnej RNasy E (RNase E like).

W październiku 1996, po powrocie ze stypendium w Wiedniu, rozpoczęłam pracę w zespole Prof. dr hab. med. Juliusza Pryjmy, najpierw w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym UJCM w Prokocimiu (wówczas Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii), a po roku w Zakładzie Immunologii UJ, Instytutu Biologii Molekularnej (obecny Wydział Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii). Problematyka badawcza obejmowała zjawisko zaburzonej fagocytozy neutrofilii przez makrofagi płucne u dzieci z nawracającymi, ciężkimi infekcjami dróg oddechowych. Do przeprowadzenia badań pobierano od dzieci z nawracającymi infekcjami dróg oddechowych popłuczyny oskrzelowo-płucne (bronchoalveolar lavage) w celu izolacji makrofagów płucnych. Uzyskiwane makrofagi płucne były wykorzystywane do testu fagocytozy polimorfonuklearnych (PMN) komórek, izolowanych od zdrowych dawców. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że alveolarne makrofagi pochodzące od dzieci z nawracającymi infekcjami dróg oddechowych wykazywały obniżoną aktywność fagocytarną w stosunku do apoptotycznych neutrofilii jak również, same makrofagi płucne izolowane od badanych pacjentów wykazywały wyższą apoptozę niż makrofagi płucne pochodzące od grupy kontrolnej.

W roku 2000 rozpoczęłam współpracę z Katedrą Patofizjologii kierowaną przez Prof. dr hab. med. Piotra Thor nad interdyscyplinarnym projektem badawczym kierowanym przez Profesora Pryjmę dotyczącym apoptozy limfocytów T pochodzących od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (atopic dermatitis – AD). Prowadzone przeze mnie badania obejmowały izolację z krwi obwodowej od pacjentów z AD zdiagnozowanych wg indeksu SCORAD leukocytów jednojądrzastych (PBMCs), ich hodowlę i stymulację enterotoksyną gronkowcową (SEB) oraz kontrolnymi miogenami jak PWM (miogen szkarłatki) i PHA(fitohemaglutynina). Po 48h, 72h i 96h z hodowli zbierane były supernatanty komórkowe do oznaczenia w nich produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5 i IL-10) techniką ELISA. Uzyskane wyniki potwierdziły dane uzyskane w innych ośrodkach, że stymulacja SEB indukowała apoptozę limfocytów T i zmniejszała ich reaktywność u pacjentów z AD w okresach nasilenia choroby. Ponadto nasze badania wykazały, że apoptoza limfocytów T indukowana enterotoksyną gronkowcową była skorelowana intensywnością symptomów klinicznych jak również kolonizacją skóry przez szczepy *S.aureus*.

Od października 2002 roku zostałam pracownikiem naukowo-technicznym Katedry Patofizjologii, od lutego 2004 roku do chwili obecnej jestem adiunktem. W momencie rozpoczęcia mojej pracy w Katedrze zostałam włączona w badania prowadzone przez zespół Prof. dr hab. med. Piotra Thor nad oddziaływaniem pulsacyjnego pola elektromagnetycznego w różnych dawkach na zwierzęta (modelem doświadczalnym były szczury) w warunkach *in vivo*. Mój udział w badaniach polegał na określeniu metodą immunohistochemiczną ekspresji antygenu c-Kit w różnych odcinkach przewodu pokarmowego szczurów (żołądek, dwunastnica, jelito grube), które przebywały w pulsacyjnym polu elektromagnetycznym oraz u szczurów, które stanowiły grupę kontrolną. Z wykorzystaniem programu morfometrycznego (Multiscan 18.03, CSS) ilościowo oceniałam zmiany powierzchni komórek c-Kit pozytywnych.

