

ZAŁĄCZNIK 3a

do wniosku z dnia 16. 04. 2019 r.
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT
w języku polskim

dr Monika Biniecka
Śląski Park Technologii Medycznych
Kardio-Med Silesia

Zabrze, 2019

1. Imię i Nazwisko

Monika Biniecka (z d. Gancarczyk)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Doktor nauk biologicznych: stopień uzyskany w 2005 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Hormonalna regulacja aromatyzacji w komórkach gonady męskiej in vivo i in vitro”

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Bilińska,

Recenzenci: Prof. dr hab. Maria Szołtys (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)

Prof. dr hab. Marian Tischner (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)

Magister biologii; stopień uzyskany w 2001 roku, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego; praca magisterska pt. Wpływ pożywki znad makrofagów jądrowych na obecność białka StAR w komórkach Leydiga nornicy rudej”

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Bilińska

Recenzent: Prof. dr hab. Maria Szołtys (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

08.2018 - nadal - zatrudnienie w Śląskim Parku Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia, Zabrze na stanowisku Kierownika Projektu Naukowego

06.2006 - 05.2018 – zatrudnienie w Centrum Badań i Leczenia Chorób Reumatycznych, Szpital Uniwersytecki im. Św. Wincentego w Dublinie, Irlandia (Centre for Arthritis and Rheumatic Diseases, Dublin Academic Medical Centre, St. Vincent's University Hospital and School of Medicine and Medical Science, University College Dublin) na stanowisku Post Doc (Senior Post-Doctoral Scientist)

10.2001 – 09.2005 – doktorantka w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego

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. 2017 r. poz. 1789)

4.a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Angiogeneza i bioenergetyka hipoksyjnej błony maziowej w chorobach zapalnych stawów”

4.b. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

1. Balogh E, Veale DJ, McGarry T, Orr C, Szekanecz Z, Ng CT, Fearon U, **Biniecka M**. 2018.

Oxidative stress impairs energy metabolism in primary cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 20: 95 (* corresponding author)

IF (2018): 4,269

punkty MNiSW: 40

Liczba cytowań: 4

2. **Biniecka M**, Canavan M, McGarry T, Gao W, McCormick J, Cregan S, Gallagher L, Smith T, Phelan JJ, Ryan J, O'Sullivan J, Ng CT, Veale DJ, Fearon U. 2016. Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 75: 2192-2200

IF (2016): 12,811

punkty MNiSW: 45

Liczba cytowań: 38

3. **Biniecka M**, Connolly M, Gao W, Ng CT, Balogh E, Gogarty M, Santos L, Murphy E, Brayden D, Veale DJ, Fearon U. 2014. Redox-mediated angiogenesis in the hypoxic joint of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol* 66: 3300-10

IF (2014): 7,764

punkty MNiSW: 45

Liczba cytowań: 19

4. **Biniecka M**, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, Veale DJ, Fearon U, O'Sullivan JN. 2011b. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 13: R121

IF (2011): 4,445

punkty MNiSW: 40

Liczba cytowań: 27

5. **Biniecka M**, Fox E, Gao W, Ng CT, Veale DJ, Fearon U, O'Sullivan J. 2011a. Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 63: 2172-82

IF (2011): 7,866

punkty MNiSW: 50

Liczba cytowań: 39

- ✓ 6. Biniecka M, Kennedy A, Fearon U, Ng CT, Veale DJ, O'Sullivan JN. 2010. Oxidative damage in synovial tissue is associated with in vivo hypoxic status in the arthritic joint. *Ann Rheum Dis* 69: 1172-8

IF (2010): 9,082

punkty MNiSW: 32

Liczba cytowań: 47

Summary IF prac stanowiących podstawę habilitacji: IF = 46,237

Summary punktacja MNiSW prac stanowiących podstawę habilitacji = 252

W sumie prace te były cytowane 174 razy (*Web of Science, dane na dzień 18.04.2019*)

Oświadczenia współautorów prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego, określające ich udział w każdej publikacji, która stanowi podstawę postępowania habilitacyjnego (zgodnie z § 12 ust. 3 Rozporządzenia z dnia 19 stycznia 2018 r.), są zawarte w Załączniku nr 5.

Wszystkie prace stanowiące cykl publikacji oryginalnych, powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych i stanowią wyniki projektów: (1) *Redox regulation of angiogenesis and innate immunity in inflammatory arthritis* finansowanego przez **Health Research Board Ireland** realizowanego w latach 2013 - 2017; (2) *Mitochondrial oxidative damage and dysfunction is an important mechanism which may mediate angiogenic and migrational processes in the inflammatory arthritic joint* finansowanego przez **MSD Newman Fellowship Ireland** realizowanego w latach 2010 - 2013 oraz (3) *The role of hypoxia and genomic instability in rheumatoid arthritis* finansowanego przez **Health Research Board Ireland** realizowanego w latach 2007 - 2010.

4.c. Omówienie celu naukowego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

W niniejszej części przedstawione zostały główne tezy oraz wyniki osiągnięcia naukowego zatytułowanego „**Angiogeneza i bioenergetyka hipoksyjnej błony maziowej w chorobach zapalnych stawów**”

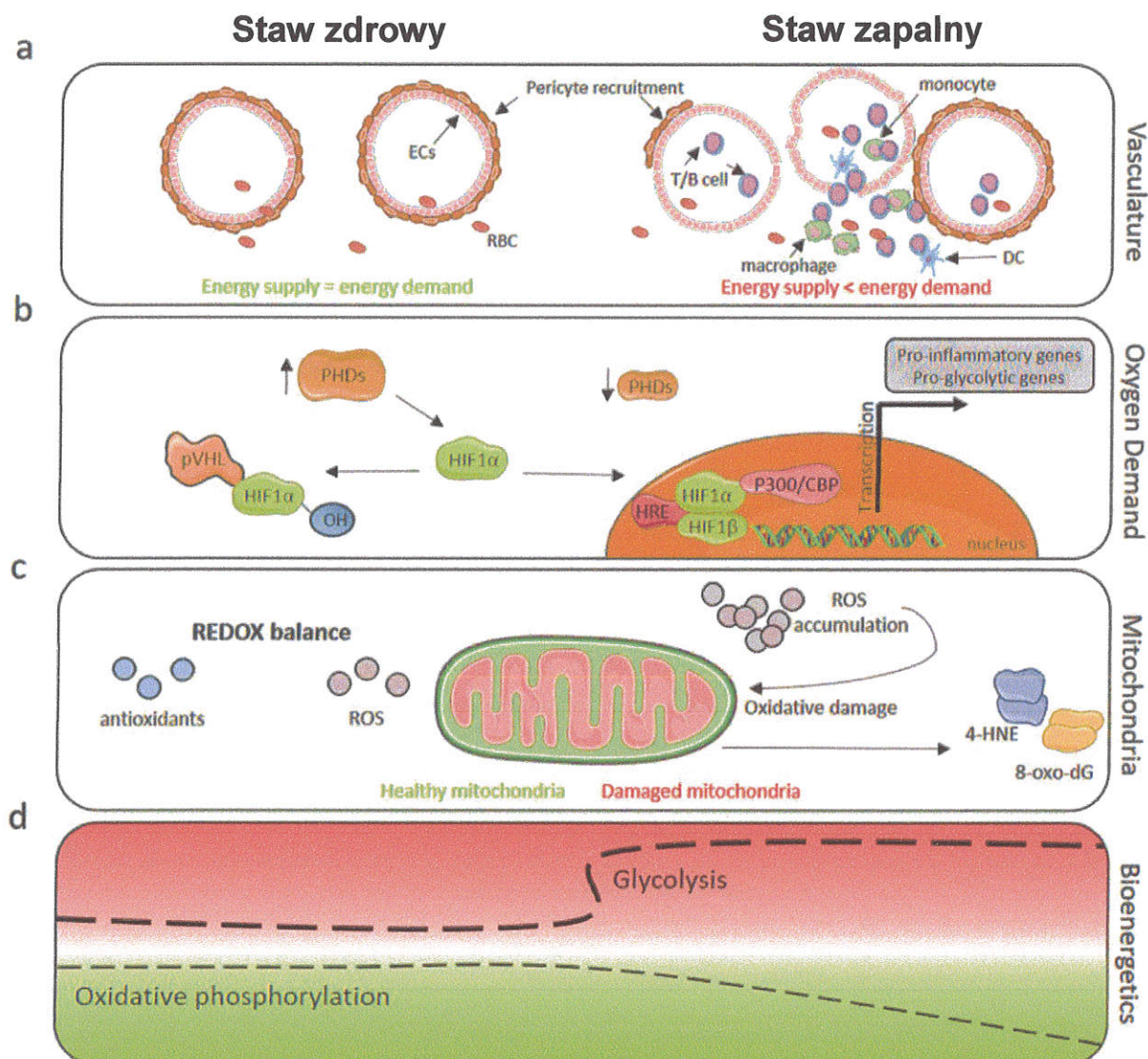
Pełna lista opublikowanych prac, osiągnięć naukowych oraz dane bibliometryczne zawarte zostały w Załączniku nr 2 (*Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki*).

Pozycje bibliograficzne stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego zaznaczono wytłuszczonym drukiem.

Najważniejsze wnioski osiągnięcia naukowego są następujące:

1. Choroby zapalne stawów charakteryzują się uszkodzoną strukturą unaczynienia błony maziowej, przez co ograniczony jest efektywny transport tlenu do stawu objętego chorobą. Wynikiem zaburzonego unaczynienia jest głębokie niedotlenienie tkanki maziowej – hipoksja – ze spadkiem poziomu tlenu do poziomu 0.46% (3.5 mmHg). Niedobór tlenu sprzyja uwalnianiu wolnych rodników tlenowych i powstaniu stresu oksydacyjnego, które to procesy dodatkowo wzmagają stan zapalny stawu (**Binińska et al. 2010**).
2. Prozapalne i niedotlenione środowisko błony maziowej skutkuje uszkodzeniem genomu mitochondrialnego. Wolne rodniki tlenowe uwalniane w warunkach hipoksji indukują mutacje mitochondrialnego DNA i zaburzają funkcje mitochondriów. Zastosowanie antyoksydantów i inhibitora hydroksylazy prolinowej ogranicza poziom uszkodzeń mitochondrialnych (**Binińska et al. 2011a**).
3. Wraz ze wzrostem niedoboru tlenu w błonie maziowej obserwuje się wyższy poziom mutacji mitochondrialnego DNA i stresu oksydacyjnego. Skuteczna terapia z zastosowaniem leków blokujących TNF- α obniża stopień uszkodzeń mitochondrialnych (**Binińska et al. 2011b**).
4. Podczas hipoksji błony maziowej ma miejsce aktywacja białka NOX-2. Z kolei, wolne rodniki tlenowe uwalniane podczas aktywacji białka NOX-2 nasilają angiogenezę stawu. Wskazuje to na ważną rolę stresu oksydacyjnego w regulacji funkcji komórek śródbłoka naczyń krwionośnych w stawie objętym procesem zapalnym (**Binińska et al. 2014**).
5. Wraz z pojawieniem się stanu zapalnego i niedotlenienia zmienia się metabolizm bioenergetyczny stawu. Komórki błony maziowej będące w stanie spoczynkowym „przełączają” metabolizm komórkowy na stan wysoce aktywny metabolicznie zapewniający szybką produkcję ATP. Powstała w wyniku tego procesu energia przyspiesza proliferację komórek błony maziowej oraz wzmacnia proces zapalny. To sugeruje, iż poprzez modyfikację przemian bioenergetycznych toczący się proces zapalny może zostać zahamowany (**Binińska et al. 2016**).
6. W odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie energetyczne stawu objętego zapaleniem i stresem oksydacyjnym obniża się wydajność procesu fosforylacji oksydacyjnej, a głównym źródłem ATP dla komórek błony maziowej staje się proces glikolizy. Powstały w ten sposób „kryzys bioenergetyczny” może wzmacniać nieprawidłową angiogenezę i zapalenie stawu. Zastosowanie inhibitorów TNF- α obniża poziom markerów angiogenezy (**Balogh et al. 2018**).

