

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko:

Anna Polus

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

tytuł magistra biologii, specjalność biologia molekularna- 06-05-1994, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ, Kraków

tytuł doktora nauk biologicznych -21-06-2002, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, tytuł rozprawy: „Badanie angiogennych mechanizmów działania leptyny”

diagnosta laboratoryjny - 15-09-2006, nr prawa wykonywania zawodu AA 02903

Kierownik Pracowni Biologii Molekularnej Katedry Biochemii Klinicznej UJCM od 05-06-2011 roku
specjalizacja w laboratoryjnej genetyce medycznej - w trakcie specjalizacji od 2012 roku

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ ~~artystycznych~~.

Studia ukończyłam z tytułem magistra biologii o specjalności biologia molekularna w roku 1994, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z wynikiem bardzo dobrym.

Doświadczenie zawodowe zdobywałam pracując od maja 1994 roku na Katedrze Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, jak i na szkoleniach oraz stażach naukowych w jednostkach zagranicznych.

Początkowo pracowałam w Pracowni Hodowli Komórek. Od 1998 roku zajmowałam się diagnostyką zakażeń wirusowych, a od 2000 roku prowadziłam Pracownię Biologii Molekularnej i Pracownię Wirusologiczną (nr w rejestrze KIDL 2662) zajmującą się badaniami jakościowymi i ilościowymi wirusów HBV, HCV, CMV oraz HIV metodami biologii molekularnej. Od 2006 roku jestem diagnostą laboratoryjnym. Prowadzone przeze mnie pracownie uzyskiwały każdego roku międzynarodowe certyfikaty jakości dla wykonywanych badań zarówno jakościowych jak i ilościowych. Opracowywałam dla Ministerstwa Zdrowia zalecenia dla wprowadzenia „Standardów jakości w zakresie badań laboratoryjnych WZW metodą PCR” dla laboratoriów wykonujących oznaczenia metodami biologii molekularnej. W ramach działalności naukowej realizowałam zadania związane z analizą wyników badań molekularnych metodami o dużej przepustowości (OMICs) a szczególnie danych z mikromacierzy ekspresyjnych.

Prowadzone przeze mnie badania naukowe były realizowane w ramach 8 projektów unijnych oraz 7 projektów dotowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (KBN, NCN). Badania były prowadzone zarówno na modelach *in vitro* jak i *in vivo*, dotyczyły głównie wpływu

składników diety, tj. beta-karotenu, nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych na różnicowanie się komórek progenitorowych w angiogenezie i adipogenezie, w procesach leżących u podstaw chorób cywilizacyjnych takich jak otyłość, miażdżycy, zespół metaboliczny czy choroby nowotworowe.

W ramach projektów realizowałam zadania łączące wysokoprzepustowe metody molekularne „OMICS” - transkryptomikę, lipidomikę, metabolomikę oraz analizę bioinformatyczną w celu wykazania wpływu składników codziennej diety na regulację procesów wewnątrzkomórkowych tj. stresu retikulum endoplazmatycznego (ER), proliferacji, apoptozy, autofagii, aktywności peroksysomów i proteasomów, tworzenia kropli lipidowych (LD), funkcji mitochondrium, tworzenia tubul - model angiogenezy *in vitro*.

Współtworzyłam Pracownię Badań Genetycznych i Nutrigenomiki w Zakładzie Biochemii Klinicznej UJCM, która została przekształcona w roku 2011 w Zakład Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki. Od roku 2011 jestem kierownikiem Pracowni Biologii Molekularnej Zakładu Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki Katedry Biochemii Klinicznej UJCM, w ramach której prowadzone są badania naukowe jak i diagnostyczne.

W ramach działalności diagnostycznej interpretuję wyniki analizy fragmentów STR u pacjentów z białaczką dla oceny chimeryzmu hematopoetycznego po allogeniczej transplantacji szpiku.

Prowadzę szkolenia z technik biologii molekularnej w ramach specjalizacji w laboratoryjnej genetyce medycznej dla diagnostów, prowadzę wykłady w ramach kursów specjalizacyjnych: „Diagnostyczne metody laboratoryjne w genetyce klinicznej” dla lekarzy oraz „Techniki biologii molekularnej dla specjalizujących się w laboratoryjnej diagnostyce medycznej”.

W trakcie pracy w Katedrze Biochemii Klinicznej UJCM kilkakrotnie doskonaliłam swoje umiejętności w laboratoriach biologii molekularnej we wiodących ośrodkach w ramach:

stażów zagranicznych

-1995 - Katedra Kardiologii, Uniwersytet w Tübingen, Niemcy, staż naukowy i realizacja badań z wykorzystaniem pierwotnych hodowli komórkowych komórek śródbłonki naczyń (HUVEC) oraz mięśni gładkich (VSMC)

-2003 - Instytut Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej, Klinikum der Universität Regensburg, Niemcy, staż naukowy, analiza wyników mikromacierzy ekspresyjnych

-2004 - RIKILT Institute in Food Bioactives Group Wageningen Holandia staż naukowy, analiza ekspresji genów metodą mikromacierzy

szkoleń zawodowych

27.06-1.07-2005 - Maastricht, Holandia, szkolenie z zakresu analizy i opracowania wyników mikromacierzy NuGO „Hands-on advanced microarray analysis course”

15-16.03-2006 Poznań, „Jakość w medycznym laboratorium diagnostycznym”

30.08 - 2.09 - 2006 - Warszawa, „Metody analizy statystycznej w genetyce populacyjnej”

18.11-19.11 - 2010 - Warszawa, Seminarium i warsztaty "Mikromacierze ekspresyjne - projektowanie eksperymentów i analiza danych"

22.11-23.11 - 2010 - Kraków, „Wymagania Dobrej Praktyki Laboratoryjnej i Dobrej Praktyki Wytwarzania w badaniach biotechnologicznych”

9.04 -2011 -Warszawa, „Genomika 2011. Technologie, diagnostyka medyczna, zastosowania”

10.04 - 2011 - Warszawa, „Mikromacierze. Analiza danych z użyciem programu GeneSpring”

18.10 - 20.10 - 2011 - Waldbronn, Niemcy, „Agilent Genomic Workbench”

19-11-2013 - Warszawa „Wybrane typy wad wrodzonych – etiopatogeneza, diagnostyka, postępowanie terapeutyczne oraz poradnictwo genetyczne ”

4.09 - 5.09, 11.09 - 12.09, 18.09 - 2014 - Kraków, „III Warsztaty Statystyczne dla pracowników i doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum”

11.01 - 15.01 - 2016 - Kraków, „Network biology Workshop: Cytoscape” szkolenie z zastosowania programów do analizy wyników OMICS

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Analiza mechanizmów aktywowanych w trakcie redukcji zawartości lipidów w tkance tłuszczowej pod wpływem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 i saquinawiru, w tym związku ekspresji genów ze zmianami profilu lipidowego.