Pod wpływem oddziaływania pulsacyjnego pola elektromagnetycznego powierzchnia komórek c-Kit immunododatnich zmniejszała się w dwunastnicy i okrężnicy w porównaniu do preparatów wykonanych od grupy kontrolnej. W celu wyjaśnienia przyczyny uzyskanych zmian morfometrycznych wykonywałam barwienie immunohistochemiczne z przeciwciałem anty Bax analizowanych preparatów z grupy badanej i kontrolnej. U zwierząt, które były eksponowane na pulsacyjne pole elektromagnetyczne stwierdziłam zwiększoną ekspresję białka proapoptotycznego Bax w komórkach c-Kit pozytywnych, co wskazywało na indukcję procesu apoptozy w tych komórkach. Uzyskane w badaniach *in vivo* wyniki na modelu zwierzęcym, sugerowałyby możliwość terapeutycznych implikacji oddziaływania pulsacyjnego pola elektromagnetycznego w chorobach związanych z nadreaktywnością mięśni gładkich.

Badania na modelu zwierzęcym zainspirowały projekty badawcze związane z oddziaływaniem pulsacyjnego pola elektromagnetycznego *in vitro* na leukocyty

jednojądrzaste krwi obwodowej oraz komórki linii komórkowych. Wyniki przeprowadzonych badań przyczyniły się do sformułowania osiągnięcia naukowego zatytułowanego:

„Zmiany żywotności ludzkich leukocytów jednojądrzastych krwi obwodowej i komórek linii U937 oraz indukcja mitochondrialnego (rodzina Bcl-2) i endoplazmatycznego (AIF) szlaku apoptotycznego w komórkach linii MonoMac6 pod wpływem stymulacji pulsacyjnym polem elektromagnetycznym”.

Dorobek naukowy obejmujący problematykę wskazaną w temacie zawiera się w następujących publikacjach:

1. Magnetic field anti-inflammatory effects in Crohn's disease depends upon viability and cytokine profile of the immune competent cells.  
Kaszuba-Zwoińska J, Ciećko-Michalska I, Madroszkiewicz D, Mach T, Słodowska-Hajduk Z, Rokita E, Zaraska W, Thor P.  
J Physiol Pharmacol. 2008 Mar;59(1):177-87.
2. Kaszuba-Zwoińska J, Wojcik K, Bereta M, Ziomber A, Pierzchalski P, Rokita E, Marcinkiewicz J, Zaraska W, Thor P.  
Pulsating electromagnetic field stimulation prevents cell death of puromycin treated U937 cell line.  
J Physiol Pharmacol. 2010 Apr;61(2):201-5.
3. Jolanta Kaszuba-Zwoińska, Edyta Zdziłowska, Paulina Chorobik, Zofia Słodowska-Hajduk, Kajetan Juszcak, Wiesław Zaraska, Piotr J. Thor  
Pulsing Electromagnetic Field and Death of Proliferating Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Acute Myelogenic Leukemia.  
Adv Clin Exp Med 2011, 20, 6, 721–727.
4. J. Kaszuba-Zwoińska, P.Chorobik, K.Juszcak, W.Zaraska , P.J.Thor  
Pulsed electromagnetic field affects intrinsic and andoplasmatic reticulum apoptosis induction pathways in MonoMac6 cell line culture.  
J Physiol Pharmacol. 2012, Oct; 63(5): 537-545.

Badanie na leukocytach jednojądrzastych (PBMCs) izolowanych z krwi obwodowej pacjentów z chorobą Cohna oraz od zdrowych dawców, poddawanych stymulacji pulsacyjnym polem elektromagnetycznym (PEMF, 50 Hz,  $45 \pm 5$  mT) zapoczątkowały projekty badawcze prowadzone na hodowlach komórkowych z oddziaływaniem PEMF. Hodowle PBMC od pacjentów z chorobą Cohna i grupy kontrolnej stymulowano PEMF przez 3h w odstępach 24h. Aby wzmocnić efekt stymulacji elektromagnetycznej na PBMCs, komórki z obu grup przed poddaniem ich działaniu PEMF, zostały zastymulowane mitogenami (PHA, LPS) w celu zwiększenia ich aktywności proliferacyjnej. Ocena żywotności komórek w teście z oranżem akrydyny i bromkiem etydydy wykazała, że PBMC stymulowane miogenami pochodzące od pacjentów z chorobą Cohna wykazywały mniejszą żywotność niż komórki niestymulowane mitogenami i komórki pochodzące od grupy kontrolnej, po ekspozycji na PEMF.