Graficzne przedstawienie głównych wniosków osiągnięcia naukowego



Rycina 1. Porównanie zdrowego stawu i stawu zajętego przez proces zapalny

Główne różnice w unaczynieniu (a), zapotrzebowaniu na tlen (b), funkcjach mitochondriów (c) i bioenergetyce (d) pomiędzy zdrowym stawem (strona lewa) i stawem objętym stanem zapalnym (strona prawa).

Rycina pochodzi z publikacji McGarry T, **Biniecka M**, Veale DJ, Fearon U. 2018. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med* 125: 15-24

Skróty: EC = endothelial cell (komórka śródbłonna), DC = dendritic cell (komórka dendrytyczna), PHD = prolyl hydroxylase (hydroksylaza prolinowa), VHL = von Hippel Lindau tumor suppressor protein (białko von Hippel-Lindau), ROS = reactive oxygen species (wolne rodniki tlenowe), 4-HNE = 4-hydroxynonenal, 8-oxo-dG = 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine.

Ogólne wprowadzenie i cel rozprawy habilitacyjnej

Podstawowym celem badań stanowiących osiągnięcie naukowe jest określenie roli niedotlenienia tkanki maziowej stawu (hipoksji) w przebiegu angiogenezy, stresu oksydacyjnego i przemian bioenergetycznych. Jako model badawczy użyłam fibroblastów i tkanki maziowej, które zostały pobrane od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów i łuszczykowym zapaleniem stawów.

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) i łuszczykowe zapalenie stawów (ŁZS) należą do chorób zapalnych błony maziowej, których częstość występowania szacuje się na około 2%. Reumatoidalne i łuszczykowe zapalenie stawów są przewlekłymi chorobami tkanki łącznej o podłożu autoimmunologicznym, charakteryzującymi się zapaleniem błony maziowej (*synovitis*) oraz postępującym procesem destrukcji chrząstki i kości stawowej, co w konsekwencji prowadzi do niepełnosprawności.

Błona maziowa jest miejscem, w którym inicjowana jest odpowiedź autoimmunologiczna. W zdrowym stawie błona maziowa zawiera od 1 do 3 warstw wyspecjalizowanych komórek zwanych synowiocytami. Tkanka błony maziowej podzielona jest na dwie oddzielne warstwy; warstwę wyściółkową i warstwę podwyściółkową. Warstwa wyściółkowa zawiera dwa typy komórek: synowiocyty o fenotypie makrofagów oraz synowiocyty o fenotypie fibroblastów. Poniżej znajduje się warstwa podwyściółkowa, zawierająca sieć naczyń krwionośnych osadzonych w macierzy tkanki łącznej. U chorych na RZS i ŁZS obserwuje się wzmożoną hiperplazję warstwy wyściółkowej. Z kolei w warstwie podwyściółkowej obserwuje się naciekanie komórek uczestniczących w reakcjach immunologicznych i w procesach zapalnych, takich jak limfocyty T, limfocyty B, komórki plazmatyczne, makrofagi, neutrofile, komórki tuczne, komórki NK i komórki dendrytyczne.

Wzmożona angiogeneza pojawia się na bardzo wczesnym etapie procesu zapalnego błony maziowej umożliwiając ciągły napływ komórek układu immunologicznego. Skutkiem tego jest wytworzenie inwazyjnej łuszczyki stawowej, która penetruje chrząstkę i wnika do kości podchrzęstnej prowadząc do całkowitego uszkodzenia stawu i niepełnosprawności (Szekanecz et al. 2010). Pomimo nasilonej angiogenezy, w hipertroficznej i aktywnej metabolicznie błonie maziowej utrzymuje się stan niedotlenienia. Wysokie zapotrzebowanie proliferujących komórek w konsekwencji prowadzi do hipoksji stawu, co w dalszym etapie skutkuje powstaniem stresu oksydacyjnego i zaburzeniem przemian energetycznych.

Hipoksją określa się stan niedoboru tlenu w stosunku do możliwości zaopatrzenia go ze strony układu krwionośnego, skutkujący „kryzysem bioenergetycznym”. Pierwsze obserwacje wskazujące na obecność hipoksji w błonie maziowej stawu objętego procesem zapalnym oparte były na pomiarach poziomu tlenu w jamie maziowej lub płynie maziowym, dowodząc podwyższonej aktywności metabolicznej stawu wraz ze zwiększonym metabolizmem glikolitycznym. W 1970 roku Lund-Olesen wykorzystując elektrodę tlenową Clarka wykazał istotnie niższy poziom tlenu w płynie maziowym pacjentów z RZS (26,53 mmHg) w porównaniu do pacjentów cierpiących na chorobę zwyrodnieniową stawów (42,92 mmHg) (Lund-Olesen 1970).

Stan niedotlenienia przejawia się zwiększonym uwalnianiem wolnych rodników tlenowych (WRT), przyczyniając się do powstania stresu oksydacyjnego uważanego za ważny czynnikiem prozapalny w chorobach stawów. Zwiększona produkcja wolnych rodników prowadzi do utleniania biocząsteczek, w tym DNA, lipidów i białek. Uszkodzenie DNA spowodowane utlenieniem skutkuje powstaniem promutagennych adduktów DNA, takich jak 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanina (8-okso-dG), jako wynik reakcji rodnika $\text{OH}^\cdot$ ze strukturą guaniny w DNA. Niedobór tlenu prowadzi także do wytworzenia pierwotnych produktów peroksydacji lipidów, które następnie ulegają rozkładowi tworząc reaktywne związki lipidowe, np. 4-hydroksynonenal (4-HNE) (McGarry et al. 2018).

Mitochondria to organella niezbędne do prawidłowego przebiegu m. in. metabolizmu energetycznego i procesów związanych z apoptozą komórki. Obecnie wiadomo, że wiele ludzkich chorób związanych jest z uszkodzeniem mitochondrialnego DNA (mtDNA) i zaburzonymi funkcjami mitochondriów. W RZS wraz z podwyższonym uwalnianiem WRT i stresem oksydacyjnym, niedotlenienie błony maziowej sprzyja uszkodzeniom funkcji mitochondriów i stabilności mitochondrialnego genomu, wynikiem czego jest obniżona fosforylacja oksydacyjna, spadek ATP oraz gromadzenie się mutacji mitochondrialnego DNA (Fearon et al. 2016).

Od początku XX wieku wiadomym było, że zaburzony metabolizm komórkowy pełni kluczowe znaczenie w rozwoju komórek nowotworowych. Jednakże dowody przemawiające za ważną rolą metabolizmu w regulacji procesu zapalnego pojawiły się dopiero w ostatniej dekadzie. Proliferacja i szybka aktywacja komórek odpornościowych obserwowana w trakcie zapalenia wymaga „przełączenia” metabolizmu komórkowego ze stanu spoczynkowego na stan wysoce aktywny metabolicznie. W warunkach normoksji (prawidłowego stężenia tlenu w komórkach i tkankach) jedna cząsteczka glukozy zostaje utleniana w procesie glikolizy,

wytwarzając dwie cząsteczki pirogronianu, który następnie zostaje włączony w cykl Krebsa, aby w procesie fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS) wytworzyć 36 cząsteczek ATP. W przypadku braku tlenu pirogronian nie zostaje włączony w cykl Krebsa, lecz w cytoplazmie pod wpływem dehydrogenazy mleczanowej (LDH) jest przekształcany w mleczan wytwarzając jedynie 2 cząsteczki ATP. Jednak takie przemiany metaboliczne mogą również występować w obecności tlenu, a proces ten jest znany jako „efekt Warburga”. Pomimo że glikoliza jest procesem o znacząco mniejszej wydajności pod względem produkcji ATP w porównaniu z fosforylacją oksydacyjną, w wyniku glikolizy ATP powstaje zdecydowanie szybciej, zapewniając wymaganą ilość energii aktywnie proliferującym komórkom błony maziowej stawu.

Podsumowując, celem moich badań było określenie wzajemnych oddziaływań pomiędzy stanem niedotlenienia, stresem oksydacyjnym, zaburzoną angiogenezą oraz metabolizmem energetycznym w RZS i ŁZS. Bliższe poznanie powyższych procesów może ułatwić zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za patogenezę i leczenia chorób zapalnych stawów.

Zależność pomiędzy niedotlenieniem błony maziowej a stresem oksydacyjnym w stawie objętym stanem zapalnym

W roku 2008 zespół badawczy, z którym pracowałam opracował nowatorską metodę bezpośredniego pomiaru poziomu tlenu (oxygen partial pressure = pO₂) w błonie maziowej podczas wykonywania zabiegu artroskopii kolana. Zastosowanie tej metody umożliwiło wykazanie, iż stawy pacjentów cierpiących na choroby zapalne są znacząco niedotlenione, a średni poziom tlenu błony maziowej wynosi 3,2% [zakres 0,46–7%]) (Ng et al 2010). Pomiaru pO₂ dokonano u 62 pacjentów z RZS i ŁZS przed rozpoczęciem leczenia farmakologicznego. Dodatkowo na grupie 25 pacjentów wykonano ponowny pomiar poziomu tlenu 3 miesiące po rozpoczęciu terapii lekami blokującym TNF- α . Aktywnie uczestniczyłam w większości wykonanych artroskopiach, rejestrując pomiar pO₂ stawu, wyjaśniając pacjentom potencjalne wyniki projektu badawczego oraz sposób w jaki przetwarzany będzie otrzymany od nich materiał biologiczny, obejmujący biopsje błony maziowej, płyn maziowy oraz krew.

Celem moich badań było określenie poziomu uszkodzeń DNA i lipidów w surowicy, płynie maziowym i tkance maziowej. Badałam także związek pomiędzy obserwowanymi uszkodzeniami w stosunku do poziomu hipoksji, aktywności choroby i angiogenezy. Wykazałam podwyższoną peroksydację lipidów wraz ze spadkiem utlenienia stawów, wyższą

aktywnością choroby i wzmożoną ekspresją markerów angiogenezy (Biniecka et al. 2010). Oznaczony stopień uszkodzeń DNA wyrażony poziomem 8-okso-dG nie był istotnie zależny od stanu niedotlenienia stawu (Biniecka et al. 2010), niemniej jednak 8-okso-dG może pośredniczyć w patogenezie chorób zapalnych stawów.

WRT są cząsteczkami sygnałowymi indukującymi peroksydację lipidów, a zatem pośredniczącymi w procesach zapalenia stawu i degradacji chrząstki. Wzmoczone utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wytwarza szereg pierwotnych produktów peroksydacji lipidów, które ulegają rozkładowi tworząc reaktywne związki lipidowe, spośród których 4-HNE jest uważany za kluczową cząsteczką sygnałową.

W swoich badaniach wykazałam obecność 4-HNE głównie w cytoplazmie komórek warstwy wyściółkowej oraz podwyściółkowej tkanki maziowej. Co ciekawe, nie stwierdziłam znaczących różnic w poziomie 4-HNE pomiędzy pacjentami z RZS a ŁZS, co wskazuje na zbliżony mechanizm powstawania stresu oksydacyjnego w obu badanych chorobach (Biniecka et al. 2010).