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

Cykl prac obejmujących zagadnienie pt.:

1. **Polus A, Kiec-Wilk B., Czech U., Knapp A., Ciałowicz U., Sigrüner A., Konovalova T., Schmitz G., Malecki M. and Dembinska-Kiec A.** Lipid and Gene Interactions during Differentiation of Human Subcutaneous Adipose Tissue Stromal Vascular Cells J Cell Sci Ther 2012, 3: 132 doi: 10.4172/2157-7013.1000132
2. **Polus A, Kiec-Wilk B, Razny U, Gielicz A, Schmitz G, Dembinska-Kiec A.** Influence of dietary fatty acids on differentiation of human stromal vascular fraction preadipocytes. Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids 2015 Sep;1851(9):1146-55.
3. **Polus A, Zapala B, Razny U, Gielicz A, Kiec-Wilk B, Malczewska-Malec M, Sanak M, Childs CE, Calder PC, Dembinska-Kiec A.** Omega-3 fatty acid supplementation influences the whole blood transcriptome in women with obesity, associated with pro-resolving lipid

mediator production. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug 12;1861(11):1746-1755. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.005.

4. **Polus A, Bociaga-Jasik M, Czech U, Goralska J, Cialowicz U, Chojnacka M, Polus M, Jurowski K, Dembinska-Kiec A.** The human immunodeficiency virus (HIV1) protease inhibitor saquinavir activates autophagy and removes lipids deposited in lipiddroplets. *J Physiol Pharmacol*. 2017 Apr;68(2):283-293. PubMed PMID: 28614778.

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Celem badań była ocena związku zmian ekspresji genów i profilu lipidów w komórkach tkanki tłuszczowej z procesami regulowanymi przez wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) oraz saquinavir (SQV).

Cele szczegółowe pracy:

1. Ocena wpływu warunków stymulujących różnicowanie preadipocytów, tworzenie kropli lipidowych (LD), na ekspresję białek związanych z tworzeniem LD i metabolizmem lipidów oraz autofagią.
2. Ocena wpływu kwasów tłuszczowych i SQV na zmiany ekspresji genów i profilu lipidów komórkowych w trakcie deponowania lipidów w trakcie adipogenezy.
3. Analiza związku aktywowanych procesów wewnątrzkomórkowych ze zmianami ekspresji genów, profilem kwasów tłuszczowych i ich pochodnych.
4. Analiza związku zmian ilości kwasów tłuszczowych z ekspresją genów i aktywnością enzymów biorących udział w metabolizmie kwasów tłuszczowych.

Przedstawione badania dotyczą podstaw molekularnych współzależności otyłości i stanu zapalnego. Składniki codziennej diety mogą nasilać odpowiedź zapalną poprzez zwiększenie stężenia we krwi wielu cytokin, chemokin, czynników wzrostowych i adipokin, których działanie wiąże stan zapalny z zaburzeniami metabolicznymi. Nagromadzenie tkanki tłuszczowej (szczególnie trzewnej) wynikające głównie z dostarczania w nadmiarze do organizmu substratów energetycznych wiąże się ze zwiększonym ryzykiem cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, miażdżycy i chorób układu krążenia (CVD) oraz stłuszczenia wątroby.

W ostatnich latach intensyfikowane są badania nad suplementami codziennej diety oraz zależnej od nich regulacji mechanizmów wewnątrzkomórkowych, których aktywacja przyczyniłaby się do redukcji stanu zapalnego, jak również do zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej.

W prezentowanych badaniach analizowany był wpływ na różnicowanie komórek tkanki tłuszczowej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3, które w warunkach fizjologicznych wyciszą przewlekły stan zapalny oraz saquinawiru – leku przeciwretrowirusowego, którego działanie uboczne prowadzi do rozwoju lipodystrofii.

Publikacje 1 i 2

W warunkach *in vitro* dodane "proadipogenne" czynniki naśladowały nadmiar składników odżywczych dostarczanych do organizmu i były wykorzystywane do stymulacji szlaku cAMP, aby pobudzić różnicowanie komórek SVF (*stromal vascular fraction cells*) w kierunku adipocytów. Warunki proadipogenne powodowały różnicowanie się komórek SVF, czego rezultatem było gromadzenie lipidów w tych komórkach w postaci kroplek lipidowych (LD). Ilościowa analiza obecności triglicerydów (TG) w zróżnicowanych komórkach SVF wykazała 3-krotny wzrost ilości TG zdeponowanych w LD jak również wzrost ilości związanych z nimi białek - *PAT protein (Perilipin 1 (PLIN1), Adipose differentiation-related protein (ADRP), Tail-interacting protein of 47 kiloDaltons (TIP47))*.

Ten model różnicowania komórek progenitorowych SVF do adipocytów posłużył w dalszych badaniach do analizy wpływu kwasów omega-3 jak i SQV na procesy związane z hamowaniem procesu adipogenezy, a w rezultacie pozwolił na poznanie mechanizmów uczestniczących w redukcji masy tkanki tłuszczowej.

W podjętych badaniach poprzez analizę zmian ekspresji genów i profilu lipidów wykazałam, jak badane czynniki regulują procesy wewnątrzkomórkowe w trakcie adipogenezy, tj. ER-stres, szlak NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) i syntezę białek stanu zapalnego, funkcje mitochondrium, w tym regulację ekspresji białek łańcucha oddechowego, apoptozę, autofagię, metabolizm lipidów, różnicowanie komórek w tym tworzenie LD oraz ekspresję związanych z nimi białek.

Kwasy tłuszczowe dodane do proadipogennego medium w trakcie stymulacji różnicowania regulowały deponowanie lipidów w LD jak i ich wielkość. Dodanie kwasu palmitynowego (PA), kwasu oleinowego (OA), kwasu arachidonowego (AA) promowało akumulację lipidów w LD w komórkach SVF, natomiast obecność kwasu eikosaheksaenowego (EPA) hamowała ten proces, co korelowało ze zmianami ekspresji białek PAT. Ilość PLIN1, białka obecnego w komórkach gdzie tworzą się duże krople lipidowe, była zwiększana szczególnie przez AA, natomiast wzrost ilości TIP47, białka obecnego na małych LD, obserwowano po dodaniu EPA.