Analiza profilu cytokin z grupy pro- i przeciw-zapalnej produkowanych przez PBMCs wykazała, że komórki izolowane od pacjentów z chorobą Cohna produkowały mniej IFN- $\gamma$  po stymulacji PEMF niż komórki niestymulowane PEMF, natomiast wytwarzały więcej cytokiny przeciwzapalnej IL-10. Uzyskane wyniki pokazują efekt obniżenia żywotności PBMCs przez

oddziaływanie PEMF znacznie wyższy dla komórek pochodzących od pacjentów z chorobą Crohna niż w grupie kontrolnej oraz indukowaną oddziaływaniem PEMF zmianę profilu cytokin z prozapalnego na przeciwzapalny.

Elektromagnetycznie indukowana śmierć komórkowa mogłaby stanowić przyczynek do zastosowanie nieinwazyjnej terapii z niskim ryzykiem efektów ubocznych, bez problemu interakcji leków w przewlekłych chorobach zapalnych.

Projekt badawczy z wykorzystaniem ludzkiej linii komórkowej U937 miał na celu wyjaśnienie mechanizmu indukcji śmierci komórkowej pod wpływem stymulacji PEMF (50 Hz,  $45 \pm 5$  mT). Do badań użyto puromycyny (inhibitor telomerazy) jako czynnika indukującego w komórkach śmierć komórkową (PEMF wywiera najsilniejszy efekt na komórki proliferujące lub z indukowaną śmiercią). Schemat eksperymentów obejmował hodowlę linii U937 stymulowaną puromycyną i poddawaną działaniu PEMF. Analiza żywotności komórek metodą cytometrii przepływowej z wiązaniem aneksyny-V wyznakowanej APC i 7-AAD (7-amino-aktynomycyna D) pokazała, że komórki w których zahamowano aktywność proliferacyjną przez stymulację puromycyną i poddanych ekspozycji na PEMF, wykazywały niższą apoptozę niż komórki niestymulowane puromycyną. Połączone działanie puromycyny i PEMF odpowiada za spadek ilości komórek apoptotycznych (AnV+) i nekrotycznych (AAD+) w hodowli linii U937. Oddziaływanie elektromagnetyczne wpływało protekcyjnie na indukcję śmierci komórkowej przez puromycynę w komórkach linii U937.

Zjawisko zahamowania apoptozy i nekrozy indukowane oddziaływaniem PEMF pod względem terapeutycznym mogłoby zostać wykorzystane do terapii schorzeń z przewlekłym procesem zapalnym, jak również terapii niektórych schorzeń neurodegeneracyjnych, w których apoptoza jest głównym czynnikiem etiopatogenetycznym.

Wyniki dotychczasowych badań wykazywały, że pulsacyjne pole elektromagnetyczne wywiera wpływ na spadek żywotności leukocytów jednojądrzastych izolowanych od pacjentów z chorobą Crohna, stymulowanych *in vitro* mitogenami oraz hamuje śmierć komórkową w hodowli linii U937 poddanej działaniu puromycyny. Dlatego kolejny etap badań oddziaływania PEMF na komórki obejmował komórki natywnie proliferujące izolowane od pacjentów nowo zdiagnozowanych (krew pozostała po diagnostyce cytometrycznej w Klinice Hematologii UJCM) pacjentów z ostrą białaczką mieloblastyczną (AML).

Z leukocytów jednojądrzastych izolowanych od pacjentów z AML zakładano hodowle, które poddawano stymulacji PEMF (50 Hz,  $45 \pm 5$  mT), a następnie za pomocą analizy cytometrycznej analizowano populacje komórek wczesno apoptotycznych, późno apoptotycznych i nekrotycznych.

Uzyskano wzrost liczby komórek pozytywnie barwiących się aneksyną V-APC, 7-amino-aktynomycyną D oraz obydwoma markerami po 3-krotnej ekspozycji PEMF. Pulsacyjne pole elektromagnetyczne indukowało śmierć komórkową w natywnie proliferujących komórkach pochodzących od pacjentów z AML.