Wyniki moich badań po raz pierwszy dowiodły istotną zależność pomiędzy poziomem cytoplazmatycznego 4-HNE, prawdopodobnie odzwierciedlającego uszkodzenia mitochondrialne, a stopniem niedotlenienia tkanki maziowej, gdzie wraz ze wzrostem hipoksji wzrastała liczba komórek 4-HNE pozytywnych. W dalszym etapie badań wykazałam, że poziom peroksydacji lipidów w płynie maziowym stawu (ale nie w surowicy) istotnie koreluje z poziomami niedotlenienia. To sugeruje, iż zarówno hipoksja jak i peroksydacja lipidów mogą odbywać się na wczesnym etapie rozwoju choroby (Biniecka et al. 2010). Moje wnioski znajdują potwierdzenie w badaniach z wykorzystaniem zwierząt, w których opisano obecność i zależność pomiędzy hipoksją a stanem zapalnym błony maziowej już na wczesnym, przedklinicznym etapie RZS (Jeon et al. 2008).

Na podstawie moich wyników pokazujących istotną zależność między 4-HNE a hipoksją w płynie maziowym i tkance maziowej, wysunęłam hipotezę, że wysoki poziom WRT i 4-HNE jest wynikiem zaburzonych funkcji mitochondrialnych komórek stawu. 4-HNE może modyfikować strukturę biomolekuł, wśród których białka mitochondrialne związane z metabolizmem energetycznym są szczególnie podatne na inaktywację pod wpływem 4-HNE.

W oparciu o dostępną literaturę wiadomo, że WRT modulują przebieg angiogenezy przyspieszając proliferację, migrację i różnicowanie komórek śródbłonna oraz tworzenie struktur naczyniowo-podobnych (Wong 2017). Zarówno czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) jak i hipoksja zwiększają ekspresję angiopoetyny 2 (Ang2) w

komórkach śródbłonna, z kolei proces angiogenezy jest ściśle zależny od obecności VEGF i Ang 2 (Lobov et al. 2002). Co ciekawe, wykazany w moich badaniach związek między poziomem VEGF i Ang2 a peroksydacją lipidów, wskazuje dodatkowo na kluczową rolę hipoksji i stresu oksydacyjnego w regulacji angiogenezy (Biniecka et al. 2010), a zatem możliwe jest synergistyczne oddziaływanie pomiędzy VEGF/Ang2 a stresem oksydacyjnym prowadzące do wytworzeniu nowych naczyń krwionośnych.

Pomimo że rola metabolitów powstających w procesie peroksydacji lipidów błony maziowej stawu nie jest w pełni poznana, wykazano zależność między wysokim poziomem malonyloaldehydu (MDA) w osoczu pacjentów z RZS a spadkiem zdolności antyoksydacyjnych, jednakże obecność MDA nie korelowała z markerami aktywności choroby (Chaturvedi et al. 1999). Z kolei, wyniki moich badań jednoznacznie pokazały po raz pierwszy wyższą aktywność RZS wraz ze wzmożoną peroksydacją lipidów prowadzącą do powstania 4-HNE (Biniecka et al. 2010). Może to sugerować, iż po wpływie 4-HNE wzrasta immunogenność białek prowadząca do zapoczątkowania reakcji autoimmunologicznych.

Podsumowując, w tej części badań wykazałam obecność stresu oksydacyjnego w błonie maziowej stawów objętych procesem zapalnym. Hipoksja stawu prowadzi do uszkodzeń oksydacyjnych w warstwie wyściółkowej i podwyściółkowej błony maziowej i może zaburzać prawidłowe funkcje mitochondriów. Wraz ze spadkiem poziomu tlenu w błonie maziowej ma miejsce wzmożona peroksydacja lipidów, nasilenie aktywności choroby oraz wyższe uwalnianie markerów procesu angiogenezy.

Mutacje i dysfunkcje mitochondrialne w niedotlenionym i prozapalnym środowisku stawu

Obecnie wiadomo, że niedotlenienie w istotny sposób nasila toczący się stan zapalny, jednakże wpływ niedoboru tlenu w odniesieniu do uszkodzeń genomu mitochondrialnego w chorobach zapalnych stawów jest mniej zrozumiały.

DNA mitochondrialny jest niezmiernie podatny na uszkodzenia oksydacyjne. Stres oksydacyjny indukowany WRT może stanowić główne źródło niestabilności genomu mitochondrialnego prowadzące do uszkodzeń łańcucha oddechowego (Ott et al. 2007). Podobnie, peroksydacja lipidów może hamować metabolizm mitochondriów.

W swoich badaniach prowadziłam doświadczenia mające na celu ocenę poziomu i spektrum mutacji mtDNA w komórkach tkanki maziowej pacjentów z RZS i ŁZS. W

następnym etapie sprawdzałam, czy istnieje związek pomiędzy uszkodzeniami mitochondriów, hipoksją i stresem oksydacyjnym, a także wpływ antyoksydantów na powyższe procesy.

Punktowe mutacje mitochondrialnego DNA to losowe zmiany pojedynczej zasady, które opisane zostały w wielu chorobach ludzkich. Wykazano, iż istnieje związek między poziomem punktowymi mutacji mtDNA a spadkiem aktywności kompleksów łańcucha oddechowego w komórkach macierzystych krypty okrężnicy (Greaves et al. 2010). Mutacje mtDNA wykryto również u pacjentów z RZS, u których stwierdzono wyższą mutagenezę w synowocytach i tkance maziowej (Da Sylva et al. 2005). Jednak moje badania były pierwszymi które określiły częstość i spektrum losowych mutacji mitochondrialnych, które mogą być istotne w rozwoju chorób zapalnych stawów.

W celu określenia mutagenazy mtDNA w tkance maziowej, wykorzystałam najnowszy test umożliwiający pomiar losowych mutacji punktowych tzw. Random Mutation Capture assay. Ta ilościowa metoda oparta jest na wykonaniu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) umożliwiającej wykrycie mutacji w genie kodującym podjednostkę 12S rybosomalnego RNA (rRNA) (pz 1215–1218). Zmiana pojedynczej z par zasad w jednym z genów kodujących rRNA może upośledzać proces translacji białek łańcucha oddechowego które są kodowane przez mtDNA (Vermulst et al. 2008).

Wyniki moich badań jednoznacznie dowiodły, iż wraz ze wzrostem hipoksji stawu częstość występowania mutacji punktowych mtDNA i aktywność choroby są wyższe. Określając spektrum mutacji obserwowałam, że wykryte mutacje to głównie tranzycje, które należą do mutacji związanych ze stresem oksydacyjnym (Biniecka et al. 2011a). Jak wiadomo, hipoksja wzmacnia wytwarzania wolnych rodników, a moje wyniki wskazały na istnienie związku między poziomami WRT a częstością występowania uszkodzeń mtDNA. Pozostaje to w zgodzie z innymi publikacjami, w których za główne źródło mutagenazy mitochondrialnej także uznano wolne rodniki tlenowe (Shokolenko et al. 2009). Z kolei, obserwowana korelacja pomiędzy spadkiem poziomu tlenu a wzrostem aktywności choroby DAS28-CRP sugeruje, że nagromadzenie licznych mutacji mtDNA może w konsekwencji wzmacniać proces zapalny stawu.

Rezultaty przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały także, że wraz ze wzrostem częstości mutacji mtDNA proporcjonalnie zwiększa się liczba komórek 4-HNE pozytywnych w warstwie wyściółkowej oraz podwyściółkowej tkanki maziowej (Biniecka et al. 2011a), co wskazuje na jednoczesne występowanie uszkodzeń genomu mitochondrialnego i stresu oksydacyjnego. Powyższy wniosek jest zgodny z innymi badaniami, w których autorzy

obserwowali pozytywną korelację pomiędzy peroksydacją lipidów a delecjami mtDNA wraz z wiekiem komórek oraz mutacje mtDNA w komórkach nabłonkowych siatkówki oka poddanych działaniu oksydantów (Wei et al. 1996, Mambo et al. 2003).

W kolejnym etapie oznaczałam poziom punktowych mutacji mtDNA w fibroblastach błony maziowej, które hodowałam w środowisku 1% hipoksji. Analogicznie do warunków *in vivo*, 1% hipoksja indukowała mutagenezę i zaburzała funkcje mitochondriów, które wyraziłam wykonując pomiar uwalnianych WRT, markerów stresu oksydacyjnego i potencjału błony mitochondrialnej (Biniecka et al. 2011a). Otrzymane wyniki stanowiły dodatkowe potwierdzenie moich badań na poziomie tkanki maziowej oraz umocniły hipotezę przemawiającą za kluczową rolę stresu oksydacyjnego w indukowaniu uszkodzeń mtDNA.

W swoich badaniach sprawdzałam również czy możliwa jest naprawa uszkodzeń mtDNA i dysfunkcji mitochondrialnych powstałych na skutek stresu oksydacyjnego. W celu obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego wykorzystałam antyoksydanty takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i N-acetylocysteina (NAC). Wiadomo, że NAC poza działaniem antyoksydacyjnym może także modulować aktywację czynnika transkrypcji jądrowej (NF- κ B), a zatem regulować odpowiedź zapalną. Obserwowałam istotny spadek mutagenazy, stresu oksydacyjnego i uszkodzeń funkcji mitochondrialnych w fibroblastach błony maziowej które stymulowałam SOD i NAC (Biniecka et al. 2011a). Dodatkowo, fibroblasty hodowałam z dodatkiem dimetyloksalylglicyny (DMOG) – inhibitora hydroksylazy prolinowej (PHD). Zablockowanie enzymów hydroksylazy prolinowej umożliwiło aktywację czynnika indukowanego hipoksją 1 α (HIF-1 α), a zatem naśladowanie stanu niedotlenienia w warunkach *in vitro*. Analogicznie do SOD i NAC, DMOG obniżał uwalnianie WRT i uwalnianie markerów stresu oksydacyjnego wraz ze spadkiem mutacji mtDNA (Biniecka et al. 2011a). Uzyskane wyniki są zgodne z innymi doniesieniami literaturowymi, w których obserwowano spadek wydzielanych cytokin i komórek prozapalnych oraz mniejszy stres oksydacyjny w przebiegu nieswoistego zapalenia jelit (Cummins et al. 2008).

Reasumując, w powyżej opisanych badaniach wykazałam wzrost uszkodzeń mtDNA wraz ze spadkiem poziomu tlenu oraz wyższym stresem oksydacyjnym błony maziowej stawu. Podobnie, w warunkach *in vitro* hipoksja prowadzi do uszkodzeń funkcji mitochondrialnych, które mogą być spowolnione poprzez zastosowanie antyoksydantów i inhibitora hydroksylazy prolinowej.

Wpływ leków blokujących TNF- α na poziom stresu oksydacyjnego i uszkodzeń mtDNA w stawie objętym procesem zapalnym

Dokładne mechanizmy regulujące wzmożony naciek limfocytów do błony maziowej stawu nie są w pełni poznane, jednakże badania ostatnich lat dowodzą kluczowej rolę TNF- α w patogenezie RZS i ŁZS. TNF- α jest cytokiną prozapalną, która poprzez aktywację szlaku NF- κ B stymuluje uwalnianie innych mediatorów prozapalnych. Wiadomo także, że TNF- α może nasilać uwalnianie WRT przez mitochondria, a co się z tym wiąże, powstawanie metabolitów peroksydacji lipidów.

Leki „biologiczne” są to przeciwciała lub rozpuszczone cząsteczki wprowadzane do ustroju celem związania i neutralizacji czynników uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej lub w procesie zapalnym. W leczeniu RZS i ŁZS najczęściej stosuje się leki blokujące TNF- α , które stanowią grupę czynników o różnej budowie i właściwościach farmakokinetycznych. Wprowadzenie leków blokujących TNF- α znacząco zrewolucjonizowało sposób leczenia chorób zapalnych stawów, powodując ograniczenie zapalenia błony maziowej, zmniejszenie destrukcji chrząstki i kości stawowej, co w konsekwencji obniżyło niepełnosprawność pacjentów. Pomimo takich obiecujących rezultatów, dane kliniczne wskazują na niepowodzenie leczenia u około 40% pacjentów otrzymujących inhibitory TNF- α .

Wcześniejsze badania mojego zespołu dowiodły, że leki blokujące TNF- α znacząco podnoszą poziom tlenu w błonie maziowej stawu jedynie w grupie pacjentów klinicznie odpowiadających na leczenie (Kennedy et al. 2011). Obserwacje te skłoniły mnie do sprawdzenia czy leczenie z zastosowaniem inhibitorów TNF- α ma także wpływ na częstość mutacji mtDNA i poziom stresu oksydacyjnego.

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazały spadek poziomu 4-HNE u pacjentów, u których zarejestrowano wzrost tlenu w błonie maziowej po terapii blokującej TNF- α . Z kolei, w grupie pacjentów nie odpowiadających na leczenie u których nie wystąpiła zmiana poziomu tlenu, nie obserwowałam zmian w poziomie 4-HNE (Biniecka et al. 2011b). Zatem nasuwa się wniosek, iż spadek hipoksji błony maziowej skutkuje obniżeniem stresu oksydacyjnego stawu. Wniosek ten jest spójny z rezultatami innych badań, w których opisano osłabienie oksydacyjnych uszkodzeń DNA i lipidów po terapii inhibitorami TNF- α (Kageyama et al. 2008).

Jak wspomniałam wcześniej, obserwowałam dodatnią zależność pomiędzy poziomem 4-HNE błony maziowej a aktywnością choroby (DAS28-CRP) u pacjentów, którzy nie stosowali inhibitorów TNF- α (Biniecka et al. 2011a). Dlatego w kolejnych etapach badań oceniałam czy

inhibitory TNF- α zmieniają poziom 4-HNE. To pozwoliło mi wykazać pozytywną korelację między powstałym metabolitem peroksydacji lipidów a klinicznymi wskaźnikami aktywności choroby po podaniu leków blokujących TNF- α (Biniecka et al. 2011b).

Ponadto, w swoich badaniach sprawdzałam wzajemne oddziaływania pomiędzy stresem oksydacyjnym, procesem zapalnym i angiogenezą u pacjentów poddanych terapii inhibitorami TNF- α . Wraz ze spadkiem poziomu hipoksji i stresu oksydacyjnego błony maziowej obserwowałam mniejszy naciek limfocytów T, limfocytów B, makrofagów oraz liczbę tworzących się nowych naczyń krwionośnych (Biniecka et al. 2011b). Powyższe rezultaty potwierdzają badania innych opisujące podniesioną ekspresję cyklooksygenazy-2 (COX-2) i uwalnianie prostaglandyny E przez ludzkie chondrocyty stymulowane 4-HNE (Shi et al. 2006). Z kolei, 4-HNE stymulowało uwalnianie VEGF w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (Ruef et al. 1997).

Jak wspomniałam powyżej, zwiększone uwalnianie WRT w miejscu przebiegającego procesu zapalnego może wzmacniać częstość mutacji mtDNA. Zjawisko to jest szczególnie widoczne w błonie maziowej stawów pacjentów z RZS i ŁZS na skutek przewlekłego stanu zapalnego. Wcześniej wyniki moich badań przeprowadzone na grupie pacjentów nie leczonych inhibitorami TNF- α wskazały, iż stan hipoksji błony maziowej znacząco wpływa na poziom mutagenyzy mitochondrialnego genomu, stres oksydacyjny oraz aktywność choroby (Biniecka et al. 2011a). W związku z tym, kolejny etap badań stanowiło ustalenie wpływu leków blokujących TNF- α na częstość mutacji mtDNA i wskaźnik aktywności choroby DAS28-CRP. Na podstawie uzyskanych danych wykazałam znaczny spadek uszkodzeń mtDNA oraz wskaźnika aktywności choroby jedynie u pacjentów, u których terapia obniżała niedotlenienie stawu. Przeciwnie, niepowodzenie leczenia i związany z tym wzrost niedotlenienia, nie zmieniały poziomu oznaczanych parametrów (Biniecka et al. 2011b), co pozostaje w zgodzie z badaniami opisującymi spadek integralności mtDNA w środowisku stresu oksydacyjnego (Kim et al. 2010).

Podsumowując, wyniki moich badań po raz pierwszy wskazały, iż obniżenie poziomu TNF- α zmienia stopień uszkodzeń genomu mitochondrialnego i wartość wskaźnika aktywności choroby w stawie objętym stanem zapalnym. Może to sugerować kluczową rolę mitochondriów w regulacji mechanizmów warunkujących pozytywną lub negatywną odpowiedź na leki biologiczne, a to z kolei może w przyszłości mieć duże znaczenie kliniczne.

Hipoksja regulatorem NOX-2 i angiogenezy w prozapalnym środowisku stawów

Badania ostatnich lat wskazują, iż procesy zapalne oraz angiogenezy przebiegające w stawie chorych na RAZ i ŁZS są ze sobą ściśle powiązane (Kennedy et al. 2010, Ng et al. 2010). Zaburzenie angiogenezy uwidaczniające się na bardzo wczesnym etapie zapalenia stawów, umożliwia nieprzerwany napływ makrofagów, limfocytów T, limfocytów B i komórek plazmatycznych do błony maziowej. Dodatkowo, hipoksja i stres oksydacyjny mogą pośredniczyć w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych, co zostało poparte badaniami pokazującymi regulację przebiegu angiogenezy przez WRT w sposób zależny oraz niezależny od VEGF (Colavitti et al. 2002, West et al. 2010).

Mitochondrialny łańcuch oddechowy jest głównym miejscem produkcji WRT w komórce. W dużo mniejszym stopniu WRT są produkowane w pozamitochondrialnych strukturach, np. przy udziale enzymu z rodziny oksydazy NADPH (NOX). Enzym ten składa się z dwóch elementów połączonych z błoną (gp91phox i p22phox) i trzech elementów w cytosolu (p47phox, p67phox, p40phox). Dodatkowo, w skład oksydazy wchodzi małe białko rac1 lub rac2. Zidentyfikowano siedem różnych izoform tego enzymu, z czego cztery (NOX1, NOX2, NOX4 i NOX5) są powszechnie obecne w komórkach ściany naczynia, a uwalniane przez nie WRT indukują proliferację, różnicowanie i migrację komórek śródbłoka, przez co stymulują angiogenezę (Frey et al. 2009).

W moich badaniach skupiałam się nad określeniem roli izoformy NOX2, która występuje głównie w komórkach fagocytyzujących, gdzie odpowiada za wybuch tlenowy. Ponadto występuje w śródbłonku, komórkach mięśni gładkich i fibroblastach. Wysoką aktywność NOX-2 przyczyniającą się do powstania stresu oksydacyjnego wykazano wcześniej w stawie chorych na RZS, jednak nie ustalono związku pomiędzy NOX-2 a hipoksją, angiogenezą i stosowaniem inhibitorów TNF- α .

Wykorzystując myszy model imitujący RZS [(CIA collagen induced arthritis (CIA))] obserwowałam wyższy poziom NOX-2 w błonie maziowej myszy CIA w porównaniu z błoną maziową pochodzącą od myszy dzikich. Co ciekawe, wysoka obecność NOX-2 związana była z nasiloną waskularyzacją i zapaleniem stawów, a wykazanie w obrębie tych samych komórek obecności NOX-2, markerów angiogenezy (VEGF, Ang-2, czynnikiem von Willebranda) i NF- κ B znacząco wzmocniło moją hipotezę sugerującą istotną rolę stresu oksydacyjnego w przebiegu angiogenezy w RZS (Biniecka et al. 2014). Moje obserwacje są także zgodne z badaniami, w których zanotowano spadek tworzących się nowych naczyń krwionośnych u

myszy typu dzikiego po podaniu antyoksydantów oraz u myszy z podwójnym nokautem genu NOX-2 (NOX-2^{-/-}) (Colavitti et al. 2002).

W dalszym etapie badań wykazałam wzrost aktywności NOX-2 w komórkach monojądrzastych krwi obwodowej wraz ze spadkiem poziomu tlenu błony maziowej pacjentów z RZS (Biniecka et al. 2014). Na podstawie dostępnej literatury nie można jednoznacznie określić czy odnotowane nasilenie aktywności NOX-2 jest wynikiem lokalnej hipoksji stawu czy też ogólnoustrojowego procesu zapalnego. Wiadomo jednak, że komórki jednojądrzaste krwi nieustannie krążą po organizmie docierając do tkanek objętych stanem zapalnym i hipoksją, jak to ma miejsce w RZS. Niektóre z tych komórek mogą pozostać w błonie maziowej, zaś inne naczyniami układu limfatycznego mogą powrócić do krążenia obwodowego.

Analizując regulację NOX-2 u pacjentów leczonych inhibitorami TNF- α zaobserwowałam malejącą aktywność tego enzymu wraz ze wzrostem stężenia tlenu oraz spadkiem waskularyzacji błony maziowej u chorych pozytywnie odpowiadających na terapię (Biniecka et al. 2014). Podobna zależność pomiędzy hipoksją a NOX-2 została udokumentowana w ludzkich synowiocytach izolowanych od pacjentów z RZS (Chenevier-Gobeaux et al. 2012).

W kolejnym etapie badań nad rolą NOX-2 w regulacji angiogenezy wykorzystałam komórki śródbłónka i eksplanty błony maziowej, które hodowałam z dodatkiem czynników aktywujących NOX-2 (4-HNE i TNF- α) oraz blokujących NOX-2 (DPI i siRNA). Zastosowane warunki hodowlane wykazały, iż wyższej aktywności NOX-2 towarzyszy nasilona migracja komórek śródbłónka i wydzielanie czynników angiogennych oraz wzrost liczby powstających struktur naczyniowo-podobnych, zdarzenia, które zostały spowolnione pod wpływem DPI i siRNA (Biniecka et al. 2014). Dodatkowo, oceniałam rolę hipoksji w regulacji aktywności NOX-2 w warunkach in vitro. Zgodnie z moimi wynikami in vivo, obniżony poziom tlenu wzmacniał aktywność angiogenną komórek śródbłónka (Biniecka et al. 2014).

Podsumowując, wykazałam zwiększoną aktywność NOX-2 w ludzkiej i mysiej błonie maziowej stawów objętych procesem zapalnym. Co ciekawe, poziom NOX-2 był istotnie wyższy u pacjentów, u których zanotowano znaczącą hipoksję (pO₂ <3%) i spadał w grupie chorych pozytywnie odpowiadających na leczenie lekami blokującymi TNF- α . W zastosowanych warunkach in vitro 4-HNE, TNF- α i hipoksja podnosiły aktywność NOX-2 stymulując proangiogenną odpowiedź komórek śródbłónka.

Metabolizm energetyczny regulatorem procesu zapalnego i angiogenezy komórek błony maziowej w reumatoidalnym zapaleniu stawów

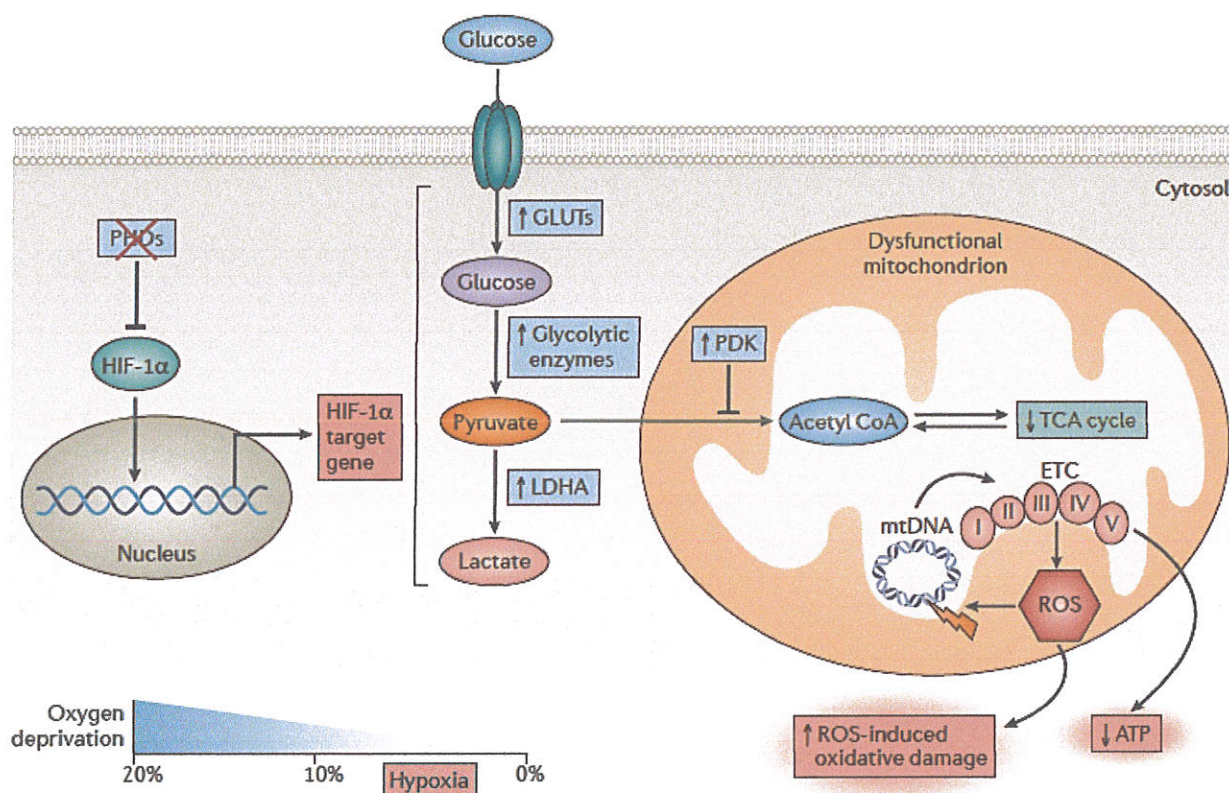
Od dawna wiadomym było, że wspólną cechą wielu nowotworów jest zdolność wytwarzania dużych ilości mleczanu w warunkach dostępności tlenu - zjawisko nazywane efektem Warburga. Badania ostatnich kilku lat wskazują, iż zjawisko to występuje także w komórkach uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej (McGarry i Fearon 2019). Zwiększona proliferacja i gwałtowna aktywacja komórek odpornościowych wymaga zmiany stanu metabolizmu energetycznego ze spoczynkowego na wysoce aktywny metabolicznie, aby umożliwić komórkom przeżycie, wzrost czy proliferację w warunkach różnej dostępności tlenu i składników odżywczych.

W obecności tlenu, powstający w procesie glikolizy pirogronian jest transportowany do mitochondrium, gdzie ulega dalszym przemianom. Powstaje octan, który łączy się z koenzymem A, tworząc acetylo-CoA, wchodzący w cykl skomplikowanych reakcji enzymatycznych cyklu Krebsa. Z kolei, w warunkach hipoksji ma miejsce stabilizacja aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF-1, który pobudza glikolizę przez aktywację transkrypcji genów transporterów glukozy (GLUTs) i enzymów glikolizy, z jednoczesnym hamowaniem mitochondrialnego metabolizmu pirogronianu w zamian za przekształcenie pirogronianu w mleczan przy udziale dehydrogenazy mleczanowej A. Dodatkowo, stan hipoksja sprzyja powstawaniu WRT, których obecność uszkadza funkcje łańcucha oddechowego mitochondrów (**Rycina 2**).

Pomimo że glikoliza jest niewydajna energetycznie, gdyż prowadzi do powstania jedynie dwóch cząsteczek ATP z jednej cząsteczki glukozy (dla porównania w przypadku mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej zysk wynosi 36 cząsteczek ATP), komórki układu immunologicznego preferują glikolizę jako główne źródło energii. Przyczyna rezygnacji z oddychania mitochondrialnego na korzyść glikolizy wciąż jest nieznana, jednak wydaje się, że glikoliza jest znacznie efektywniejsza, ponieważ produkcja ATP tą drogą jest szybsza niż w przypadku fosforylacji oksydacyjnej. Obecne badania nad metabolizmem komórek immunologicznych sugerują, że zysk „efektu Warburga” nie ogranicza się jedynie do produkcji ATP, lecz umożliwia dostarczenie metabolitów, które mogą być wykorzystane do reakcji biosyntetycznych, podtrzymania funkcji życiowych oraz zmiany sygnalizacji komórkowej.

Proces przeprogramowania metabolicznego z energii uzyskiwanej drogą fosforylacji oksydacyjnej na ścieżkę glikolizy został udokumentowany w licznych chorobach immunologicznych (Fearon et al. 2016, McGarry et al. 2018). U pacjentów z RZS wykazano

zwiększoną aktywność dehydrogenazy mleczanowej w błonie maziowej, a podwyższona zawartość mleczanu była związana ze spadkiem poziomu glukozy w płynie maziowym. Ponadto, stopień kwasicy mleczanowej był wyższy wraz z nasileniem stanu zapalnego stawu. Co ciekawe, kwasica mleczanowa może indukować mutacje jednocześnie osłabiając mechanizmy naprawcze DNA, prowadząc do genetycznych zaburzeń komórek wraz z upośledzeniem ich apoptozy.



Rycina 2. Hipoksja i dysfunkcje mitochondrialne

Rycina pochodzi z publikacji Fearon U, Canavan M, Biniecka M, Veale DJ. 2016. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12: 385-97

Uważa się także, że w RZS proces przeprogramowania metabolicznego i wysoka kwasica mleczanowa mogą sprzyjać powstaniu inwazyjnego fenotypu fibroblastów błony maziowej i zaburzeniu ekspresji p53 (Fearon et al. 2016).

W oparciu o dane literaturowe przemawiające za ważną rolą przemian bioenergetycznych w regulacji odpowiedzi immunologicznej komórek błony maziowej w środowisku stanu zapalnego, w kolejnym etapie moich badań oceniałam zmiany metabolizmu energetycznego komórek stawu pod wpływem lokalnego niedotlenienia.

W celu odwzorowania stanu hipoksji w warunkach *in vitro*, fibroblasty błony maziowej uzyskane od pacjentów z RZS stymulowałam dimetyloksaliloglicyną (DMOG), co pozwoliło na aktywację HIF-1 α . DMOG zwiększał częstość punktowych mutacji mtDNA i zaburzał funkcje mitochondrialne (Biniecka et al. 2016), co potwierdzają inne badania z wykorzystaniem komórek jednojądrzastych krwi obwodowej i tkanki maziowej (Kennedy et al. 2010, Harty et al. 2012).

Aby wykazać, czy obserwowane dysfunkcje mitochondriów mogą mieć związek ze zmianami bioenergetycznymi, wykorzystałam analizator metaboliczny XF Seahorse, przy pomocy którego określiłam wartości głównych szlaków energetycznych - fosforylacji oksydacyjnej i glikolizy. Otrzymane rezultaty wykazały znaczącą zmianę metabolizmu energetycznego przejawiającą się spadkiem uwalnianego ATP na korzyść wyższej produkcji mleczanu, gdzie wyższej glikolizie towarzyszyło osłabienie oddychania mitochondrialnego. Z kolei, stymulując fibroblasty kwasem mlekowym obserwowałam wzmożoną inwazyjność tych komórek z jednocześnie zwiększonym wydzielaniem czynnika wzrostu fibroblastów FGF (Biniecka et al. 2016). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że przeprogramowanie fibroblastów na korzyść glikolizy zapewnia szybkie wytwarzanie ATP, a wraz z tym inwazyjność komórek.

Zależność pomiędzy hipoksją a bioenergetyką badałam również na poziomie tkanki maziowej, wykazując mniej komórek pozytywnych na obecność białka ATP5B u pacjentów z poziomem tlenu $pO_2 < 3\%$ w porównaniu do tych z poziomem tlenu $> 3\%$. Równocześnie, więcej komórek pozytywnych na obecność markerów glikolizy GAPDH, PKM2 i GLUT1 pojawiło się przy większym niedotlenieniu stawu, co dodatkowo potwierdziło preferowaną przez komórki błony maziowej drogę glikolizy w warunkach hipoksji (Biniecka et al. 2016).

Interesującym wydało mi się sprawdzenie, czy zablokowanie przemian glikolitycznych osłabi prozapalne mechanizmy stawu. W tym celu fibroblasty i komórki śródbłónka hodowałam z dodatkiem 3PO – związku, który przenika przez błonę komórkową i zmniejszając ekspresję fosfofruktokinazy 1 (PFK1) zmniejsza proces glikolizy. Obserwowałam, że wraz ze spadkiem glikolizy osłabiły się zdolności migracyjne i inwazyjne fibroblastów, angiogeneza komórek śródbłónka, a poziomy uwalnianych cytokin prozapalnych były istotnie niższe. Co ciekawe, 3PO obniżał także aktywność kluczowych czynników transkrypcyjnych - HIF1 α , pSTAT3 i Notch-1IC, które pośredniczą w prozapalnej odpowiedzi stawu na warunkach hipoksji (Biniecka et al. 2016).

Na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników możliwa wydaje się hipoteza, że osłabienie glikolizy poprzez wykorzystanie 3PO może zmniejszyć akumulację metabolitów potrzebnych do reakcji biosyntetycznych i poziom niedotlenienia, a także zablokować aktywację prozapalnych szlaków sygnałowych, czego wynikiem może być łagodniejszy przebieg choroby.

W dalszym etapie moich badań nad rolą metabolizmu mitochondrialnego w chorobach zapalnych stawów sprawdzałam wpływ stresu oksydacyjnego na profil bioenergetyczny fibroblastów błony maziowej i komórek śródbłónka. Obserwowałam, że w warunkach stresu oksydacyjnego, podobnie jak w hipoksji, komórki pozyskiwały energię głównie w wyniku przemian glikolitycznych z jednoczesnym osłabieniem szlaku fosforylacji oksydacyjnej (Balogh et al. 2018). Przeprogramowaniu bioenergetycznemu towarzyszyła wzmożona produkcja WRT, mutageneza mtDNA oraz spadek aktywności enzymatycznej kompleksów III i IV łańcucha oddechowego (Balogh et al. 2018). Moje wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami wykazującymi spadek oddychania mitochondrialnego w komórkach nabłonka serca i dróg oddechowych pod wpływem stresu oksydacyjnego (Hill et al. 2009, Galam et al. 2015). Obserwowany spadek fosforylacji oksydacyjnej w warunkach utleniających może być spowodowany tworzeniem adduktów pomiędzy produktami peroksydacji lipidów a białkami będącymi składowymi łańcucha oddechowego czy syntazy ATP, przez co upośledzone zostają oddechowe funkcje mitochondriów.

Należy również podkreślić, że wraz z nasiloną glikolizą w środowisku stresu oksydacyjnego wzrastało wydzielanie mediatorów proangiogennych i prozapalnych przez fibroblasty i komórki śródbłónka. Ponadto, hodowla komórek śródbłónka z dodatkiem pożywki hodowlanej zebranej znad fibroblastów nasilała proliferację, migrację, inwazyjność i tworzenie struktur naczyniowo-podobnych (Balogh et al. 2018).

Analizowany przez mnie wpływ leków blokującymi TNF- α na obecność markerów angiogenezy (VEGF, Ang 2 i Tie-2) w błonie maziowej stawu wykazał spadek poziomów badanych białek po zastosowanej terapii (Balogh et al. 2018), co potwierdzają badania innych zespołów (Paleolog et al. 1996). Pozytywny wpływ inhibitorów TNF- α u pacjentów z RZS był również związany ze spadkiem oksydacyjnych uszkodzeń DNA i lipidów w surowicy i moczu, z jednoczesnym obniżeniem wskaźników aktywności choroby DAS28-CRP (Kageyama et al. 2008).

Reasumując, moje badania dowiodły, że w środowisku hipoksji i stresu oksydacyjnego zmienia się bioenergetyka stawów. Przeprogramowaniu komórek błony maziowej z drogi

fosforylacji oksydacyjnej na glikolityczną towarzyszy uszkodzenie mitochondrialnego genomu i funkcji oraz wzmożona odpowiedź prozapalna i proangiogenna fibroblastów i komórek śródbłonna. W badaniach *in vivo*, zwiększony poziom markerów glikolizy związany był ze spadkiem poziomu tlenu w tkance maziowej. Zastosowanie inhibitora glikolizy obniżyło aktywację kluczowych czynników transkrypcyjnych pośredniczących w procesie zapalnym stawów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poniżej opisałam wybrane osiągnięcia zawarte w publikacjach nie wchodzących w skład cyklu prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego. Publikacje te są wynikiem mojego udziału w projektach badawczych prowadzonych we współpracy z wieloma naukowcami i grupami badawczymi. Wszystkie poniższe prace zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora.

Temat badawczy 1: Wpływ niedotlenienia stawu na przebieg angiogenezy i stanu zapalnego w RZS i ŁZS

Angiogeneza stanowi istotną składową patogenezy zmian zachodzących w stawie już na bardzo wczesnych etapach rozwoju RZS i ŁZS. Obecnie wiadomo, że przebieg angiogenezy w stawie zajęтым przez proces zapalny jest wysoce zaburzony i wynika z nieprawidłowych interakcji pomiędzy komórkami śródbłonna a perycytami. Powoduje to, iż tworzące się nowe naczynia krwionośne są niedojrzałe i niestabilne.

Badania przeprowadzone przez Kennedy et al. (2010) po raz pierwszy wykazały obecność zarówno dojrzałych jak i niedojrzałych naczyń krwionośnych w hipoksyjnej błonie maziowej stawu. W około 50% naczyń krwionośnych obserwowaliśmy obecność cząsteczek adhezyjnych komórek nerwowych (NCAM), wskazujących na nienaruszone oddziaływanie między komórkami śródbłonna a perycytami. Dodatkowo, wykazaliśmy obecność oksydacyjnych uszkodzeń DNA w jądrze i cytoplazmie komórek znajdujących się w około-naczyniowej warstwie błony maziowej, co może potwierdzać niestabilność środowiska naczyniowego. W kolejnym etapie obserwowaliśmy bezpośredni związek między niskim poziomem tlenu w stawie a stopniem jego unaczynienia, mikroskopową oceną liczby naczyń, obecnością perycytów i ekspresją NCAM. Nasunęła się zatem hipoteza, że w warunkach hipoksji, w naczyniach krwionośnych błony maziowej ma miejsce ciągły remodeling i pomimo obecności licznych perycytów, naczynia wykazują wysoką niestabilność.

Wykorzystując jako model badawczy hipoksyjną tkankę maziową, analizowaliśmy także zależność między stopniem niedotlenienia a poziomem stanu zapalnego. Dowiedliśmy, że niedotlenienie błony maziowej wzmacnia naciek limfocytów T i makrofagów oraz ekspresję prozapalnych cytokin i chemokin (TNF α , IL1 β , IFN γ , MIP3 α) w miejsce zapalne, a zatem hipoksja może być ważnym czynnikiem inicjującym proces zapalny stawu.

Ocenialiśmy również wpływ leków blokujących TNF- α na zmianę stopnia hipoksji i poziomu markerów prozapalnych. Otrzymane wyniki pozwoliły jednoznacznie wysunąć wniosek, iż hipoksja jest kluczowym czynnikiem mikrośrodowiska sprzyjającym i regulującym procesy prozapalne i proangiogenne błony maziowej. Jednak najważniejszym wyzwaniem badań nad hipoksją i stanem zapalnym może być określenie, który z tych procesów pojawia się jako pierwszy w patogenezie chorób zapalnych stawów. Być może badania na grupie pacjentów, u których proces chorobowy jest na bardzo wczesnym etapie ułatwi uzyskanie odpowiedzi na powyższe pytanie.

Rezultaty tego tematu badawczego zostały przedstawione przeze mnie lub współwykonawców na wielu międzynarodowych spotkaniach naukowych, takich jak American College of Rheumatology (ACR) i European League Against Rheumatism (EULAR).

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 1:

1. Ng CT, **Biniecka M**, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U, Veale DJ. 2010. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis* 69: 1389-95
2. Kennedy A, Ng CT, **Biniecka M**, Saber T, Taylor C, O'Sullivan J, Veale DJ, Fearon U. 2010. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 711-21
3. Kennedy A, Ng CT, Chang TC, **Biniecka M**, O'Sullivan JN, Heffernan E, Fearon U, Veale DJ. 2011. Tumor necrosis factor blocking therapy alters joint inflammation and hypoxia. *Arthritis Rheum* 63: 923-32

Temat badawczy 2: Blokowanie szlaków sygnałowych JAK-STAT i TNF- α zmienia bioenergetykę, funkcje mitochondriów i prozapalne środowisko błony maziowej stawów

Aktywacja szlaków sygnałowych JAK-STAT i TNF- α sprzyja odpowiedzi prozapalnej w licznych chorobach autoimmunologicznych, w tym chorobom zapalnym stawów. Tofacytynib, doustny inhibitor kinazy tyrozynowej Janusa, został zatwierdzonym do długotrwałego stosowania m. in. w RZS i ŁZS, przynosząc znaczną skuteczność leczenia

pacjentów. Podobnie, wprowadzenie do leczenia inhibitorów TNF- α spowodowało znaczący postęp w praktyce klinicznej, przejawiający się osłabieniem choroby lub jej remisją.

Odpowiedź chorego na zastosowaną terapię jest określana za pomocą zdefiniowanych wskaźników klinicznych, takich jak liczba stawów objętych zapaleniem czy postęp erozji powierzchni stawowych o obrazie radiograficznym. Z kolei, w obrazie mikroskopowym skuteczność terapii wyraża się poprzez spadek liczby aktywowanych makrofagów i limfocytów T. Pomimo pozytywnych wyników licznych prób klinicznych i zastosowanego leczenia, niektórzy pacjenci nie wykazują odpowiedzi na terapię inhibitorami TNF- α i JAK-STAT. W związku z tym, bliższe zrozumienie mechanizmu działania Tofacitinibu i inhibitorów TNF- α na funkcje mitochondriów i procesy metaboliczne w tkance maziowej oraz czynników regulujących odpowiedź na leczenie może ułatwić wybór najbardziej skutecznej terapii oraz ułatwić prognozę wyników zaproponowanej terapii.

Nasze badania wykazały wpływ inhibitora szlaku sygnałowego JAK-STAT na metabolizm energetyczny stawów pacjentów z RZS. Tofacitinib zmieniał profil metabolizmu komórkowego wyrażający się spadkiem ATP, efektem czego może być spadek zdolności proliferacyjnych i inwazyjnych komórek błony maziowej. Co ważne, Tofacitinib hamował aktywność kluczowych enzymów glikolitycznych PFKFB3, PDK1, HK2, GSK3A i Glut-1, a temu towarzyszyła osłabiona odpowiedź prozapalna, proangiogenna i inwazyjna komórek.

W dalszych badaniach ustaliliśmy, iż częstość mutacji mtDNA w tkance maziowej pacjentów z RZS znacząco przewyższa wartości otrzymane od osób kontrolnych. Wysoka mutageneza w RZS korelowała z nasilonym stanem zapalnym obserwowanym na poziomie błony maziowej oraz lokalnym wydzielaniem mediatorów prozapalnych. Ponadto, wykazaliśmy wzrost uszkodzeń mtDNA i funkcji mitochondrialnych pod wpływem TNF- α .

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 2:

1. Harty LC, **Biniecka M**, O'Sullivan J, Fox E, Mulhall K, Veale DJ, Fearon U. 2012. Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis. *Ann Rheum Dis* 71: 582-8
2. McGarry T, Orr C, Wade S, **Biniecka M**, Wade S, Gallagher L, Low C, Veale DJ, Fearon U. 2018. JAK/STAT Blockade Alters Synovial Bioenergetics, Mitochondrial Function, and Proinflammatory Mediators in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 70: 1959-70

Temat badawczy 3: Sygnalizacja TLR2 i Notch-1 w bioenergetyce i angiogenezie chorób immunologicznych

Podczas stanu zapalnego komórki odpornościowe aktywowane przez receptory toll-like (TLR) mają zdolność przeprogramowania bioenergetycznego w kierunku glikolizy. Chociaż TLR są zaangażowane w patogenezę RZS, ich rola w regulacji metabolizmu w komórkach błony maziowej jest nieznana. Dlatego w tym badaniu analizowaliśmy wpływ aktywacji TLR2 na funkcje mitochondriów i bioenergetykę. Wykazaliśmy, że aktywacja TLR2 zwiększa dysfunkcje mitochondrialne, mutagenezę, stres oksydacyjny i ekspresję wybranych genów mitochondrialnych. Towarzyszyło temu obniżenie fosforylacji oksydacyjnej na korzyść zwiększonej glikolizy i translokacji enzymu glikolitycznego PKM2 z cytoplazmy do jądra. Otrzymane wyniki są dalszym potwierdzeniem koncepcji przemawiającej za złożonym współdziałaniem pomiędzy układem immunologicznym, stresem oksydacyjnym i metabolizmem energetycznym w stawie zajęty przez proces zapalny.

Szlak sygnałowy Notch odgrywa kluczową rolę w rozwoju naczyń poprzez oddziaływanie receptor-ligand, komunikację komórka-komórka i wpływ na dalsze losy komórek. Notch jest także ważnym szlakiem w interakcji pomiędzy komórkami śródbłónka a perycytami oraz w remodelingu sieci naczyniowej. Analizowaliśmy rolę szlaku sygnałowego Notch-1 w skórze objętej łuszczycą oraz w ludzkich komórkach śródbłónka. Dodatkowo, sprawdzaliśmy czy zablokowanie aktywności Notch-1 zmieni przebieg angiogenezy i inwazyjność komórek śródbłónka. Wykazaliśmy ważną rolę badanego szlaku sygnałowego w regulacji dysfunkcji naczyń i mechanizmów prozapalnych zaangażowanych w patogenezę łuszczycy, a zablokowanie Notch-1 może mieć ważne implikacje terapeutyczne.

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 3:

1. McGarry T, **Biniecka M**, Gao W, Cluxton D, Canavan M, Wade S, Wade S, Gallagher L, Orr C, Veale DJ, Fearon U. 2017. Resolution of TLR2-induced inflammation through manipulation of metabolic pathways in Rheumatoid Arthritis. *Sci Rep* 7: 43165
2. Rooney P, Connolly M, Gao W, McCormick J, **Biniecka M**, Sullivan O, Kirby B, Sweeney C, Molloy E, Markham T, Fearon U, Veale DJ. 2014. Notch-1 mediates endothelial cell activation and invasion in psoriasis. *Exp Dermatol* 23: 113-8

Temat badawczy 4: Rola komórek dendrytycznych CD141+ w patogenezie zapalenia stawów

Wcześniejsze badania dowiodły potencjalnej roli komórek dendrytycznych (DC) w patogenezie zapalenia stawów, jednak dotychczas subpopulacja CD141+DC nie została opisana. Dlatego w tym badaniu określiliśmy rolę CD141+DC RZS, stosując analizę

funkcjonalną i transkryptomiczną, ze szczególnym naciskiem na funkcję CD141+DC izolowanych lokalnie z błony maziowej oraz z monojądrzastych komórek krwi obwodowej (PB). Wykazaliśmy, że CD141+DC obecne w błonie maziowej są bardziej dojrzałe i transkrypcyjnie odmienne od PB CD141+DC. CD141+DC błony maziowej posiadały wyższą ekspresję wielu szlaków prozapalnych w porównaniu z ich odpowiednikami we krwi. Wysoki stopień dojrzałości stawowych CD141+DC może prowadzić do intensywniejszej prozapalnych odpowiedzi ze strony limfocytów T wraz z nasileniem mechanizmów inwazyjnych fibroblastów.

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 4:

Canavan M, Walsh AM, Bhargava V, Wade SM, McGarry T, Marzaioli V, Moran B, **Biniecka M**, Convery H, Wade S, Orr C, Mullan R, Fletcher JM, Nagpal S, Veale DJ, Fearon U. 2018. Enriched Cd141+ DCs in the joint are transcriptionally distinct, activated, and contribute to joint pathogenesis. *JCI Insight* 3 [Epub ahead of print]

Temat badawczy 5: Korelacja obrazu histologicznych zmian zapalnych w biopsjach błony maziowej z ultrasonografią, wskaźnikami aktywności choroby i obecnością przeciwciał przeciwko cytrulinowanym peptydom w surowicy (ACPA)

Ultrasonografia (US) jest szybkim, łatwo dostępnym i tanim narzędziem obrazowania stosowanym do wykrywania zapalenia błony maziowej stawu kolanowego. Naszym celem była ocena związku między wynikami badań US a oznaczeniami histologicznymi w ocenie poziomu zapalenia i unaczynienia stawu kolanowym u osób z artropatiami zapalnymi. Otrzymane wyniki badań US i histologicznych pokrywały się w ocenie stanu zapalnego i unaczynienia, a zatem US dokładnie opisuje poziom zapalenia błony maziowej stawu kolanowego.

Identyfikacja i ilościowe określenie wskaźnika aktywności choroby w reumatoidalnym zapaleniu stawów pozostaje wyzwaniem, ponieważ duża część pacjentów może mieć aktywne zapalenie, ale normalne markery zapalne. Chociaż stosowane są różne sposoby oceny aktywności choroby, większość metod opiera się na oznaczeniach białka C-reaktywnego (CRP) i odczynu Biernackiego (ESR). W tym badaniu sprawdzaliśmy użyteczność i ograniczenia powyższych biomarkerów, oraz DAS28-CRP w ocenie aktywności choroby w RZS. Wykazaliśmy, że istnieje wyraźna pozytywna korelacja między CRP, ESR i DAS28-CRP a histologicznymi zmianami zapalnymi na poziomie tkanki maziowej.

Przeciwciała przeciwko cytrulinowanemu peptydowi obecne w surowicy (ACPA) mogą pojawić się przed rozwojem reumatoidalnego zapalenia stawów i prognozować cięższy przebieg choroby. Celem naszego badania była ocena immunofenotypu tkanki maziowej zgodnie ze statusem ACPA u pacjentów z RZS. Rezultaty badań wykazały istotnie wyższą liczbę limfocytów B oraz tworzących się nacieków zapalnych limfocytów w błonie maziowej pacjentów z pozytywnym statusem ACPA.

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 5:

1. Najm A, Orr C, Gallagher L, **Binińska M**, Gaigneux E, Le Goff B, Fearon U, Veale DJ. 2018. Knee joint synovitis: study of correlations and diagnostic performances of ultrasonography compared with histopathology. *RMD Open* 4: e000616
2. Orr CK, Najm A, Young F, McGarry T, **Binińska M**, Fearon U, Veale DJ. 2018. The Utility and Limitations of CRP, ESR and DAS28-CRP in Appraising Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Front Med (Lausanne)* 5: 185
3. Orr C, Najm A, **Binińska M**, McGarry T, Ng CT, Young F, Fearon U, Veale DJ. 2017. Synovial Immunophenotype and Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients: Relationship to Treatment Response and Radiologic Prognosis. *Arthritis Rheumatol* 69: 2114-23

Temat badawczy 6: Badania nad angiogenezą, zapaleniem i niestabilnością mitochondrialną w raku jelita grubego i chorobie przełyku Barretta

Moje zainteresowania naukowe nie ograniczały się jedynie do badań w dziedzinie chorób immunologicznych takich jak PZS, ŁZS czy łuszczyca. Uczestniczyłam także w badaniach z zakresu gastroenterologii, w szczególności schorzeniach obejmujących raka jelita grubego i chorobę przełyku Barretta.

Pomimo skojarzonego leczenia pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego, odsetek osób, u których obserwuje się pozytywną odpowiedź jest niewielki i brak jest markerów mogących przewidzieć skuteczność terapii. Dlatego w badaniach ocenialiśmy, czy markery angiogenezy, zapalenia i stresu oksydacyjnego, mogłyby ułatwić wybór najskuteczniejszej metody leczenia do indywidualnego pacjenta. Nasze obserwacje wykazały, iż jednoczesne zdefiniowany wysoki poziom markerów potwierdzających obecność nieprawidłowo wykształconych naczyń krwionośnych, wysoki poziom markerów oksydacyjnego uszkodzenia DNA oraz niski ogólnoustrojowy poziom cytokin prozapalnych mogą ułatwić selekcję pacjentów o najwyższej skuteczności leczenia.

W innym badaniu wykazaliśmy, że czynniki wydzielane do mikrośrodowiska guza u pacjentów z rakiem jelita grubego znacząco hamują dojrzewanie komórek dendrytycznych i wydzielanie cytokin. Z kolei, lek biologiczny bevacizumab, nie znosi zahamowania dojrzewania komórek dendrytycznych. Może to wskazywać na obecność innych niż VEGF czynników wzrostu w mikrośrodowisku guza, które odgrywa ważną rolę w modulacji funkcji komórek odpornościowych.

W chorobie przełyku Barretta wykazaliśmy, że niestabilność mitochondrialna, stres oksydacyjny oraz wzrost produkcji białek mitochondrialnych i zapalnych są aktywowane na wczesnym etapie rozwoju choroby. Chociaż nie jest jasne, czy dysfunkcje mitochondriów są przyczyną lub skutkiem tych zdarzeń, zmiana błony śluzowej żołądka w błonę śluzową jelita na skutek przewlekłego zapalenia (tzw. metaplasja jelitowa) pojawia się w środowisku zwiększonego stresu oksydacyjnego i niestabilności mitochondrialnej.

Publikacje powstałe jako wynik tematu badawczego nr 6:

1. Noonan SA, Morrissey ME, Martin P, **Binińska M**, O'Meachair S, Maguire A, Tosetto M, Nolan B, Hyland J, Sheahan K, O'Donoghue D, Mulcahy H, Fennelly D, O'Sullivan J. 2018. Tumour vasculature immaturity, oxidative damage and systemic inflammation stratify survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncotarget* 9: 10536-48
2. O'Farrell NJ, Feighery R, Picardo SL, Lynam-Lennon N, **Binińska M**, McGarrigle SA, Phelan JJ, MacCarthy F, O'Toole D, Fox EJ, Ravi N, Reynolds JV, O'Sullivan J. 2016. Changes in mitochondrial stability during the progression of the Barrett's esophagus disease sequence.
3. Michielsen AJ, Noonan S, Martin P, Tosetto M, Marry J, **Binińska M**, Maguire AA, Hyland JM, Sheahan KD, O'Donoghue DP, Mulcahy HE, Fennelly D, Ryan EJ, O'Sullivan JN. 2012. Inhibition of dendritic cell maturation by the tumor microenvironment correlates with the survival of colorectal cancer patients following bevacizumab treatment. *Mol Cancer Ther* 11: 1829-37

Poza moim udziałem w wymienionych pracach oryginalnych, jestem współautorką trzech publikacji przeglądowych. W przedstawionych poniżej publikacjach napisałam rozdziały podsumowujące aktualny stan wiedzy na temat hipoksji, stresu oksydacyjnego, uszkodzeń mitochondrialnych i angiogenezy w reumatoidalnym zapaleniu stawów i miażdżycy.

Publikacje przeglądowe:

1. McGarry T, **Biniecka M**, Veale DJ, Fearon U. 2018. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med* 125: 15-24
2. Balogh E, Pusztai A, Hamar A, Vegh E, Szamosi S, Kerekes G, McCormick J, **Biniecka M**, Szanto S, Szucs G, Nagy Z, Fearon U, Veale DJ, Szekanecz Z. 2018. Autoimmune and angiogenic biomarkers in autoimmune atherosclerosis. *Clin Immunol* [Epub ahead of print]
3. Fearon U, Canavan M, **Biniecka M**, Veale DJ. 2016. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12: 385-97

Przyszłe plany badawcze

Wyniki moich badań dowiodły, iż hipoksja błony maziowej jest kluczowym regulatorem stresu oksydacyjnego, angiogenezy i metabolizmu energetycznego w chorobach zapalnych stawów na przykładzie RZS i ŁZS. Bliższe poznanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy tymi procesami może ułatwić zrozumienie mechanizmów sprzyjających powstaniu stanu zapalnego w stawie, a być może zwiększyć skuteczność obecnych strategii terapeutycznych.

Proces zapalny stanowi bardzo istotny element w rozwoju chorób kardiologicznych. Wiadomo, że w przypadku chorób immunologicznych takich jak RZS czy łuszczyca, proces zapalny nie ma charakteru lokalnego ograniczonego do błony maziowej stawów czy skóry, lecz związany jest także ze zmianami pozastawowymi i powikłaniami układowymi. Jednak prowadzone w ostatnich latach liczne badania naukowe i kliniczne nie tłumaczą jednoznacznie w jaki sposób proces zapalny zapoczątkowany lokalnie może zaburzać funkcjonowanie komórek mięśniowych serca.

Moje przyszłe plany badawcze są związane z bliższym poznaniem i wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów, które mogą przyczyniać się do rozwoju chorób serca u pacjentów z RZS i łuszczycą. Jednym z możliwych mechanizmów leżących u podstaw nieprawidłowej pracy serca w chorobach immunologicznych może być uszkodzenie funkcji oddechowych mitochondriów i zaburzona gospodarka energetyczna kardiomiocytów i komórek śródbłónka.

W badaniach wykorzystam nowoczesną technologię reprogramowania komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych, które w

kolejnym etapie będą różnicowane do kardiomiocytów i komórek śródbłónka o cechach indywidualnych dla każdego chorego.

Powyższe plany badawcze są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursów **OPUS 13** i **SONATA-BIS 8** oraz Komisję Europejską - program w zakresie badań naukowych i innowacji „**Horyzont 2020**” - stypendium indywidualne w ramach działań "Maria Skłodowska-Curie". We wszystkich wymienionych grantach pełnię funkcję kierownika projektu.

Bibliografia

(w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego nazwisko habilitanta, rok publikacji i nazwę czasopisma zaznaczono wytłuszczonym drukiem)

Balogh, E., D. J. Veale, T. McGarry, C. Orr, Z. Szekanecz, C. T. Ng, U. Fearon and **M. Biniecka (2018)**. "Oxidative stress impairs energy metabolism in primary cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis." **Arthritis Res Ther** 20(1): 95.

Biniecka, M., M. Canavan, T. McGarry, W. Gao, J. McCormick, S. Cregan, L. Gallagher, T. Smith, J. J. Phelan, J. Ryan, J. O'Sullivan, C. T. Ng, D. J. Veale and U. Fearon (2016). "Dysregulated bioenergetics: a key regulator of joint inflammation." **Ann Rheum Dis** 75(12): 2192-2200.

Biniecka, M., M. Connolly, W. Gao, C. T. Ng, E. Balogh, M. Gogarty, L. Santos, E. Murphy, D. Brayden, D. J. Veale and U. Fearon (2014). "Redox-mediated angiogenesis in the hypoxic joint of inflammatory arthritis." **Arthritis Rheumatol** 66(12): 3300-3310.

Biniecka, M., E. Fox, W. Gao, C. T. Ng, D. J. Veale, U. Fearon and J. O'Sullivan (2011a). "Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis." **Arthritis Rheum** 63(8): 2172-2182.

Biniecka, M., A. Kennedy, C. T. Ng, T. C. Chang, E. Balogh, E. Fox, D. J. Veale, U. Fearon and J. N. O'Sullivan (2011b). "Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis." **Arthritis Res Ther** 13(4): R121.

Biniecka, M., A. Kennedy, U. Fearon, C. T. Ng, D. J. Veale and J. N. O'Sullivan (2010). "Oxidative damage in synovial tissue is associated with in vivo hypoxic status in the arthritic joint." **Ann Rheum Dis** 69(6): 1172-1178.

Chaturvedi, V., R. Handa, D. N. Rao and J. P. Wali (1999). "Estimation & significance of serum & synovial fluid malondialdehyde levels in rheumatoid arthritis." **Indian J Med Res** 109: 170-174.

Chenevier-Gobeaux, C., C. Simonneau, H. Lemarechal, D. Bonnefont-Rousselot, S. Poiraudau, F. Rannou, P. Anract and D. Borderie (2012). "Hypoxia induces nitric oxide synthase in rheumatoid synoviocytes: consequences on NADPH oxidase regulation." **Free Radic Res** 46(5): 628-636.

Colavitti, R., G. Pani, B. Bedogni, R. Anzevino, S. Borrello, J. Waltenberger and T. Galeotti (2002). "Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR." *J Biol Chem* 277(5): 3101-3108.

Cummins, E. P., F. Seeballuck, S. J. Keely, N. E. Mangan, J. J. Callanan, P. G. Fallon and C. T. Taylor (2008). "The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis." *Gastroenterology* 134(1): 156-165.

Da Sylva, T. R., A. Connor, Y. Mburu, E. Keystone and G. E. Wu (2005). "Somatic mutations in the mitochondria of rheumatoid arthritis synoviocytes." *Arthritis Res Ther* 7(4): R844-851.

Fearon, U., M. Canavan, M. Biniecka and D. J. Veale (2016). "Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* 12(7): 385-397.

Frey, R. S., M. Ushio-Fukai and A. B. Malik (2009). "NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology." *Antioxid Redox Signal* 11(4): 791-810.

Galam, L., A. Failla, R. Soundararajan, R. F. Lockey and N. Kolliputi (2015). "4-hydroxynonenal regulates mitochondrial function in human small airway epithelial cells." *Oncotarget* 6(39): 41508-41521.

Greaves, L. C., M. J. Barron, S. Plusa, T. B. Kirkwood, J. C. Mathers, R. W. Taylor and D. M. Turnbull (2010). "Defects in multiple complexes of the respiratory chain are present in ageing human colonic crypts." *Exp Gerontol* 45(7-8): 573-579.

Harty, L. C., M. Biniecka, J. O'Sullivan, E. Fox, K. Mulhall, D. J. Veale and U. Fearon (2012). "Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis." *Ann Rheum Dis* 71(4): 582-588.

Hill, B. G., B. P. Dranka, L. Zou, J. C. Chatham and V. M. Darley-Usmar (2009). "Importance of the bioenergetic reserve capacity in response to cardiomyocyte stress induced by 4-hydroxynonenal." *Biochem J* 424(1): 99-107.

Jeon, C. H., J. K. Ahn, J. Y. Chai, H. J. Kim, E. K. Bae, S. H. Park, E. Y. Cho, H. S. Cha, K. S. Ahn and E. M. Koh (2008). "Hypoxia appears at pre-arthritic stage and shows co-localization with early synovial inflammation in collagen induced arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 26(4): 646-648.

Kageyama, Y., M. Takahashi, T. Nagafusa, E. Torikai and A. Nagano (2008). "Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatol Int* 28(3): 245-251.

Kennedy, A., C. T. Ng, M. Biniecka, T. Saber, C. Taylor, J. O'Sullivan, D. J. Veale and U. Fearon (2010). "Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis." *Arthritis Rheum* 62(3): 711-721.

Kennedy, A., C. T. Ng, T. C. Chang, M. Biniecka, J. N. O'Sullivan, E. Heffernan, U. Fearon and D. J. Veale (2011). "Tumor necrosis factor blocking therapy alters joint inflammation and hypoxia." *Arthritis Rheum* 63(4): 923-932.

Kim, J., M. Xu, R. Xo, A. Mates, G. L. Wilson, A. W. t. Pearsall and V. Grishko (2010). "Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage* 18(3): 424-432.

Lobov, I. B., P. C. Brooks and R. A. Lang (2002). "Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11205-11210.

Lund-Olesen, K. (1970). "Oxygen tension in synovial fluids." *Arthritis Rheum* 13(6): 769-776.

Mambo, E., X. Gao, Y. Cohen, Z. Guo, P. Talalay and D. Sidransky (2003). "Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4): 1838-1843.

McGarry, T., M. Biniecka, D. J. Veale and U. Fearon (2018). "Hypoxia, oxidative stress and inflammation." *Free Radic Biol Med* 125: 15-24.

McGarry, T. and U. Fearon (2019). "Cell metabolism as a potentially targetable pathway in RA." *Nat Rev Rheumatol* 15(2): 70-72.

Ng, C. T., M. Biniecka, A. Kennedy, J. McCormick, O. Fitzgerald, B. Bresnihan, D. Buggy, C. T. Taylor, J. O'Sullivan, U. Fearon and D. J. Veale (2010). "Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo." *Ann Rheum Dis* 69(7): 1389-1395.

Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius and B. Zhivotovsky (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." *Apoptosis* 12(5): 913-922.

Paleolog, E. M., M. Hunt, M. J. Elliott, M. Feldmann, R. N. Maini and J. N. Woody (1996). "Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 39(7): 1082-1091.

Ruef, J., Z. Y. Hu, L. Y. Yin, Y. Wu, S. R. Hanson, A. B. Kelly, L. A. Harker, G. N. Rao, M. S. Runge and C. Patterson (1997). "Induction of vascular endothelial growth factor in balloon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis." *Circ Res* 81(1): 24-33.

Shi, Q., F. Vaillancourt, V. Cote, H. Fahmi, P. Lavigne, H. Afif, J. A. Di Battista, J. C. Fernandes and M. Benderdour (2006). "Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal." *Arthritis Res Ther* 8(6): R159.

Shokolenko, I., N. Venediktova, A. Bochkareva, G. L. Wilson and M. F. Alexeyev (2009). "Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA." *Nucleic Acids Res* 37(8): 2539-2548.

Szekanecz, Z., T. Besenyei, A. Szentpetery and A. E. Koch (2010). "Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* 22(3): 299-306.

Vermulst, M., J. H. Bielas and L. A. Loeb (2008). "Quantification of random mutations in the mitochondrial genome." *Methods* 46(4): 263-268.

Wei, Y. H., S. H. Kao and H. C. Lee (1996). "Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging." *Ann N Y Acad Sci* 786: 24-43.

West, X. Z., N. L. Malinin, A. A. Merkulova, M. Tischenko, B. A. Kerr, E. C. Borden, E. A. Podrez, R. G. Salomon and T. V. Byzova (2010). "Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands." *Nature* 467(7318): 972-976.

Wong, W. (2017). "New connections: The duality of ROS in angiogenesis." *Sci Signal* 10(479).

Podsumowanie osiągnięć naukowych

Powyżej zebrałam najważniejsze osiągnięcia mojej pracy naukowej, stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego i podsumowałam realizację byłych oraz obecnych projektów badawczych, w których biorę udział jako kierownik projektu lub wykonawca.

Reasumując, mój dorobek naukowy obejmuje łącznie 32 publikacje naukowe (23 po uzyskaniu doktoratu). Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), wynosi 159.049 (984 punktów MNISW). Według bazy Web of Science na dzień 18/04/2019 opublikowane prace były cytowane 501 razy (446 bez autocytowań). Mój aktualny indeks Hirscha jest równy 17 (Web of Science na dzień 18/04/2019).

Wielokrotnie brałam udział w międzynarodowych konferencjach naukowych takich jak American College of Rheumatology (ACR), European League Against Rheumatism (EULAR), European Workshop for Rheumatology Research (EWRR), Irish Society for Rheumatology (ISR), na których wygłosiłam 9 prezentacji ustnych i 18 prezentacji posterowych. Dodatkowo, byłam współautorem plakatów prezentowanych przez innych członków zespołu.

W latach 2007-2017 byłam współwykonawcą w 3 projektach badawczych finansowanych przez Health Research Board Ireland i MSD Newman Fellowship Ireland. Obecnie pełnię rolę kierownika 2 projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (konkurs OPUS 13 i SONATA-BIS 8) oraz 1 projektu finansowanego przez Komisję Europejską „Horyzont 2020” - stypendium indywidualne w ramach działań "Maria Skłodowska-Curie".

Poza pracą naukową prowadziłam działalność dydaktyczną. Dla studentów kierunku Master in Translational Oncology, Trinity College Dublin, przygotowałam i wygłosiłam cykl

wykładów omawiających molekularny mechanizm dysfunkcji mitochondrialnych w chorobach immunologicznych pt: *“Mitochondrial damage and repair”*, *“Mitochondrial instability in inflammation”*, *“Cellular instability and treatment resistance”*, *“Therapeutic implications: mitochondria as a target”*. Ponadto, opieką naukową objęłam łącznie 9 studentów i lekarzy w toku specjalizacji, którzy badania wykonywali w Education and Research Centre, St. Vincent’s University Hospital, Dublin, Irlandia – wszystkie projekty zostały zakończone napisaniem i złożeniem pracy magisterskiej lub doktorskiej. Obecnie pełnię rolę opiekuna pomocniczego w jednym przewodzie doktorskim.

Szczegółową listę mojej aktywności zawodowej, publikacji i dane bibliometryczne przedstawiłam w Załączniku nr 2 (*Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki*).

Monika Biniecka

Monika Biniecka

Zabrze, 16/04/2019