Warunki stymulujące różnicowanie SVF istotnie zmieniały profil lipidów w tych komórkach. Krótki okres stymulacji (48h) komórek SVF czynnikami pobudzającymi różnicowanie do adipocytów powodował generalnie wzrost syntezy wszystkich klas lipidów oraz zróżnicowane wbudowywanie kwasów tłuszczowych w strukturę poszczególnych klas lipidów. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA) były wbudowywane w strukturę SPM (sfingomieliny), fosfatydyloseryny (PS), fosfatydyloinozytolu (PI), fosfatydyloetanolaminy (PE), lizofosfatydylocholino (LPC), estrów cholesterolu (CE) i fosfatydyloglicerolu (PG), natomiast wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA)

– w strukturę SPM, PS, PI, PE, LPC i CE. Wzrastała również ilość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) wbudowywanych w struktury SPM oraz Cer (ceramidy).

Po 15 dniach różnicowania komórek SVF głównymi gromadzonymi kwasami tłuszczowymi w tych komórkach były kwasy o łańcuchach długości 16-18 atomów węgla, nasycone lub jednonienasycone. Przedłużenie czasu różnicowania do 15 dni powodowało również zmniejszenie ilości długołańcuchowych (> 20 atomów C) kwasów tłuszczowych. Warunki różnicujące stymulowały w komórce syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych i wbudowywanie ich w strukturę Cer powstających w komórce w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego.

Dodanie kwasów tłuszczowych (PA, OA, AA, EPA) podczas różnicowania komórek SVF nie zmieniło znacząco ilości poszczególnych klas lipidów, ale proporcje wbudowanych w nie kwasów tłuszczowych.

Dodanie do proadipogennych warunków PA i OA powodowało po 48h wzrost ich inkorporacji do struktury lipidów komórkowych, a przedłużenie hodowli komórkowej do 15 dni jeszcze nasiliło ten efekt. Również dodanie AA lub EPA powodowało początkowo wzrost ilości tych kwasów tłuszczowych w lipidach komórkowych. Stwierdzono natomiast, że wydłużenie hodowli komórek do 15 dni powoduje zmniejszenie ich ilości. Tworzenie LD korelowało z obserwowaną redukcją ilości AA oraz EPA w lipidach komórkowych. Ze wzrostem ilości i wielkości LD zmniejszała się ilość AA w strukturze lipidów, natomiast spadek ilości EPA w lipidach komórkowych korelował z powstawaniem mniejszej ilości i małych LD.

Analiza metodą mikromacierzy zmian ekspresji genów wykazała, że zastosowane proadipogenne warunki istotnie aktywują ekspresję genów czynników transkrypcyjnych regulujących proces różnicowania komórek SVF do adipocytów oraz genów markerów różnicowania adipocytów. Różnicowanie komórek SVF było związane z nasileniem ekspresji genu *ACSL1*, enzymu, który przyłącza do wolnych kwasów tłuszczowych koenzym A umożliwiając włączanie kwasów tłuszczowych do różnych procesów metabolicznych. W warunkach proadipogennych nasila się również ekspresja genów uczestniczących w syntezie, desaturacji oraz elongacji kwasów tłuszczowych. Różnicowanie powodowało wzrost ekspresji genów uczestniczących w syntezie diacylogliceroli. Dodanie PA, OA i AA w trakcie stymulacji różnicowania dodatkowo nasilało ten efekt, podczas gdy dodanie EPA nie wpływało znacząco na zmianę ekspresji enzymów uczestniczących w tych procesach.

Warunki proadipogenne nasilały ekspresję genu oksydazy NADPH 4 (*NOX4*), genów z rodziny czynnika transkrypcyjnego NFκB jak również genów prozapalnych cytokin, chemokin i ich receptorów. W odróżnieniu od EPA dodanie w trakcie stymulacji różnicowania kwasów tłuszczowych tj. PA, OA, AA jeszcze nasilało ten efekt. Obserwowano również zwiększenie ekspresji białek przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu w komórkach.

Poprzez badanie składu kwasów tłuszczowych w lipidach komórkowych analizowano pośrednio aktywność enzymów – desaturaz i elongaz kwasów tłuszczowych. Badanie stosunku

produkt/substrat dla danego enzymu pośrednio służyło ocenie aktywności poszczególnych enzymów. Aktywność tą korelowano z ekspresją genów enzymów zaangażowanych w metabolizm kwasów tłuszczowych.

Stwierdzona stymulacja lipogenezy *de novo* (DNL) korelowała ze zwiększeniem w trakcie różnicowania ekspresji genów uczestniczących w syntezie malonylo-CoA oraz czynnika transkrypcyjnego regulującego lipogenezę SREBF1 (*Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1*).

Po 48 godzinach różnicowania w komórkach SVF wzrastała ilość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) o długości 16-18 atomów węgla co korelowało ze wzrostem ekspresji genów desaturaz SCD1 oraz SCD5, enzymów wprowadzających wiązania podwójne w 16-18 węglowe łańcuchy kwasów tłuszczowych.

Pomimo obserwowanego wzrostu ekspresji genu, nie stwierdzono nasilenia aktywności enzymu FADS1, desaturazy $\Delta 5$, odpowiadającej za wprowadzanie kolejnego czwartego wiązania nienasyconego do struktury kwasu tłuszczowego, m.in. za syntezę kwasu arachidonowego (AA, C20:4, n-6) z kwasu gamma-linolenowego (GLA, C18:3, n-6) oraz kwasu dihomo-gamma-linolenowego (DGLA, C20:3, n-6). Obliczony współczynnik aktywności (20:4/20:3) wskazywał, że warunki stymulujące różnicowanie obniżały ilość kwasu arachidonowego w lipidach komórkowych, być może poprzez stymulację ekspresji fosfolipaz A2, enzymów wycinających kwas arachidonowy z lipidów błony. Również niska wartość stosunku kwasów EPA+DHA/AA (20:5+22:6/20:4<0) świadczy o tym, że uwolniony z lipidów błonowych kwas arachidonowy nie służy jako substrat do syntezy innych kwasów, ale zostaje włączony w inne szlaki metaboliczne (publikacja 1)

Z analizy współczynników opisujących aktywność enzymów wynikało, że warunki stymulujące różnicowanie hamują elongację SFA natomiast nasilają wydłużanie MUFA o długości łańcucha 16-22 atomów węgla. Współistniało to ze wzrostem ekspresji genów odpowiednich elongaz *ELOVL3* oraz *ELOVL6* wydłużających łańcuchy SFA jak i MUFA o długości łańcucha 16-22 atomów węgla. Jednocześnie warunki stymulujące różnicowanie powodowały wzrost ekspresji genu elongazy *ELOVL5* wydłużającej PUFA, co korelowało z początkowym wzrostem ilości długołańcuchowych PUFA.