Zwiększona podatność natywnie proliferujących leukocytów jednojądrzastych na indukcję śmierci komórkowej pod wpływem oddziaływania PEMF potencjalnie może stanowić element terapii pozbawionej skutków ubocznych, wspierającej konwencjonalne leczenie białaczek (zwłaszcza w przypadku AML, występującej u osób starszych).

Badania z linią monocytarną MonoMac6 poddaną działaniu PEMF (50 Hz,  $45 \pm 5$  mT) miały na celu wyjaśnić mechanizm indukcji szlaków apoptotycznych pod wpływem stymulacji elektromagnetycznej.

Do indukcji apoptozy oprócz stosowanej już w badaniach na linii U937 puromycyny zastosowano kilka innych czynników o zróżnicowanym mechanizmie indukcji śmierci w komórkach, takich jak kolchicyna, cyklofosfamid, minocyklina i nadtlenuk wodoru.

Komórki linii MonoMac6 stymulowane puromycyną/ kolchicyną/ minocykliną i poddawane działaniu PEMF wykazywały obniżoną ilość komórek wczesno apoptotycznych w stosunku populacji kontrolnej nie poddanej działaniu PEMF. W przypadku, gdy komórki były stymulowane minocykliną i PEMF, oprócz zmniejszenia się liczby komórek apoptotycznych, procentowy spadek wystąpił w populacji komórek nekrotycznych.

Przeciwny efekt wywierało oddziaływanie PEMF na komórki traktowane cyklofosfamidem – miał miejsce wzrost ilości komórek wczesno apoptotycznych (AnV+) i nekrotycznych (PI – jodek propydydy), a obniżony poziom komórek późno apoptotycznych (AnV+,PI+).

W przypadku nadtlenu wodoru jak induktora śmierci komórkowej, komórki poddane działaniu PEMF wykazywały wzrost w obrębie komórek wczesno apoptotycznych(AnV+), późno apoptotycznych/nekrotycznych (AnV+, PI+) oraz nekrotycznych (PI) w stosunku do komórek nie eksponowanych na działanie PEMF.

Aby wykazać zaangażowanie szlaków indukcji apoptozy w oddziaływaniu wywieranym przez PEMF, z komórek MonoMac6 stymulowanych puromycyną i PEMF, wyizolowano całkowite RNA, które poddano odwrotnej transkrypcji, a następnie z primerami dla genów uczestników endogennego(mitochondrialnego) szlaku indukcji apoptozy i szlaku związanego z endoplazmatycznym reticulum: c-myc, p21, ENDO-G, bcl-2, casp-9 i AIF, przeprowadzono reakcję półilościowego PCR, która pokazała zmiany w mRNA genów uczestników wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy i czynnika AIF, odpowiedzialnego za aktywację szlaku z udziałem endoplazmatycznego reticulum.

Największy wpływ PEMF był widoczny w ekspresji genu proapoptycznego bax, antyapoptycznego bcl-2 i genu czynnika AIF. mRNA genu ENDO G i genów regulujących cykl komórkowy jak c-myc i p21 nie wykazywały różnic ilościowych między analizowanymi próbkami, wynikającymi z warunków eksperymentalnych.

Analiza ekstraktów komórkowych techniką Westernblot z przeciwciałem anty AIF wykazała zmniejszenie ilości czynnika AIF w cytozolu pod wpływem stymulacji komórek MonoMac6 puromycyną i PEMF.

Uzyskane wyniki eksperymentów przeprowadzonych na linii MonoMac6 wykazały zaangażowanie w mechanizm indukcji śmierci komórkowej pod wpływem oddziaływania PEMF genów endogennego szlaku apoptotycznego (bax, bcl-2) jak również szlaku z udziałem endoplazmatycznego reticulum(czynnik AIF). Oddziaływanie PEMF na komórki linii monocytarnej zmienia ekspresję genów odpowiedzialnych za długość życia komórek, regulujących proces apoptozy.