Różnicowanie komórek SVF oraz związana z tym nasiloną estryfikacją kwasów tłuszczowych i ich deponowanie w LD tkanki tłuszczowej w postaci triglicerydów czy estrów cholesterolu może chronić inne komórki organizmu przed toksycznością krążących wolnych kwasów tłuszczowych.

PA, OA, AA wzmagają różnicowanie SVF (powstawanie LD) być może ze względu na zwiększoną lipotoksyczność występującą podczas ekspozycji na te kwasy tłuszczowe.

W zastosowanych warunkach eksperymentalnych obserwowano znaczną aktywację ekspresji genów enzymów związanych biosyntezą eikozanoidów (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 - PTGS1*, *Thromboxane A synthase 1 - TBXAS1*, *Prostaglandin D2 synthase - PTGDS*) i lipooksygenaz (*Arachidonate 15-lipoxygenase, type B - ALOX15B*, *Arachidonate 5-lipoxygenase - ALOX5*,

Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein - ALOX5AP) oraz peroksydazy (*Glutathione peroxidase 3 - GPX3*). Stwierdzono również stymulację ekspresji fosfolipaz A(2), które katalizują hydrolizę kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2 fosfolipidów dostarczając substratów do produkcji eikozanoidów.

Dodanie egzogennych kwasów tłuszczowych PA, OA, AA czy EPA po krótkim okresie stymulacji różnicowania SVF (48h) wzmagало to zjawisko. Jednak tylko wzmożona ekspresja *GPX3* utrzymywała się do 15 dnia różnicowania, świadcząc o nasileniu ER-stresu.

Obserwowano również aktywację ekspresji genów enzymów z rodziny CYP2, nasilaną przez AA i EPA, których aktywność może powodować produkcję przeciwzapalnych i anty-adipogennych pochodnych, była ona szczególnie stymulowana przez AA i EPA.

Takie spektrum aktywacji ekspresji genów enzymów wskazywało na możliwość zwiększonej biosyntezy prozapalnych (np. tromboksanu A_2 - $TBXA_2$, leukotrienu E_4 - LTE_4), jak również potencjalne proadipogennych (np. prostaglandyny D_2 - PGD_2) eikozanoidów. Jednocześnie możliwa byłaby biosynteza przeciwzapalnych i anty-adipogennych mediatorów, takich jak tromboksan A_3 (TXA_3), prodtaglandyna D_3 (PGD_3), leukotrien B_5 (LTB_5), kwas 15-hydroperoksyekoizatetraenowego (15-HPETE), kwas 15-hydroksyeikoizatetraenowego (15-HETE), kwas 15-hydroperoksyekoizapentaenowego (15-HPEPE), kwas 15-hydroksyeikoizapentaenowy (15-HEPE) i lipoksyn (LXA). Zależne jest to w komórce od dostępności substratów dla enzymu ALOX15B, którego ekspresja genu była najbardziej aktywowana.

Wydzielanie różnych pochodnych PUFA do medium hodowlanego zweryfikowano poprzez analizę obecności 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, LXA_4 , LXA_5 przy pomocy spektrometrii mas (GS-MS/MS) w czasie różnicowania komórek SVF jak również poprzez weryfikację ilości białka enzymu ALOX15B metodą Western blot.

Obecność EPA podczas różnicowania komórek SVF znacznie podwyższała zawartość białka ALOX15B po upływie 48 godzin. Wyniki te wyraźnie potwierdziły wyniki ekspresji genów (mikromacierze ekspresyjne).

Dodanie AA i EPA, podczas początkowego okresu różnicowania zwiększało również ilość wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych i ich pochodnych, lipoksyn - LXA_4 z AA, LXA_5 z EPA. Co ciekawe, EPA również aktywował produkcję przeciwzapalnej LXA_4 , której generacja chociaż na niższym poziomie utrzymała się do 15 dnia różnicowania.

Podsumowując, aktywacja różnicowania komórek SVF stymulowała ekspresję genów związanych z syntezą eikozanoidów, co prowadzi do biosyntezy proadipogennych, ale i prozapalnych eikozanoidów, na ogół pochodnych AA. Różnicowanie preadipocytów było związane z redukcją ilości AA w lipidach komórkowych oraz aktywacją syntezy pochodnych AA uznanych za aktywatory PPAR-gamma (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma*). Natomiast dodanie EPA powodowało, że ten sam układ enzymów produkował pochodne EPA o słabszym działaniu prozapalnym, a nawet przeciwzapalnym.

Powstawanie małych LDs i redukcja produkcji prozapalnych czynników stymulujący rozwój tkanki tłuszczowej są konsekwencją wytwarzania pochodnych EPA mających potencjał przeciwzapalny i antyadipogeny.

Publikacja 3

Kolejny etap badań dotyczył roli suplementacji kwasami tłuszczowymi EPA i DHA grupy kobiet z otyłością. Do badań wybrano grupę kobiet, u których trzymiesięczna suplementacja 1.8 g EPA+DHA/dzień (DHA:EPA w stosunku 5:1) spowodowała ponad 20% wzrost ilości DHA i EPA wbudowanych w fosfotydylocholinę osocza i w lipidy błon erytrocytów. Były to kobiety w wieku średnio 46 (\pm 9) lat, z umiarkowaną otyłością i objawami zespołu metabolicznego. Stwierdzono podwyższony poziom całkowitego cholesterolu i frakcji LDL, natomiast poziom triglicerydów (TG) w osoczu był prawidłowy. Obserwowano prawidłowy poziom glukozy na czczo, chociaż średnie stężenie insuliny w osoczu było podwyższone. Suplementacja DHA i EPA spowodowała redukcję masy ciała, obniżenie TG i insuliny na czczo oraz markerów prozapalnych tj. hsCRP (*C-reactive protein*), MCP-1 (*C-C motif chemokine ligand 2*), sSELE (E-selektyny), sVCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*), and sPECAM-1 (*Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*). Stwierdzono również, że trzymiesięczna suplementacja spowodowała znaczny wzrost stężenia przeciwzapalnych pochodnych DHA: rezolwiny D₁ (RvD₁), rezolwiny D₂ (RvD₂), protektyny X (DiHDoHE – kwas 10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaenowy, PDX). Stężenia pochodnych AA - LXA₄ i EPA - LXA₅ również były podwyższone, ale wzrost względem poziomu przed suplementacją nie był istotny statystycznie.

Analiza zmian ekspresji genów spowodowana przez suplementację DHA i EPA wykazała wzrost ekspresji genów związanych z aktywacją stresu ER poprzez kinazę PERK (*EIF2AK3*, *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3*) i prowadzącą do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NRF2 (*NFE2L2*, *nuclear factor, erythroid 2 like 2*), aktywację autofagii, nasiloną ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, zwiększoną ekspresję enzymów zaangażowanych w syntezę *de novo* ceramidów, plazmalogenów, kardiolipiny i kwasu fosfatydowego. Suplementacja obniżała ekspresję prozapalnych cytokin, chemokin i ich receptorów oraz białek adhezyjnych, natomiast stymulowała ekspresję receptora dla lipoksyn i rezolwin. Powodowała nasilenie ekspresji enzymów i białek zależnych od aktywacji PPAR-alfa biorących udział w procesie beta-oksydacji w mitochondriach i peroksysomach oraz w transporcie elektronów na łańcuchu oddechowym.

Na podstawie badań w grupie kobiet z otyłością suplementowanych n-3 PUFA, można twierdzić, że przeciwzapalna aktywność DHA i EPA podobnie jak to obserwowano na modelu badań *in vitro* przejawia się we wzroście produkcji przeciwzapalnych pochodnych DHA, EPA i ekspresji ich receptora, co powoduje obniżenie ścieżki przekazu sygnału zależnej od aktywności NFκB, a przez to hamowanie produkcji prozapalnych cytokin i molekuł adhezyjnych.

Pochodne DHA i EPA poprzez aktywację NRF2 powodowały wzrost ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych, obniżenie aktywności NFκB, powodując hamowanie produkcji

prozapalnych cytokin i molekuł adhezyjnych, natomiast przez aktywację PPAR-alfa - nasilenie ekspresji genów uczestniczących w katabolizmie lipidów.

Publikacja 4

Kolejnym etapem badań była analiza ubocznego działania SQV leku stosowanego w terapii pacjentów zakażonych wirusem HIV. Jednym ze znanych efektów ubocznych działania inhibitorów proteaz stosowanych podczas terapii antyretrowirusowej jest lipodystrofia. Wprowadzenie wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (HAART) spowodowało spadek umieralności i wzrost przeciętnej długości życia pacjentów zakażonych HIV. Niestety terapia powoduje zmiany w funkcjonowaniu tkanki tłuszczowej i skutkuje wystąpieniem licznych ciężkich lipodystrofii charakteryzujących się obwodowym zanikiem tkanki tłuszczowej, a objawy te nie zanikają po zakończeniu leczenia.

W eksperymentach *in vitro* prowadzonych na linii komórek ludzkich preadipocytów Chub-S7 (unieśmiertelnionych komórek SVF) SQV hamował indukowane przez warunki różnicowania powstawanie LD oraz hamuje ekspresję genów białek PAT, markerów adipogenezy i enzymów związanych z metabolizmem kwasów tłuszczowych. Towarzyszyły temu zmiany składu lipidów komórkowych wzrost ilości PI PLPE, PC. Wyniki wskazują, że hamowanie produkcji lipidów *de novo* może być związane z hamowaniem aktywności czynników transkrypcyjnych ETS1, SREBF1, PPAR γ i CREB1 biorących udział w regulacji syntezy kwasów tłuszczowych i białek związanych z adipogenezą.

Lipodystrofia powodowana przez inhibitory proteaz może wynikać z hamowania aktywności proteasomów. W rezultacie dochodzi do akumulowania agregatów białkowych, stymulacji autofagii lub apoptozy komórek. Podczas inicjacji autofagii rekrutowane są lipidy z różnych organelli do formowania autofagosomu. SQV powodował wzrost ilości PI i PE w komórkach, lipidów uczestniczących w tworzeniu autofagosomu. Powstawanie izolowanych błon autofagosomu z fragmentów błon ER zależy od ilości w komórce PI, z fragmentów błon mitochondrium wydaje się być zależnym od ilości PE. Uzyskane wyniki wskazywały na aktywację autofagii przez SQV w zróżnicowanych komórkach Chub-S7 przez wpływ na wzrost ekspresji białek biorących udział w różnych etapach autofagii i nasilenie ich aktywności. Wyniki z mikromacierzy ekspresyjnych potwierdzono testem biologicznym. Aktywacja autofagii prowadzi do rozpadu TG zgromadzonych w LD. Mitofagia, czyli usuwanie uszkodzonych mitochondriów, jako odmiana autofagii, była również indukowana w odpowiedzi adaptacyjnej na wywołany przez SQV stres w komórce. Zmniejszenie ilości mitochondriów pozwala ograniczyć wytwarzanie reaktywnych form tlenu w mitochondriach. Obserwowane zmiany w poziomie ekspresji genów białek mitochondrialnych są często uznawane jako miara usuwania mitochondriów na drodze mitofagii. SQV stymulował różne rodzaje autofagii: nie tylko lipofagię jako degradację lipidów zdeponowanych w LD, ale także mitofagię.

Wcześniejsze doniesienia wykazywały, że SQV jak i inne leki antyretrowirusowe mogą wywoływać zaburzenia lipidowe, wzrost insulinooporności i hamowanie wydzielania insuliny. Uzyskane wyniki nie wykazały wpływu SQV na ekspresję genów białek uczestniczących w szlaku

receptora insuliny w adipocytach. Stwierdzono jednak znaczne obniżenie ekspresji genu dla transportera glukozy GLUT4. Obserwowana aktywacja szlaku NFκB, synteza ceramidów, obniżony poziom ekspresji GLUT4, lipoliza lipidów zdeponowanych w LD powodująca podwyższenie poziomu wolnych kwasów tłuszczowych uwalnianych przez komórki może indukować insulinooporność adipocytów i innych tkanek.

Wstępna analiza wpływu SQV na ekspresję miRNA w zróżnicowanych adipocytach wykazała wzrost ekspresji miR-100-3p, miR-222-5p, miR-483-5p. Obecność tych rodzajów miRNA została stwierdzona w surowicy pacjentów z otyłością i insulinoopornością.