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze obejmują badania mające praktyczne wykorzystanie oddziaływania pulsacyjnego pola elektromagnetycznego na komórki urothelium, izolowane z pęcherza szczura (RUCC) i poddawane działaniu PEMF *in vivo*, opublikowane w pracy:

Pulsating electromagnetic field stimulation of urothelial cells induces apoptosis and diminishes necrosis: new insight to magnetic therapy in urology.

Juszczak K, Kaszuba-Zwoinska J, Thor PJ.

J Physiol Pharmacol. 2012 Sep;63(4):397-401.

Oddziaływanie PEMF na RUCC powoduje indukcję apoptozy w komórkach i obniżenie ilości komórek nekrotycznych, co w warunkach *in vitro* oznacza efekt przeciwzapalny. Ostatnio, magnetyczne terapie stanowią alternatywną opcję dla schorzeń dróg moczowych czy pęcherza nadreaktywnego (szczególnie neurogennej nadreaktywności). Korzyści jakie niesie takie leczenie to nieinwazyjność, bezpieczeństwo i tolerancja. Potwierdzeniem wyników uzyskanych na RUCC będą dane z eksperymentów, które są w trakcie realizacji z wykorzystaniem komórek ludzkiej linii endotelialnej HMVEC-Bd, wyprowadzonej z pęcherza moczowego.

Obecnie realizuję projekt badawczy zatytułowany: „Zmiana ekspresji mRNA genów regulujących apoptozę (Bcl-2, Bax, Cytochrom c, Apaf-1, XIAP i AIF) oraz żywotności limfocytów izolowanych od pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną (ALL) w odpowiedzi na stymulację pulsacyjnym polem elektromagnetycznym”, realizowany we współpracy z Prof. dr hab. med. Walentyną Balwierz z Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego UJCM. Badania mają na celu wykazanie zmian w ekspresji genów regulujących apoptozę w limfocytach izolowanych od pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną (ALL) pod wpływem oddziaływania PEMF na te limfocyty oraz zmian w ich żywotności, które są konsekwencją zmian w genach regulujących żywotność komórki.

Równocześnie trwają eksperymenty prowadzone na keratynocytach izolowanych z ludzkiej śluzówki jamy ustnej, które w warunkach hodowli *in vitro* poddawane są stymulacji PEMF. Badanie te mają na celu wykazanie anty zapalnego charakteru zmian w komórkach pod wpływem stymulacji elektromagnetycznej.

W latach 2005-2009 uczestniczyłam projekcie badawczym zespołu kierowanym przez Prof. dr hab. med. Krystynę Obtulowicz dotyczącym patomechanizmu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry wywołanego przez nikiel. Mój udział w projekcie polegał na izolacji limfocytów z krwi obwodowej pacjentów z alergią kontaktową na nikiel oraz od grupy kontrolnej. Wyizolowane limfocyty były w hodowli *in vitro* stymulowane siarczanem niklu. W supernatantach oznaczany był poziom cytokin kluczowych dla patomechanizmu alergicznego kontaktowego zapalenia skóry – IL-5 i IFN- $\gamma$ . Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły znaczenie tych cytokin w indukcji alergii kontaktowej.

W roku 2013 i 2014 będę realizowała projekt badawczy zatytułowany: „Zahamowanie procesu apoptozy i zmiany w ekspresji receptorów NMDA i AMPA w komórkach ludzkiej linii astrocytalnej pod wpływem oddziaływania pulsacyjnego pola elektromagnetycznego jako potencjalny mechanizm terapii schorzeń o patomechanizmie neurodegeneracyjnym”, zakończenie którego pozwoli na podjęcie działań nad praktycznym wdrożeniem PEMF do terapii.

Poza działalnością naukowo-badawczą jestem nauczycielem akademickim, prowadzę zajęcia (wykłady, seminaria i ćwiczenia) z Patofizjologii na Wydziale Lekarskim, Farmaceutycznym i Wydziale Nauk o Zdrowiu oraz w Szkole Dla Obcokrajowców UJCM.

Analiza bibliometryczna (sporządzona przez Bibliotekę Medyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medium) mojego dorobku naukowego, wykazuje następującą łączną punktację:

IF=18,407; KBN/MNiSW=211,5; IC=159,66.

Kraków, 30.11.2012r.