Dodatkowo stymulowany przez SQV miR-483-5p nasila transkrypcję genu insuliny i sekrecję insuliny, miR-222-5p aktywuje lipolizę w tkance tłuszczowej, natomiast miR-100-3p hamuje szlak mTOR, a przez to chroni komórki przed apoptozą aktywując autofagię.

Stwierdzono, że SQV hamował ekspresję genów związanych z różnicowaniem adipocytów i powstawaniem kropli lipidowych. Poprzez hamowanie aktywności komórkowych proteaz aktywował autofagię prowadząc do usuwania lipidów zdeponowanych w LD. Dodatkowo SQV stymulował ekspresję miRNA, które aktywują autofagię i nasilają insulinooporność.

Otrzymane wyniki pozwoliły na poznanie mechanizmów różnicowania komórek tkanki tłuszczowej, na skorelowanie zachodzących w komórce procesów z ekspresją genów i zmianami w strukturze lipidów. Możliwe to było dzięki poznaniu nowych technik badawczych tj. mikromacierzy ekspresyjnych, spektroskopii mas, jak również możliwości opracowania bioinformatycznego otrzymanych wyników.

Wnioski

Badania przeprowadzone w ramach niniejszego przewodu habilitacyjnego pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. W warunkach *in vitro* dodawany "proadipogenne" czynniki, naśladujące nadmiar składników odżywczych dostarczanych do organizmu z dietą pobudza różnicowanie komórek preadipocytów co skutkuje gromadzeniem w LD nadmiaru dostarczonej energii w postaci wysokoenergetycznych związków – lipidów/triglicerydów oraz zwiększeniem ekspresji białek PAT- związanych z LD, aktywuje ekspresję genów czynników transkrypcyjnych regulujących proces różnicowania komórek SVF do adipocytów oraz genów markerów różnicowania adipocytów, nasila ekspresję genów enzymów biorących udział w syntezie kwasów tłuszczowych i diacylogliceroli, białek szlaku NFκB, genów prozapalnych cytokin, chemokin i ich receptorów.
2. Warunki proadipogenne stymulują syntezę kwasów tłuszczowych *de novo* powodując zwiększenie ilości nasyconych i jednonienasyconych 16-18 węglowych kwasów tłuszczowych

natomiast zmniejsza się w trakcie różnicowania ilość długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

3. Warunki proadipogenne nasilają ekspresję genów enzymów uczestniczących w produkcji eikozanoidów, co prowadzi do biosyntezy z długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie z AA, proadipogennych i prozapalnych pochodnych.
4. Obecność EPA w trakcie różnicowania komórek osłabia różnicowanie preadipocytów, nie wpływała na ekspresję genów związanych z różnicowaniem, zastępuje AA w strukturze fosfolipidów; powoduje, że enzymy syntetyzujące eikozanoidy produkują pochodne EPA o słabszym działaniu prozapalnym a nawet przeciwzapalnym.
5. Trzymiesięczna suplementacja kwasami tłuszczowymi EPA i DHA kobiet z otyłością powoduje zmniejszenie stężenia TG, insuliny markerów prozapalnych, czemu towarzyszy znaczne podwyższenie stężenia przeciwzapalnych pochodnych DHA rezolwiny D1, rezolwiny D2, protektyny X oraz zwiększenie ekspresji genu receptora dla lipoksyn i rezolwin.
6. Suplementacja EPA i DHA powoduje wzrost ekspresji genów związanych z aktywacją stresu ER poprzez kinazę PERK prowadzącą do aktywacji autofagii oraz czynnika transkrypcyjnego NRF2 co skutkuje nasiloną ekspresją enzymów antyoksydacyjnych, zaangażowanych w syntezę *de novo* ceramidów, plazmalogenów, kardiolipiny i kwasu fosfatydowego. Obecność EPA i DHA nasila ekspresję genów enzymów zależnych od aktywacji PPAR-alfa, a związanych z katabolizmem kwasów tłuszczowych.
7. Saquinawir w hamuje powstawanie LD, ekspresję genów białek PAT, markerów adipogenezy oraz enzymów zaangażowanych w metabolizm kwasów tłuszczowych. SQV poprzez nasilenie stresu oksydacyjnego stymuluje autofagię, lipolizę i ostatecznie prowadzi do redukcji masy tkanki tłuszczowej jak również aktywuje ekspresję miRNA prowadzących do rozwoju insulinooporności.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Prowadzone przeze mnie badania naukowe z wykorzystaniem wysokoprzepustowych metod tj. hybrydyzacja oligonukleotydowa, lipidomika czy metabolomika dotyczyły wpływu suplementów diety na angiogenezę i adipogenezę procesy istotne w patomechanizmie chorób tj. otyłość, miażdżyca, zespół metaboliczny, lipodystrofia.

Uczestnicząc w szkoleniach w ramach projektu NUGO miałam możliwość nauczenia się i zastosowania udostępnionego oprogramowania GenMapp, PathFinder, TRANSFAC, Ingenuity Pathway, METACOR, R, GENOMATICS, PathVisio do analizy wyników „OMICS”. Dalsze

szkolenia umożliwiły mi zastosowanie w analizie danych z macierzy ekspresyjnych i CGH programów GeneSpring, WorkBench i Cytoscape.

Korelowanie wyników technik OMICS pozwoliło mi na analizę szeroko pojętej problematyki molekularnych mechanizmów regulujących m.in. procesy wewnątrzkomórkowe ważne dla przebudowy tkanki tłuszczowej.

Uczestniczyłam w realizacji szeregu projektów UE FW5/6/7 realizowanych w Katedrze Biochemii Klinicznej na Wydziale Lekarskim UJCM, takich jak:

1. 5th Framework Programme QLRT-CT-2001-00183, 2002- 2005, **DLARFID**, “Dietary Lipids as Risk Factors in Development. Mechanistic Issues”
2. 5th Framework Programme QLK3-CT-2002-30307, 2003-2006, **STEC**, “Stem Cell Therapeutics Excellence Centre”
3. FP6-2002-FOOD–506360, 2004-2009, **NuGO**, “European Nutrigenomics Organisation - Linking genomics, nutrition and health research”
4. FP-6-2002-LIFESCIHEALTH–502988, 2004-2008, **SC&CR**, “Application and process optimization of stem cell products for myocardial repair”.
5. FP6-2002-FOOD–05944, 2004-2009, **LIPGENE**, “Diet genomics, and metabolic syndrome: and integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis“
6. PNR-F-104-AI-1/07, 2008-2010, **Polish Norwegian Research Grant**, „Ochrona przed zwyrodnieniem układu nerwowego: rola peptydów endogennych, L-argininy i kwasów tłuszczowych jako potencjalnych czynników modulujących czynność mitochondriów, zwiększających żywotność mózgu poddanego działaniu bodźców stresowych”
7. FP-7 202272, 2008-2012, **LIPIDOMIC-NET**, “Lipid droplets and lamellar bodies as dynamic organelles. Translation research towards human disease”
8. FP-7 244995, 2009-2015, **BIOCLAIMS**, “BIOmarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food”

oraz projektów KBN/NCN takich jak:

1. PBZ-Min-005/P04/2002/5, 2003-2007, „Konstrukcja nowych modeli badawczych z wykorzystaniem zwierząt modyfikowanych genetycznie. Badanie mechanizmów patologicznej angiogenezy w zespole metabolicznym u ludzi na modelu transgenicznych myszy.”
2. 2 P05A 142 30, 2006-2007, „Zaburzenie angiogenezy tkanki tłuszczowej w wyniku niedoboru aktywności śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS-/-) jako możliwa przyczyna zwiększonej toksyczności wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) i rozwoju insulinooporności w przebiegu zespołu metabolicznego”

3. N401 008 31/0143, 2007-2009, „Metylacja DNA jako mechanizm regulacji ekspresji genów komórek endotelialnych w angiogennej aktywności beta-karotenu i wybranych kwasów tłuszczowych”
4. N N523 415935, 2008 – 2011, „Identyfikacja oocyst *Cryptosporidium sp.* w wodzie metodą RFLP-PCR”
5. N N402 421683, 2009-2013, „Ocena rozwoju lipodystrofii i zaburzeń metabolicznych, oraz patomechanizmu odpowiedzialnego za ich występowanie w grupie chorych zakażonych HIV leczonych antyretrowirusowo”
6. N N523 748940, 2011-2013, „Wykrywanie pasożytniczych pierwotniaków z rodzajów *Giardia*, *Cryptosporidium* i *Toxoplasma* w wodzie za pomocą multipleks-PCR”.
7. 2011/02/A/NZ2/00022, 2011-2016, "DHA/EPA a zmiany w epigenomice komórek krwi jak i w poziomie specyficznego dla endotelium i komórek beta trzustki miRNA"

Realizując projekt DLARFID wykazałam, że beta-karoten (BC) nie wpływał na różnicowanie się komórek progenitorowych dla komórek śródbłonka naczyń (EPC) i komórek śródbłonka naczyń (HUVEC), natomiast stymulował migrację komórek w eksperymentach *in vitro*. Poprzez analizę miejsc przyłączenia czynników transkrypcyjnych w rejonie promotorów najbardziej regulowanych genów (mikromacierze ekspresyjne) wykazałam rolę dwóch czynników transkrypcyjnych EGR1 i MEOX2. Hamowanie aktywności EGR1 i zwiększenie ekspresji MEOX2 prowadziło do stymulacji migracji komórek HUVEC. Natomiast w komórkach EPC BC poprzez MAD1L1 regulował oddziaływanie RB-p53-Myc-p21 co prowadziło do aktywacji migracji tych komórek. BC nasilał ekspresję genów uczestniczących w szlaku białek G. Aktywacja szlaku białek G, w szczególności G-alfa 12/13, przez kinazę RhoA regulowała migrację EPC i HUVEC.

Badania na modelu *in vivo* wykazały, że aktywność BC jest związana nie z proliferacją komórek, ale z ochroną komórki przed apoptozą i stymulacją chemotaksji/homingu komórek EPC. Stwierdziłam poprzez analizę wyników macierzy ekspresyjnych aktywację ekspresji proangiogennych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, białek szlaku sygnałowego VEGF, receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) i ścieżki sygnałowej Ras/Rho, a także regulację małych GTPaz - regulatorów Ras/Rho potwierdziłam stosując różne typy mikromacierzy. Silna aktywacja genów zaangażowanych w chemotaksję potwierdziła wcześniej stwierdzone działanie biologiczne BC w modelu *in vitro*.

BC w fizjologicznym zakresie stężeń stwierdzonych w krwi ludzkiej był silnym aktywatorem chemotaksji wczesnych komórek progenitorowych śródbłonka, co towarzyszy indukcji ekspresji genów pośredniczących w adhezji komórek i homingu, ale nie końcowych markerów różnicowania śródbłonka.

Kolejnym etapem prac były badania dotyczące mechanizmów patologicznej angiogenezy w zespole metabolicznym na modelu zwierząt transgenicznych realizowanym w ramach dwóch projektów (2 P05A 142 30, PBZ-Min-005/P04/2002).

Badania były prowadzone na modelach zwierząt transgenicznych imitujących ludzki zespół metaboliczny (NZO, eNOS $-/-$, DDAH1G, RXR α $-/-$ w hepatocytach).

Myszy z eNOS $-/-$ na diecie wysokotłuszczowej w przeciwieństwie do myszy DDAH knock-in wykazywały wysoki poziom cholesterolu, hiperleptynemię, hiperglikemię i hiperinsulinemię (oporność na insulinę), co sugerowało lipotoksyczność stosowanej diety. W warunkach "stresu żywieniowego" tj. diety wysokotłuszczowej defekt genetyczny skutkowało znacznie większą podatnością tych zwierząt na rozwój oporności na insulinę. Główną stwierdzoną przeze mnie różnicą w analizie zmian ekspresji genów (z użyciem mikromacierzy ekspresyjnych) w tkance tłuszczowej myszy z niską (NOS $-/-$) i wysoką biodostępnością NO (DDAH1G) był wzrost ekspresji markerów związanych z adipogenezą i biorących udział w syntezie kwasów tłuszczowych i triglicerydów a obniżenie ekspresji genów związanych z angiogenezą w białej tkance tłuszczowej.

U myszy z wyłączonym genem RXR α w hepatocytach ze stwierdzoną normoinsulinemią, hiperleptynemią insulina, a nie proangiogenna leptyna była kluczowym czynnikiem odgrywającym rolę w patologicznej angiogenezie. Analizując ekspresję genów z użyciem mikromacierzy w komórkach, które wmigrowały do wstrzykniętego podskórnie macierze u myszy z wyłączonym genem RXR α w wątrobie pod wpływem diety wysokotłuszczowej wykazałam zahamowanie ekspresji kluczowych dla angiogenezy genów oraz aktywację genów związanych ze wstępnym etapem różnicowania się komórek w kierunku adipocytów, wzrost ekspresji genów proapoptotycznych i enzymów szlaku glikolizy. W wyniku upośledzonego metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych w wątrobie u myszy z delecją RXR α zwiększał się ich poziom w krążeniu co powodowało lipotoksyczność i prowadziło do aktywacji apoptozy, zużycia glukozy przez komórki jako głównego źródła energii i aktywacji adipogenezy, a w konsekwencji skutkowało upośledzoną angiogenezą.

U myszy NZO pod wpływem diety wysokotłuszczowej w komórkach biorących udział w angiogenezie w podanym podskórnie macierze stwierdziłam aktywację ekspresji genów związanych ze wstępnym etapem angiogenezy (wzrost ekspresji genów związanych z migracją, zahamowanie apoptozy, aktywacja genów związanych z adhezją i rearanżacją cytoszkieletu), co przejawiało się w nasilonej odpowiedzi angiogennej. U myszy NZO z otyłością, hiperleptynemią, hiperglikemią, insulinoopornością glukoza była czynnikiem predyktywnym patologicznej angiogenezy.

W ramach realizacji projektu LIPGENE analizowałam wpływ rodzaju diety na zmiany biochemicznych i antropomorficznych objawów zespołu metabolicznego u pacjentów o ustalonym polimorfizmie genów charakteryzujących zespół metaboliczny.

Realizując projekt SCCR analizowałam możliwości zastosowania w terapii komórek progenitorowych, które mogą różnicować się w specyficznych warunkach w różnych kierunkach.

Namnażanie komórek izolowanych z krwi obwodowej lub szpiku zróżnicowanych w kierunku komórek śródbłonka jest bardzo czasochłonne, żmudne, kosztowne i nie zawsze otrzymuje się dostateczną ilość tego typu komórek. Dlatego w tym projekcie celem było zbadanie możliwości wykorzystania progenitorowych komórek tkanki tłuszczowej – SVF jako potencjalnego źródła pozyskania komórek progenitorowych. Podanie takich komórek wstępnie ukierunkowanych pomogłoby pacjentom w regeneracji uszkodzonych tkanek. Dobierano warunki w modelu *in vitro*, w których komórki SVF będą różnicować się w kierunku komórek śródbłonka naczyń, adipocytów czy mięśni gładkich. Warunki proangiogenne hodowli sprzyjały proliferacji, migracji i stymulowały komórki SVF do tworzenia tubul w modelu angiogenezy *in vitro* a nawet w kokulturach tworzyły wspólnie struktury. Stwierdziłam w tych badaniach nasilenie ekspresji genów związanych z angiogenezą w komórkach SVF hodowanych 24 godziny w proangiogennym medium natomiast hamowanie ich ekspresji w medium proadipogennym.

Podjęto także badania, które miały na celu wykazanie zdolności komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej SVF do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów. Obserwowane zmiany fenotypu komórek w hodowli *in vitro* korelowały z ekspresją wybranych genów typowych dla mięśnia sercowego (nasilenie ekspresji mRNA genów swoistych dla kardiomiocytów dla czynników transkrypcyjnych: GATA-4, MEF2C i MYOD, białka strukturalnego cytoszkieletu MYL2, przedsionkowego peptydu natriuretyczny (ANP)). Zdolność do różnicowania do adipocytów w warunkach proadipogennych była wykorzystana w dalszych badaniach do analizy wpływu kwasów tłuszczowych omega-3 i SQV na adipogenezę przedstawioną jako "osiągnięcie naukowe".

W ramach współpracy z Politechniką Krakowską uczestniczyłam w realizacji dwóch projektów (N N523 415935, N N523 748940) w ramach, których opracowywałam techniki do wykrywania obecności cyst/oocyst pierwotniaków z rodzajów *Cryptosporidium*, *Giardia* i *Toxoplasma* w różnych próbkach środowiskowych.

W ramach projektów FW7 LIPIDOMIC-NET nr202272, BIOCLAIMS Nr. 244995, oraz MAESTRO NCN 2011/02/A/NZ2/00022 analizowałam wpływ kwasów tłuszczowych na różnicowanie adipocytów jak również ich rolę w procesie zapalnym w przebiegu chorób metabolicznych zarówno w modelu *in vitro* jak i w badaniach klinicznych w trakcie trzymiesięcznej suplementacji kwasami DHA i EPA osób z otyłością. W ramach projektu N N402 421683 analizowałam proces lipodystrofii jako skutek uboczny terapii saquinavirem obserwowany u osób zakażonych wirusem HIV w modelu *in vitro*. Wynikiem realizacji tych projektów jest cykl publikacji prezentowany jako „osiągnięcie naukowe” w niniejszym autoreferacie.

Dorobek naukowy.

Mój dorobek naukowy stanowi 43 prac oryginalnych oraz 11 prac poglądowych, o łącznym **IF** wynoszącym **78,803** (628 punktów KBN/MNiSW).

Jestem współautorem trzech rozdziałów w monografiach naukowych z dziedziny biochemii klinicznej i diagnostyki oraz inżynierii środowiska

Liczba cytowań: 650 (ISI Web of Science 1994-2017 z dnia 01-08-2017)

Współczynnik Hirscha: 12 (wg bazy Web of Science)

Ponadto mój dorobek uzupełnia 307 doniesień zjazdowych, w tym 210 na konferencjach międzynarodowych i 97 na konferencjach krajowych.

Nagrody i wyróżnienia.

1. **Zespołowa Nagroda Naukowa**, 30-01-1997, Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk za cykl prac "Próby wyjaśnienia promiażdżycowego działania hyperinsulinizmu"
2. **Zespołowa Nagroda Ministra**, 2-10-2006, Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego za współautorstwo cyklu prac pt.: „Badania nad wpływem beta karotenu i wybranych wolnych kwasów tłuszczowych na angiogenezę i karcynogenezę”
3. **Poster Prize Winner**, 12 -05- 2007, Międzynarodowe Towarzystwo Fizjologiczne, nagroda za plakat zjazdowy w ramach "International Workshop of the Physiological Society" 9-12.05 - 2007 Kraków

Inne rodzaje aktywności naukowej.

Przynależność do towarzystw naukowych

Należę Polskiego Towarzystwa Lipidologicznego

Kraków, dnia 5. 10. 2017

.....
Anna Polusz.....

Podpis kandydata

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie