



# Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

*DZIEDZINA: nauki medyczne i nauki o zdrowiu*

*DYSCYPLINA: nauki medyczne*

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

**"Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC):  
wyprowadzanie, charakterystyka i potencjalne zastosowania w Chorobach  
Układu Oddechowego"**

**Lek. Michał Dębczyński**

**Promotor:** prof. dr hab. Robert Marek Mróz

**II Klinika Chorób Płuc, Raka Płuca i Chorób Wewnętrznych**

**Kierownik Kliniki:** prof. dr hab. Robert Marek Mróz

*Rozprawa doktorska zrealizowana w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej UMB*

**Białystok 2024**





# Medical University of Białystok

*Field of Medical and Health Sciences*

*Scientific discipline: Medical Sciences*

## **DOCTORAL THESIS**

**"Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC): Derivation, Characterization, and Potential Applications in Respiratory Diseases"**

**Michał Dębczyński, M.D.**

**Supervisor:** prof. Robert Marek Mróz , M.D., PhD

**2nd Department of Lung Diseases, Lung Cancer and Internal Medicine**

**Head of Department:** prof. Robert Marek Mróz , M.D., PhD

*The doctoral thesis was carried out as a part of education at the Doctoral School of MUB*

**Białystok 2024**



**Pragnę złożyć serdeczne podziękowania**

Panu prof. dr hab. n med. Robertowi Markowi Mrozowi

za umożliwienie realizacji planów naukowych, koordynacje, wsparcie i kierownictwo.

Pracownikom II Kliniki Chorób Płuc, Raka Płuca i Chorób Wewnętrznych UMB

za wsparcie, cierpliwości i życzliwość.

Pragnę wyrazić wdzięczność mojej rodzinie i przyjaciołom za ich nieustające wsparcie, zachętę i wiarę we mnie.

Dr Paolo Scudieri za bezinteresowną pomoc, życzliwość oraz wsparcie merytoryczne.

*Praca została sfinansowana przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku w ramach zadań badawczych o numerach:*

*B.SUB.24.593; B.SUB.23.134; SUB/1/DN/22/005/1203; SUB/1/DN/22/004/1203;  
SUB/1/22/003/1203*

## Spis treści

1	Wykaz skrótów:.....	11
2	Wstęp. ....	14
2.1	Rys historyczny.....	14
2.1.1	Koncepcja komórek macierzystych. ....	14
2.1.2	Embrionalne Komórki Rakowe (ECCs).....	15
2.1.3	Hematopoetyczne Komórki Macierzyste (HSCs).....	16
2.1.4	Zarodkowe Komórki Macierzyste (ESCs). ....	16
2.1.5	Indukowane Pluripotencjalne Komórki Macierzyste (iPSCs). ....	17
2.1.6	Ludzkie indukowane Pluripotencjalne Komórki Macierzyste (hiPSCs).....	18
2.1.7	Od wyprowadzenia hiPSCs do terapii komórkowych.....	19
2.2	Wyprowadzanie linii komórkowych hiPSC z komórek somatycznych.....	21
2.2.1	Reprogramowanie. ....	22
2.2.2	Charakterystyka iPSC. ....	22
2.2.3	Analiza morfologiczna. ....	23
2.2.4	Testy na obecność wektorów resztkowych oraz wykrywanie kontaminacji hodowli Mykoplazmą. ....	23
2.2.5	Markery molekularne. ....	23
2.2.6	Testy funkcjonalne pluripotencji. ....	23
2.2.7	Ocena stabilności genomowej i mutacji.....	24
2.2.8	Produkcja iPSC, kontrola jakości i biobankowanie. ....	24
2.3	Zastosowanie iPSC w Chorobach Układu Oddechowego.....	24
2.3.1	Modelowanie Chorób Układu Oddechowego. ....	25
2.3.2	Terapie z użyciem hiPSCs w Chorobach Układu Oddechowego.....	25

2.4	Podsumowanie.....	26
3	Cele Pracy.....	27
3.1	Cel główny.....	27
3.2	Cele szczegółowe.....	27
4	Materiał i Metody.....	28
4.1	Linia CF001 oraz COPD001.....	28
4.1.1	Izolacja, reprogramowanie PBMC i hodowla komórek.....	28
4.1.2	Immunocytochemia.....	29
4.1.3	Wykrywanie genomu wirusa Sendai.....	30
4.1.4	Analiza mutacji linii CF001.....	30
4.1.5	Różnicowanie do trzech listków zarodkowych.....	30
4.1.6	Kariotypowanie.....	30
4.1.7	Genotypowanie krótkich powtórzeń tandemowych (STR).....	31
4.1.8	Wykrywanie Mykoplazmy.....	31
4.2	Linia CF002.....	31
4.2.1	Izolacja, reprogramowanie PBMC i hodowla komórek.....	31
4.2.2	Immunocytochemia.....	32
4.2.3	Wykrywanie genomu wirusa Sendai.....	33
4.2.4	Różnicowanie do trzech listków zarodkowych.....	33
4.2.5	Kariotypowanie.....	33
4.2.6	Genotypowanie Krótkich Powtórzeń Tandemowych (STR).....	33
4.2.7	Wykrywanie Mykoplazmy.....	34
5	Wyniki.....	39
5.1	Linia hiPSC CF001.....	39



5.2	Linia hiPSC COPD001.....	47
5.3	Linia hiPSC CF002.....	55
6	Dyskusja.....	66
6.1	Porównanie wyników z literaturą.....	66
6.2	Umiejętności i techniki nabyte przez doktoranta podczas prowadzenia badań naukowych.....	66
6.3	Badania nad najczęstszymi Chorobami Układu Oddechowego z wykorzystaniem hiPSCs.....	67
6.3.1	Mukowiscydoza.....	67
6.3.2	Przewlekła Obturacyjna Choroba Płuc.....	68
6.3.3	Astma.....	70
6.3.4	Idiopatyczne Włóknienie Płuc.....	71
6.3.5	Rak Płuca.....	71
7	Wnioski.....	73
8	Streszczenie w języku polskim.....	74
9	Streszczenie w języku angielskim.....	75
10	Piśmiennictwo.....	76
11	Wykaz tabel i rycin.....	89
12	Dorobek naukowy.....	92
12.1	Wykaz publikacji naukowych i wystąpień konferencyjnych.....	92
12.1.1	Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe.....	92
12.1.2	Opisy przypadków.....	93
12.1.3	Prace poglądowe.....	95
12.1.4	Inne publikacje.....	97
12.2	Granty i projekty.....	98

12.3	Stáže i szkolenia. ....	99
12.4	Inne aktywności naukowe. ....	99
13	Zgody Komisji Bioetycznej. ....	100

## **1 Wykaz skrótów:**

AAT: Alfa-1-antytrypsyna (ang. Alpha-1 Antitrypsin)

ACE2: Enzym konwertujący angiotensynę 2 (ang. Angiotensin-Converting Enzyme 2)

ALI: Interfejs powietrzno-cieczowy (ang. Air-Liquid Interface)

ASCT: Autologiczny przeszczep komórek macierzystych (ang. Autologous Stem Cell Transplantation)

AT2: Pneumocyty typu II (ang. Alveolar Type II Cells)

cDNA: Komplementarny DNA (ang. Complementary DNA)

CF: Mukowiscydoza (ang. Cystic Fibrosis)

CFTR: Regulator przewodnictwa przez błonowego mukowiscydozy (ang. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)

c-Myc: Homolog onkogenu wirusa myelocytomatozy (ang. Myelocytomatosis viral oncogene homolog)

COPD: Przewlekła obturacyjna choroba płuc (ang. Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

CRISPR/Cas9: System edycji genów (ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9)

Dcn: Dekorina (ang. Decorin)

deltaRn: Zmiana fluorescencji w czasie PCR (ang. Delta Rn)

DMSO: Dimetylosulfotlenek (ang. Dimethyl Sulfoxide)

DNA: Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. Deoxyribonucleic Acid)

EB: Ciała embrioidalne zarodkowe (ang. Embryoid Bodies)

ECCs: Embrionalne komórki rakowe (ang. Embryonal Carcinoma Cells)

ESCs: Zarodkowe komórki macierzyste, embrionalne komórki macierzyste (ang. Embryonic Stem Cells)

FBS: Surowica płodowa bydłęca (ang. Fetal Bovine Serum)

FISH: Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. Fluorescence In Situ Hybridization)

FLT-3: Fms-podobna kinaza tyrozynowa 3 (ang. Fms-like Tyrosine Kinase 3)

gDNA: Genomowe DNA (ang. Genomic DNA)

GTG: Prążkowanie GTG (ang. G-banding by Trypsin with Giemsa)

HDFs: Ludzkie fibroblasty skórne (ang. Human Dermal Fibroblasts)

hESCs: Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste, ludzkie embrionalne komórki macierzyste (ang. Human Embryonic Stem Cells)

hiPSCs: Ludzkie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. Human Induced Pluripotent Stem Cells)

HSCs: Hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. Hematopoietic Stem Cells)

IgE: Immunoglobulina E (ang. Immunoglobulin E)

IL: Interleukina (ang. Interleukin)

iPSCs: Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. Induced Pluripotent Stem Cells)

IPSC-MSC: Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z iPSCs (ang. Induced Pluripotent Stem Cell-derived Mesenchymal Stem Cells)

ISCN 2020: Międzynarodowy System Nomenklatury Cytogenetyki Człowieka (ang. International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2020)

Klf4: Czynn timer podobny do Kruppela 4 (ang. Kruppel-like factor 4)

LPC: Komórki progenitorowe płuc (ang. Lung Progenitor Cells)

MEFs: Fibroblasty zarodkowe myszy (ang. Mouse Embryonic Fibroblasts)

MOI: Wskaźnik zakażenia (ang. Multiplicity of Infection)

mRNA: Matrycowy RNA (ang. Messenger RNA)

MSC: Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. Mesenchymal Stem Cells)

NC: Kontrola negatywna (ang. Negative Control)

NSCLC: Niedrobnokomórkowy rak płuca (ang. Non-Small Cell Lung Cancer)

Oct3/4: Czynn timer transkrypcyjny wiążący oktamer 3/4 (ang. Octamer-binding transcription factor 3/4)

OSKM: Czynn timer Yamanaki (ang. Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)

PBMC: Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PC: Kontrola pozytywna (ang. Positive Control)

PCR: Reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)

qPCR: Ilościowa PCR (ang. Quantitative PCR)

RNA: Kwas rybonukleinowy (ang. Ribonucleic Acid)

RNA-seq: Sekwencjonowanie RNA (ang. RNA Sequencing)

RT-PCR: Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction)

SCLC: Drobnokomórkowy rak płuca (ang. Small Cell Lung Cancer)

SCF: Czynn timer stymulujący komórki macierzyste (ang. Stem Cell Factor)

SNP: Polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. Single Nucleotide Polymorphism)

Sox2: Gen zawierający SRY-box 2 (ang. SRY-box containing gene 2)

SSEA: Antygen zarodkowy specyficzny dla etapu (ang. Stage-Specific Embryonic Antigen)

STR: Genotypowanie krótkich powtórzeń tandemowych (ang. Short Tandem Repeat Genotyping)

TRA: Antygen odrzucenia nowotworu (ang. Tumor Rejection Antigen)

WES: Sekwencjonowanie egzomowe (ang. Whole Exome Sequencing)

WGS: Sekwencjonowanie całogenomowe (ang. Whole Genome Sequencing)

## 2 Wstęp.

### 2.1 Rys historyczny.

#### 2.1.1 Koncepcja komórek macierzystych.

Pierwsze koncepcje dotyczące komórek macierzystych pojawiły się w połowie XIX wieku. Ernst Haeckel, niemiecki zoolog i ewolucjonista, wprowadził pojęcie "Stammzelle" (komórka macierzysta) w swoich wykładach opublikowanych w 1868 roku, odnosząc się do organizmów jednokomórkowych jako przodków organizmów wielokomórkowych. (1)

Rozwinięciem koncepcji Haeckla zajmował się Theodor Boveri, niemiecki biolog, ceniony również za swój wkład w rozwój genetyki (prowadził badania nad chromosomami i ich rolą w dziedziczeniu oraz rozwoju organizmów), cytologii oraz badań nad nowotworami. (2) W swoich badaniach nad rozwojem embrionalnym nicienia *Ascaris megalocephala*, Boveri zidentyfikował komórki, które wywodzą się z zapłodnionej komórki jajowej i prowadzą do powstania pierwotnych komórek płciowych (Urgeschlechtszelle) oraz pierwotnych komórek somatycznych (Ursomazellen). Opisał, jak w każdej z wczesnych generacji komórek, począwszy od stadium dwukomórkowego embrionu, jedna komórka macierzysta dzieli się na dwie komórki potomne, z których tylko jedna zachowuje charakter komórki macierzystej, podczas gdy druga różnicuje się w prekursorzy komórek somatycznych. (3)

Bardziej szczegółową koncepcją, była koncepcja wspólnej komórki macierzystej krwi zaproponowana w 1909 roku na konferencji w Sankt Petersburgu przez Alexandra Maximowa. Maximow był zwolennikiem komórkowej teorii monofiletycznej (unitarystycznej), która zakładała, że wszystkie typy komórek krwi pochodzą od jednej multipotencjalnej komórki macierzystej, która ma zdolność do samoodnowy i różnicowania się w różne linie komórek krwi, takie jak erytrocyty, leukocyty i trombocyty. Miało to ogromny wpływ na rozwój hematologii oraz zrozumienie mechanizmów hematopoezy. (4,5)

Kolejną istotną i innowacyjną pracą w kontekście biologii komórkowej oraz komórek macierzystych był opublikowany w 1914 roku artykuł "Über Gedächtnis, Vererbung und Pluripotenz" autorstwa niemieckiego uczonego V. Haeckera. Autor opisał w nim zagadnienia związane z pamięcią komórkową, dziedziczeniem oraz pluripotencją. (6)

Valentin Haecker wprowadza pojęcie pamięci komórkowej, sugerując, że komórki mogą "pamiętać" swoje pochodzenie i funkcje, co wpływa na ich zdolność do różnicowania się w różne typy komórek. Koncepcja ta była innowacyjna na początku XX wieku i stanowiła podstawę dalszych badań nad plastycznością komórkową i ich różnicowaniem. Praca skupia się na pojęciu pluripotencji, czyli zdolności niektórych komórek do różnicowania się w wiele różnych typów komórek funkcjonalnych. Haecker analizuje, jak komórki pluripotencjalne mogłyby przyczynić się do regeneracji tkanek i organów, co stanowiło wstęp dla rozwoju medycyny regeneracyjnej. (3)

### 2.1.2 *Embrionalne Komórki Rakowe (ECCs).*

Wraz z rozwojem technologii, teorie i koncepcje dotyczące komórek macierzystych mogły być z większą precyzją weryfikowane doświadczalnie.

W latach 50. i 60. XX wieku Amerykańscy naukowcy Leroy Stevens i Barry Pierce prowadząc badania nad teratokarcynoma (nowotworami zarodkowymi) u myszy przyczynili się do lepszego zrozumienia pluripotencji. Choć bezpośrednio nie pracowali razem, ich badania nad teratokarcynoma i komórkami macierzystymi były komplementarne i wzajemnie się uzupełniały.

Stevens zidentyfikował w teratokarcynoma komórki, które nazwał embrionalnymi komórkami rakowymi (ECCs). Te komórki wykazywały zdolność do różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych (ektoderma, mezoderma, endoderma). Ponadto udowodnił, że teratokarcynoma pochodzi z pierwotnych komórek płciowych, a nie z somatycznych komórek jądra, jak uważano. (7,8)

Barry Pierce zaproponował teorię, że nowotwory zawierają niewielką populację komórek macierzystych, które są odpowiedzialne za wzrost i rozwój nowotworu. Przeprowadził eksperymenty z przeszczepianiem pojedynczych komórek teratokarcynoma, wykazując ich zdolność do tworzenia złożonych guzów zawierających różne typy tkanek. (9)

W kolejnych pracach Pierce zaprezentował teorię, że nowotwory mają hierarchiczną organizację podobną do normalnych tkanek, z komórkami macierzystymi na szczycie hierarchii. Jego eksperymenty, wykazały, że komórki nowotworowe mogą być indukowane do różnicowania się w bardziej dojrzałe typy komórek poprzez zastosowanie różnych czynników chemicznych. Przedstawione możliwości różnicowania komórek macierzystych zapoczątkowały nowe podejście do leczenia nowotworów, polegające na indukowaniu

różnicowania komórek nowotworowych w kierunku komórek o mniejszym potencjale proliferacyjnym. (10,11)

### *2.1.3 Hematopoetyczne Komórki Macierzyste (HSCs).*

W latach 60. XX wieku, Ernest McCulloch i James Till z Uniwersytetu w Toronto w Kanadzie nawiązując i kontynuując wspomnianą wcześniej koncepcję Maximowa (4) przeprowadzili przełomowe badania nad hematopoetycznymi komórkami macierzystymi (HSCs). Dowiedli, że komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego myszy mają zdolność do różnicowania się w różne typy komórek krwi, co potwierdziło ich multipotencjalność. Ich badania były kluczowe dla zrozumienia hematopoezy i stały się fundamentem dla dalszych badań nad zastosowaniem terapeutycznym komórek macierzystych w hematologii oraz dały podstawę zrozumienia podstaw terapii opartej na przeszczepie szpiku. (12)

### *2.1.4 Zarodkowe Komórki Macierzyste (ESCs).*

W latach 80. XX wieku dwa niezależne zespoły badawcze, kierowane przez Martina Evansa i Matthew Kaufmana oraz Gail Martin, wyizolowały pierwsze mysie embrionalne komórki macierzyste (ESCs).

W 1981 roku oba zespoły opublikowały wyniki swoich badań, w których opisały metodę izolacji i hodowli embrionalnych komórek macierzystych z mysich zarodków. Ich badania wykazały, że te komórki mają zdolność do nieograniczonego samoodnawiania się oraz różnicowania w różne typy komórek somatycznych. (13,14)

W 1998 roku, James Thomson, jako pierwszy wyizolował ludzkie embrionalne komórki macierzyste (hESCs), co było kolejnym przełomowym odkryciem w dziedzinie badań nad komórkami macierzystymi. (15) Badania Thomsona niosły ze sobą wiele kontrowersji etycznych, które miały swój wydzźwięk zarówno w kręgach politycznych jak i naukowych. Najważniejszym punktem debaty było to, że izolacja hESC wymagała zniszczenia ludzkich embrionów, które były zazwyczaj pozyskiwane z nadmiarowych zarodków powstałych w wyniku procedur zapłodnienia in vitro (IVF). Pomimo tych kontrowersji, badania nad hESC przyczyniły się do znacznego postępu w dziedzinie medycyny regeneracyjnej, modelowania chorób i odkrywania leków. (16) Dopiero publikacje noblisty Shinya Yamanaki i jego zespołu z 2007 roku zaprezentowały alternatywny sposób pozyskiwanie pluripotencjalnych komórek macierzystych. (17)



### 2.1.5 Indukowane Pluripotencjalne Komórki Macierzyste (iPSCs).

Pierwsze kluczowe odkrycia dotyczące indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) miały miejsce w latach 2006-2007 i były ogromnym przełomem w dziedzinie biologii komórkowej.

W 2006 roku japoński naukowiec Shinya Yamanaka i jego zespół z Uniwersytetu w Kioto po raz pierwszy zdołali przekształcić dorosłe komórki somatyczne myszy w komórki pluripotencjalne. (18) W swojej pracy autorzy wykazali, że zróżnicowane, dojrzałe komórki mogą zostać przeprogramowane do stanu przypominającego komórki embrionalne poprzez wprowadzanie specyficznych czynników transkrypcyjnych. Podczas badań autorzy wybrali 24 geny jako kandydatów na czynniki indukujące pluripotencję w dorosłych komórkach somatycznych, bazując na wcześniejszych doświadczeniach i hipotezie, że czynniki te odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu tożsamości komórek ESCs. Do eksperymentów użyto fibroblastów zarodkowych myszy (MEFs) oraz dorosłych fibroblastów myszy. Wybrane geny wprowadzono do fibroblastów myszy za pomocą retrowirusów.

W toku badań cztery zidentyfikowano cztery czynniki transkrypcyjne, jako kluczowe i niezbędne do indukcji pluripotencji w komórkach somatycznych oraz utrzymania pluripotencji i samoodnowy komórek macierzystych:

- Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4),
- Sox2 (SRY-box containing gene 2),
- c-Myc (Myelocytomatosis viral oncogene homolog),
- Klf4 (Kruppel-like factor 4).

Otrzymane komórki, nazwane indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (iPSCs), wykazywały morfologię i właściwości wzrostu podobne do zarodkowych komórek macierzystych (ESCs), a także ekspresję markerów komórek ESCs. Po przeszczepieniu podskórnym do myszy, iPSCs tworzyły guzy zawierające tkanki ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Po wstrzyknięciu do mysich blastocyst, iPSCs przyczyniały się do rozwoju zarodków myszy. Wyniki dowodziły, że pluripotencjalne komórki macierzyste mogą być bezpośrednio generowane z kultur fibroblastów.

Wyprowadzone iPSCs wykazywały morfologię i właściwości wzrostu podobne do komórek ESCs oraz ekspresję genów markerowych komórek ESCs. Analizy RT-PCR i

sekwencjonowania genomu bisulfitowego (technika używana do analizy metylacji DNA) potwierdziły, że promotory genów Oct3/4 i Nanog były częściowo zdemetylowane w iPSCs, co jest również charakterystyczne dla komórek ESCs. Wskazywało to na częściową demetylację tych promotorów podczas samego reprogramowania, co jest kluczowe dla aktywacji ekspresji genów pluripotencji. Stopień metylacji tych promotorów w iPSCs był pośredni między stanem w komórkach ESCs (niska metylacja), a MEFs (wysoka metylacja). Na tej podstawie stwierdzono, że iPSCs są podobne, ale nie identyczne epigenetycznie z komórkami ESCs w zakresie ekspresji genów regulujących pluripotencję.

### 2.1.6 Ludzkie indukowane Pluripotencjalne Komórki Macierzyste (hiPSCs).

W 2007 Takahashi et al. opublikowali pracę opisującą udane przeprogramowanie zróżnicowanych komórek somatycznych dorosłego człowieka do stanu pluripotencjalnego za pomocą, zdefiniowanych w poprzednich badaniach, czterech czynników transkrypcyjnych: Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc. (17) Uzyskane ludzkie komórki hiPSCs były podobne (choć nie identyczne) do ludzkich embrionalnych komórek macierzystych (hESCs) pod względem morfologii, proliferacji, antygenów powierzchniowych, ekspresji genów, statusu epigenetycznego specyficznych genów pluripotencjalnych oraz aktywności telomerazy. Komórki te mogły różnicować się w typy komórek wszystkich trzech listków zarodkowych zarówno in vitro, jak i w teratomach.

Aby uzyskać hiPSCs, zoptymalizowano metody transdukcji retrowirusowej w ludzkich fibroblastach skóry (HDFs). Geny kodujące czynniki transkrypcyjne zostały dostarczone za pomocą retrowirusów. Wektory te integrują się z genomem komórek gospodarza, co prowadzi do trwałej ekspresji tych genów. Jednakże, ta metoda niesie ze sobą ryzyko mutagenyzy insercyjnej, co może prowadzić do potencjalnych niepożądanych skutków, takich jak nowotworzenie.

Wyprowadzone hiPSCs wykazywały ekspresję markerów specyficznych dla hESCs, takich jak SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA-2-49/6E oraz NANOG. Sekwencjonowanie genomu bisulfitowego oraz analizy modyfikacji histonów potwierdziły charakterystyczne dla hESCs wzory metylacji i demetylacji histonów w promotorach tych genów.

Uzyskane hiPSCs charakteryzowały się wysoką aktywnością telomerazy i czasem podwojenia populacji porównywalnym do hESCs.

W ten sposób dowiedziono, że hiPSCs mogą być generowane z dorosłych ludzkich fibroblastów za pomocą czterech zdefiniowanych czynników. Uzyskane hiPSCs były podobne do hESCów pod wieloma względami, co otworzyło nowe możliwości w badaniach nad chorobami, umożliwiło tworzenie platform komórkowych poświęconych testowaniu leków i zrodziło nowe możliwości w medycynie regeneracyjnej.

Obie prace zespołu Yamanaki stanowiły fundament dla dalszych badań nad iPSC. Odkrycie, że zaledwie cztery czynniki mogą przeprogramować komórki somatyczne do stanu pluripotencjalnego, zrewolucjonizowało podejście do terapii komórkowych i modelowania chorób czyniąc perspektywę ich zastosowania w codziennej praktyce na szeroką skalę mniej odległą. Niewątpliwy wkład w rozwój nauki Yamanaki został uhonorowany nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2012 roku, którą otrzymał wspólnie z Johnem Gurdonem. (19) Warto również odnotować, że w 2007 roku James Thomson, naukowiec, który jako pierwszy wyizolował hESCów, również opracował metodę wytwarzania hiPSC, działając niezależnie, lecz jego publikacja ujrzała światło dzienne później. (20)

### *2.1.7 Od wyprowadzenia hiPSCs do terapii komórkowych.*

Odkrywanie potencjału komórek macierzystych było procesem stopniowym, który trwał przez wiele dekad.

Każde z tych odkryć przyczyniło się do lepszego zrozumienia biologii komórek macierzystych i otworzyło nowe możliwości w medycynie regeneracyjnej i terapii komórkowej. Badania nad komórkami macierzystymi nadal intensywnie się rozwijają znajdując im nowe zastosowania. Warto wspomnieć o omówionych szerzej w dyskusji, kolejnych kamieniach milowych w możliwościach wykorzystania hiPSCs, takich jak tworzenie organoidów, zastosowania inżynierii genetycznej na hiPSCs, czy wreszcie wprowadzenia terapii komórkowych, w tym terapii spersonalizowanych opartych na komórkach macierzystych. Najważniejsze wydarzenia chronologicznie przedstawiono w Tabeli 1. (21)

<b>Rok</b>	<b>Wydarzenie</b>	<b>Opis</b>
1908-1909	Koncepcja komórek macierzystych krwi	Alexander Maximow zaproponował istnienie wspólnej komórki macierzystej dla wszystkich typów komórek krwi.
1961	Odkrycie krwiotwórczych komórek macierzystych	James Till i Ernest McCulloch udowodnili istnienie krwiotwórczych komórek macierzystych u myszy.
1963	Badania nad teratokarcynoma	Leroy Stevens i Barry Pierce prowadzili badania nad teratokarcynoma, które przyczyniły się do zrozumienia pluripotencji.
1981	Izolacja mysich embrionalnych komórek macierzystych	Martin Evans i Matthew Kaufman oraz niezależnie, Gail Martin wyizolowali pierwsze mysie embrionalne komórki macierzyste.
1998	Izolacja ludzkich embrionalnych komórek macierzystych	James Thomson i jego zespół wyizolowali pierwsze ludzkie embrionalne komórki macierzyste.
2006	Odkrycie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs)	Shinya Yamanaka i jego zespół opracowali metodę reprogramowania dojrzałych komórek somatycznych do stanu pluripotencji, tworząc iPSCs.
2007	Generowanie ludzkich iPSCs	Zespoły Yamanaki i Thomsona niezależnie wygenerowały ludzkie iPSCs.

Rok	Wydarzenie	Opis
2010-2012	Bezpośrednie przeprogramowanie komórek	Odkrycie możliwości bezpośredniego przeprogramowania jednego typu komórek somatycznych w inny, z pominięciem stanu pluripotencji.
2013	Klonowanie ludzkich embrionalnych komórek macierzystych	Shoukhrat Mitalipov i jego zespół stworzyli pierwsze ludzkie embrionalne komórki macierzyste poprzez transfer jądra komórki somatycznej.
2014-2016	Organoidy	Rozwój technologii organoidów, trójwymiarowych struktur tkankowych wyhodowanych z komórek macierzystych.
2017-2018	Udoskonalenie metod edycji genów w komórkach macierzystych	Zastosowanie technologii CRISPR/Cas9 do precyzyjnej edycji genów w komórkach macierzystych.
2018-2020	Rozwój terapii komórkowych	Pierwsze zatwierdzone terapie z wykorzystaniem komórek macierzystych w leczeniu niektórych chorób.

Tabela 1. Kamienie milowe w rozwoju komórek macierzystych. (21)

## ***2.2 Wyprowadzanie linii komórkowych hiPSC z komórek somatycznych.***

W tym podrozdziale przedstawiono krótką charakterystykę metod i badań znajdujących aktualnie zastosowanie w wyprowadzaniu wystandaryzowanej linii komórkowej hiPSC z

komórek somatycznych. Część z nich została wykorzystana w przytoczonych później wynikach.

### 2.2.1 Reprogramowanie.

Metody reprogramowania komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych znacząco ewoluowały od czasu przełomowego odkrycia Yamanaki. Aktualnie w procesie reprogramowania można sięgnąć do różnych metod, różniących się możliwościami, bezpieczeństwem, kosztem i możliwością ewentualnej implementacji w praktyce klinicznej. (22) Najpopularniejszymi metodami reprogramowania pozostają wciąż te, z użyciem wektorów wirusowych, jednak dostępne są również metody oparte na wykorzystaniu wektorów niewirusowych i transpozonów. Wektory wirusowe, takie jak lentiwirusy i retrowirusy, oferują efektywne dostarczanie genów, ale niosą niebezpieczeństwo dotyczące potencjalnej mutagenezy insercyjnej. (23) Wektory niewirusowe, takie jak plazmidy i syntetyczne mRNA, nie wiążą się z takimi niebezpieczeństwami, natomiast mogą wymagać wyższych stężeń dla skutecznego reprogramowania. (24) Transpozony, takie jak piggyBac (25) i Sleeping Beauty (26) zapewniają stabilniejszą integrację czynników reprogramujących, natomiast nadal mogą wprowadzać modyfikacje epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i modyfikacja histonów, które mogą wpływać na niestabilność i różnicowanie iPSC. (27)

Generowanie iPSC z komórek somatycznych wymaga delikatnej równowagi czynników reprogramujących i warunków hodowli. Nadekspresja czynników reprogramujących może zwiększać ryzyko niestabilności genomowej i tworzenia nowotworów. Dodatkowo, wybór stosowanego medium, suplementów i warunków hodowlanych odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu pluripotencji i zapobieganiu różnicowaniu komórek. (27)

### 2.2.2 Charakterystyka iPSC.

Charakterystyka iPSC jest kluczowym krokiem w zapewnieniu, że są one bezpieczne i zdadne do zastosowań naukowych lub klinicznych. Dzięki zastosowaniu kombinacji obrazowania komórek, markerów molekularnych, testów pluripotencji oraz oceny stabilności genomowej, badacze mogą zidentyfikować i wybrać linie iPSC, które są najbardziej odpowiednie do dalszych zastosowań. (28,29)

### *2.2.3 Analiza morfologiczna.*

Analiza morfologiczna obejmuje ocenę morfologii kolonii iPSC z użyciem obrazowania mikroskopowego. iPSC zazwyczaj tworzą zwarte, przypominające bruk kolonie, o wysokim stosunku objętości jądra do cytoplazmy. (30) Wizualizacja różnorodności morfologicznej kolonii iPSC za pomocą obrazowania, może oceniać stan hodowli i stanowić ważny element kontroli umiejętności i jakości. (30,31) Przyszłe podejścia mogą wykorzystywać komputerową analizę obrazów z użyciem sztucznej inteligencji oraz sieci neuronowych do rozpoznawania najlepszych klonów pluripotencjalnych oraz pomóc w przewidywaniu, analizowaniu i utrzymywaniu hodowli iPSC. (32,33)

### *2.2.4 Testy na obecność wektorów resztkowych oraz wykrywanie kontaminacji hodowli Mykoplazmą.*

W zależności od procesu reprogramowania, konieczne jest przeprowadzenie testów na eliminację lub obecność resztkowych wektorów reprogramujących. Długie utrzymywanie się wektorów zwiększa ryzyko insercji oraz wpływa na stabilność genetyczną. (27,29,34) W hodowli komórkowej, powinny być również przeprowadzane okresowo testy na obecność Mykoplasmy. Im wcześniej zostanie wykryte ewentualne zakażenie, tym łatwiej ograniczyć ryzyko ekspansji i szybciej można wdrożyć ewentualne antybiotyki do hodowli. (35)

### *2.2.5 Markery molekularne.*

Geny, które są ekspresjonowane w komórkach pluripotencjalnych, mogą być używane do identyfikacji i charakterystyki iPSC. Do najczęściej stosowanych markerów molekularnych dla iPSC należą: Oct4, Sox2, Nanog, Stage Specific Embryonic Antigen 4 (SSEA4). (34) Ekspresja tych genów może być oznaczana za pomocą immunofluorescencji, cytometrii przepływowej, RT-qPCR i analizy mikromacierzy. (28,36)

### *2.2.6 Testy funkcjonalne pluripotencji.*

Testy funkcjonalne pluripotencji komórek są używane do oceny zdolności iPSC do różnicowania się we wszystkie trzy listki zarodkowe. Do najczęściej stosowanych testów pluripotencji należą: formowanie ciałek embrioidalnych (zarodkowych, EB), testy różnicowania in vitro (ocena zdolności iPSC do różnicowania się w specyficzne typy komórek) oraz formowanie teratom. (29,37)

### *2.2.7 Ocena stabilności genomowej i mutacji.*

Analiza integralności genomowej powinna być przeprowadzana, aby zapewnić, że iPSC nie są podatne na nowotwory, nie nabyły mutacji lub zaburzeń architektury chromosomów, które wpłynęły na rozwój komórek i ich zastosowanie. Może ona obejmować różne metody, w tym: FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja in situ), analiza kariotypu, polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP), analiza telomerów, analiza metylacji DNA, sekwencjonowanie RNA, profilowanie genomowe na szeroką skalę (np. WGS, WES). (38–41)

### *2.2.8 Produkcja iPSC, kontrola jakości i biobankowanie.*

Koncepcja masowej produkcji iPSC zakłada standaryzowany, wysokoprzepustowy system produkcji linii iPSC. (42) Podejście to ma na celu usprawnienie procesu wytwarzania iPSC, obniżenie kosztów oraz poprawę spójności. (43) Jednakże, ustanowienie swego rodzaju „fabryk” iPSC wymaga przestrzegania rygorystycznych wytycznych dotyczących kontroli jakości, takich jak standardy Current Good Manufacturing Practice (cGMP). (28,40)

Biobankowanie obejmuje zbieranie, krioprezervację i archiwizację linii iPSC, do długoterminowego przechowywania i dystrybucji. (44) Odgrywa ono kluczową rolę w zachowaniu cennych zasobów na potrzeby przyszłych badań i zastosowań klinicznych, standaryzacji jakości iPSC oraz ułatwianiu współpracy między ośrodkami. (39) Warto podkreślić wkład różnych inicjatyw, takich jak hPSCreg (45), International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI) (46), International Society for Stem Cell Research (47), European Bank for induced Pluripotent Stem Cells (EBiSC) (44) i wielu innych w rozwój tej dziedziny biotechnologii oraz w zapewnianie wytycznych, zaleceń, możliwości ewidencji w celu kontroli jakości i standardów.

## **2.3 Zastosowanie iPSC w Chorobach Układu Oddechowego.**

Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzenia ludzkiego (hiPSC) stają się coraz częściej stosowanym narzędziem w badaniach nad chorobami układu oddechowego, oferując nowe, szerokie możliwości w modelowaniu chorób, badaniu patogenezy i patofizjologii oraz bezpiecznym opracowywaniu innowacyjnych terapii. (48) Poniżej przedstawiono główne nurty i sposoby wykorzystania hiPSC w obszarze chorób płuc. Poszczególne punkty zostały szerzej omówione w dyskusji.



### *2.3.1 Modelowanie Chorób Układu Oddechowego.*

Jednym z ważnych i obecnie często wykorzystywanych zastosowań hiPSC jest tworzenie modeli komórkowych różnych chorób, w tym chorób płuc. Dzięki zdolności do różnicowania się w komórki płucne, hiPSC mogą być używane do tworzenia funkcjonalnego nabłonka dróg oddechowych i wszystkich jego składowych, co pozwala prowadzić badania nad funkcją i patologią komórek nabłonka oddechowego. Jednak możliwości są aktualnie znacznie większe. Najnowsze technologie dają możliwość wyprowadzania organoidów płucnych z komórek hiPSC. (49) Są to modele które naśladują architekturę, strukturę i funkcję ludzkiego płuca. Jest to niezwykle cenne w badaniach nad patogenezą chorób płuc, takich jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), rak płuca czy mukowiscydoza. (50) Organoidy płucne pozwalają na badanie interakcji między komórkami, szlaków metabolicznych oraz testowanie nowych leków w warunkach bardziej zbliżonych i lepiej odzwierciedlających warunki rzeczywiste niż tradycyjne hodowle komórkowe. (51) Pozwala to na szczegółową, nieinwazyjną ocenę szeregu parametrów takich jak:

- Mechanizmy odpowiedzi na alergen i patogeny,
- Wpływ czynników środowiskowych i genetycznych,
- Modelowanie reakcji zapalnych i odpowiedzi immunologicznych,
- Ocena procesów włóknienia,
- Modelowanie uszkodzeń i regeneracji nabłonka oddechowego,
- Tworzenie modeli komórkowych zawierających genotyp danego pacjenta – zastosowanie w przyszłości przy wprowadzeniu medycyny spersonalizowanej. (52)

Hodowle komórkowe organoidów płucnych pochodzących z hiPSC dają także możliwość bezpiecznego testowania terapii genowych, przed ewentualnym ich wprowadzeniem w kolejne etapy badań klinicznych. (53)

### *2.3.2 Terapie z użyciem hiPSCs w Chorobach Układu Oddechowego.*

W kontekście regeneracji tkanki płucnej, hiPSC mogą różnicować się w specyficzne typy komórek płucnych, takie jak komórki nabłonka oskrzelowego i pęcherzykowego, co teoretycznie umożliwia regenerację uszkodzonej tkanki płucnej i przywrócenie prawidłowej funkcji oddechowej płuc. (54) Dzięki możliwości modyfikacji genetycznych, hiPSC mogą być

edytowane, eliminując mutacje, będące przyczyną danej jednostki chorobowej, a następnie dostarczane do pacjenta jako autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych (autologous stem cell transplantation, ASCT). (55) Autologiczne przeszczepienie komórek macierzystych minimalizuje ryzyko odrzutu przeszczepu i innych powikłań immunologicznych, ponieważ komórki pochodzą od tego samego pacjenta, co eliminuje problem niezgodności immunologicznej, który może wystąpić w przypadku przeszczepów allogenicznych. (56,57)

#### ***2.4 Podsumowanie.***

iPSCs są niewątpliwie przełomowym odkryciem, znajdującym zastosowanie między innymi w obszarze chorób układu oddechowego. Oferują ogromne możliwości jako platforma do badań nad chorobami płuc oraz mają potencjał do zrewolucjonizowania terapii tych chorób. Jako jedna z kluczowych technologii ostatnich lat, warto, aby była dostępna, wprowadzana i wykorzystywana w ośrodkach naukowych.

### **3 Cele Pracy.**

#### ***3.1 Cel główny.***

Celem głównym niniejszej pracy doktorskiej było wyprowadzenie i charakterystyka linii ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC) z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) od pacjentów z mukowiscydozą (CF) oraz przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP), w celu stworzenia zweryfikowanych modeli komórkowych do dalszych badań i zastosowań.

#### ***3.2 Cele szczegółowe.***

Celami szczegółowymi niniejszej pracy doktorskiej były:

- Opracowanie i optymalizacja protokołów generowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC) z mononuklearnych komórek krwi obwodowej (PBMC) pacjentów z CF i POChP przy użyciu nieintegrujących wektorów wirusowych Sendai,
- Ocena pluripotencji hiPSC poprzez immunobarwienie specyficznych markerów powierzchni komórkowej i markerów jądrowych,
- Badanie zdolności hiPSC do różnicowania się w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych (ektoderma, mezoderma, endoderma) poprzez różnicowanie *in vitro* i immunobarwienie specyficznych markerów,
  - Potwierdzenie tożsamości genetycznej hiPSC z komórkami dawcy poprzez analizę krótkich powtórzeń tandemowych (STR),
- Ocena stabilności genetycznej i epigenetycznej hiPSC poprzez badanie kariotypu i utraty egzogennych czynników reprogramujących,
- Analiza genetyczna wyprowadzonych linii hiPSC,
- Sporządzenie szczegółowej dokumentacji eksperymentalnej i analitycznej – przygotowanie komórek do dalszej pracy,
- Stworzenie biobanku zawierającego wyprowadzone linie komórkowe, który będzie wykorzystany do dalszych badań na wyprowadzonych liniach.

## 4 Materiał i Metody.

Wyrowadzone linie komórkowe hiPSC zostały oznaczone etykietami: CF001, CF002 oraz COPD001. Linie CF001 oraz COPD001 były procesowane jednocześnie. Linia CF002 była procesowana później, niektóre użyte przy niej techniki, odczynniki i metody zostały zmienione, aby poszerzyć wachlarz umiejętności. Aby zapewnić czytelność zdecydowano się oddzielić przedstawienie metod tych linii, choć część z nich jest tożsama ze sobą.

Linia CF001 została wyrowadzona od pacjenta chorującego na mukowiscydozę (ang. CF), w wyniku homozygotycznej mutacji: NM\_000492.3(CFTR):c.1521\_1523del (p.Phe508del).

Linia COPD001 została wyrowadzona od pacjenta chorującego na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP, ang. COPD) o stopniu ciężkim i wczesnym początku.

Linia CF002 została wyrowadzona od pacjentki z heterozygotyczną mutacją NM\_000492.3(CFTR):c.1521\_1523del (p.Phe508del), prezentującej objawy CF.

Pacjenci zostali poinformowani o celu i przebiegu badań, wyrazili pisemną, świadomą zgodę na formularzach dostarczonych i zaakceptowanych przez Komisją Bioetyczną.

W celu zapewnienia anonimowości szczegółowe informacje o pacjentach zostały w pracy ograniczone. Dane te nie są przedmiotem analizy w niniejszej pracy.

### 4.1 Linia CF001 oraz COPD001.

#### 4.1.1 Izolacja, reprogramowanie PBMC i hodowla komórek.

PBMC (mononuklearne komórki krwi obwodowej) zostały wyizolowane z krwi za pomocą separacji gradientu gęstości z użyciem Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies, 07851) w probówkach do izolacji PBMC SepMate™ (STEMCELL Technologies, 85415). PBMC były hodowane i adaptowane na płytkach 24-dołkowych w medium StemPro™-34 SFM (Thermo Fisher, 10639011) z dodatkiem cytokin: 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL FLT-3, 20 ng/mL IL-3 i 20 ng/mL IL-6. Po 4 dniach komórki były liczone za pomocą automatycznego licznika komórek EVE™ z użyciem błękitu trypanowego, a następnie dostosowano objętości zawiesiny komórkowej do docelowej ilości komórek użytych do reprogramowania -  $2.5 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$  komórek. Przygotowano po dwie próbki z każdej linii. Objętość każdego wirusa została obliczona w celu osiągnięcia wymaganego docelowego MOI (Multiplicity of Infection), uwzględniając liczbę żywych komórek i informacje o mianie wirusa zawarte w Certyfikacie

Analizy (CoA) wektora reprogramującego CytoTune™ 2.0. PBMC były transdukowane nieintegrującymi wektorami wirusowymi Sendai, wykazującymi ekspresję Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc zgodnie z instrukcjami producenta (ThermoFisher Scientific, A16517). Po transdukcji komórki były hodowane przez 2 dni bez zmiany medium. Po dwóch dniach komórki były płukane, wirowane i przenoszone na płytki 12-dołkowe pokryte macierzą błony podstawnej Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific, A1413202) w kompletnym medium StemPro™-34 bez cytokin. Przez kolejne 2–4 dni komórki były utrzymywane z wymianą połowy objętości medium StemPro™-34 bez cytokin każdego dnia. Czwartego dnia komórki były adaptowane z medium StemPro™-34 do kompletnego medium mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies, 100-0276) przez zmianę połowy objętości medium każdego dnia. Następnie, zasiane PBMC były utrzymywane w medium mTeSR™ Plus. Komórki były monitorowane z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego odwróconego Eclipse Ts2-FL. Piętnastego dnia (COPD001) oraz dwudziestego czwartego dnia (CF001), zreprogramowane kolonie komórek o najlepszej morfologii były ręcznie dzielone, zbierane za pomocą pipet i zasiewane na płytki do hodowli komórek pokryte macierzą Geltrex™. Kolonie były ręcznie selekcjonowane i przenoszone na kolejne płytki za pomocą pipet przez następne 3 pasaże. Kolejne pasaże były przeprowadzane przez enzymatyczne dysocjowanie za pomocą roztworu Gibco™ Versene (Thermo Fisher, 15040066). Podczas pasażowania, po pobraniu komórek, do medium hodowlanego dodawano StemMACS™ Y27632 (Miltenyi Biotec B.V. & Co, 130-106-538), aby zwiększyć ekspansję i przeżywalność komórek po ich przeniesieniu. Hodowla komórek była prowadzona w temperaturze 37°C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Komórki były pasażowane w stosunku 1:5 - 1:10 co 2–3 dni przy użyciu roztworu Versene (Thermo Fisher Scientific, 15040066). Zamrażanie do biobankowania było przeprowadzane z użyciem Bambanker (NIPPON Genetics EUROPE, BB01).

#### *4.1.2 Immunocytochemia.*

Pluripotencja uzyskanych iPSC była oznaczana w komórkach w 16. (CF001) i 18. (COPD001) pasażu za pomocą zestawu do immunocytochemii Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (Thermo Fisher Scientific, A24881). Potencjał komórek iPSC do różnicowania w kierunku trzech listków zarodkowych był badany za pomocą zestawu 3-Germ Layer Immunocytochemistry Kit (Thermo Fisher Scientific: A25538) (Użyte przeciwciała są wyszczególnione w Tabeli 2). Obrazowanie immunofluorescencji było wykonane i

analizowane za pomocą platformy Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 High Content Analysis (HCA).

#### *4.1.3 Wykrywanie genomu wirusa Sendai.*

Po 22 pasażach linii iPSC były testowane pod kątem eliminacji wirusa Sendai i egzogennych czynników transkrypcyjnych. Całkowite RNA zostało wyizolowane z peletów komórkowych iPSC za pomocą zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Eurx, E3598) i przepisane z całkowitego RNA na jednoniciowe cDNA za pomocą zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814). Wykrywanie wirusa Sendai metodą RT-qPCR było przeprowadzane przy użyciu TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, 4369016) i zestawu TaqMan iPSC Sendai Detection Kit (Applied Biosystems, A13640) zgodnie z protokołem producenta (reakcja była przeprowadzana na systemie QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-dołkowym, 0.2 mL). Całkowite RNA do kontroli pozytywnej zostało uzyskane z peletów komórkowych wykonanych i zabezpieczonych bezpośrednio po transdukcji wirusem Sendai.

#### *4.1.4 Analiza mutacji linii CF001.*

W celu weryfikacji mutacji F508del/F508del w genie CFTR, gDNA zostało wyizolowane z peletów komórkowych iPSC w 22. pasażu, przy użyciu zestawu GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (Eurx, kat: E3551). Analiza spektrofotometryczna stężenia DNA została przeprowadzona za pomocą spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, ND-2000). Amplifikacja matrycy genomowego DNA, sekwencjonowanie i analiza danych zostały wykonane przez firmę Genomed S.A. Polska.

#### *4.1.5 Różnicowanie do trzech listków zarodkowych.*

Różnicowanie w kierunku trzech listków zarodkowych zostało przeprowadzone na komórkach oddzielonych w 17. (CF001) i 18. (COPD001) pasażu przy użyciu zestawu STEMdiff™ Trilineage Differentiation Kit (STEMCELL Technologies, 05230).

#### *4.1.6 Kariotypowanie.*

Kariotypowanie zostało wykonane w 16. pasażu metodą prążkowania GTG zgodnie ze standardowymi procedurami przez Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska. Zapis kariotypu został sformułowany na podstawie ISCN 2020 (Międzynarodowy System Nomenklatury Cytogenetyki Człowieka).

#### *4.1.7 Genotypowanie krótkich powtórzeń tandemowych (STR).*

Genotypowanie STR zostało przeprowadzone w 16. (CF001) i 18. (COPD001) pasażu przez Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska, przy użyciu zestawu GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, 4476135). Amplifikowano 22 loci STR oraz locus płci - Amelogeninę. Wyniki uzyskano przy użyciu analizatora genetycznego 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) i oprogramowania Familias v3.2.

#### *4.1.8 Wykrywanie Mykoplazmy.*

Brak zanieczyszczenia hodowli komórkowych mykoplazmą oceniano okresowo metodą qPCR za pomocą zestawu Venor®GeM qOneStep (MINERVA Biolabs, 11-91100), zgodnie z protokołem producenta (reakcję przeprowadzono na systemie QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-dółkowym, 0.2 mL).

### **4.2 Linia CF002.**

#### *4.2.1 Izolacja, reprogramowanie PBMC i hodowla komórek.*

PBMC (mononuklearne komórki krwi obwodowej) zostały wyizolowane z krwi za pomocą separacji gradientu gęstości z użyciem Lymphoprep™ (STEMCELL Technologies, 07851) w probówkach do izolacji PBMC SepMate™ (STEMCELL Technologies, 85415). PBMC były hodowane i adaptowane na płytkach 24-dółkowych w medium StemPro™-34 SFM (Thermo Fisher, 10639011) z dodatkiem cytokin: 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL FLT-3, 20 ng/mL IL-3 i 20 ng/mL IL-6. Po 4 dniach komórki były liczone za pomocą automatycznego licznika komórek EVE™ z użyciem błękitu trypanowego, a następnie dostosowano objętości zawiesiny komórkowej do docelowej ilości komórek użytych do reprogramowania -  $2.5 \times 10^5$  –  $5 \times 10^5$  komórek. Przygotowano dwie próbki. Objętość każdego wirusa została obliczona w celu osiągnięcia wymaganego docelowego MOI, wykorzystując liczbę żywych komórek i informacje o mianie wirusa zawarte w Certyfikacie Analizy (CoA) wektora reprogramującego CytoTune™ 2.0. PBMC były transdukowane nieintegrującymi wektorami wirusowymi Sendai, wykazującymi ekspresję Oct3/4, Sox2, Klf4 i c-Myc zgodnie z instrukcjami producenta (ThermoFisher Scientific, A16517). Po transdukcji komórki były hodowane przez 2 dni bez zmiany medium. Po dwóch dniach komórki były płukane, wirowane i przenoszone na płytki 24-dółkowe pokryte macierzą błony podstawnej Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor

Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific, A1413202) w kompletnym medium StemPro™-34 bez cytokin. Przez kolejne 2–4 dni komórki były utrzymywane ze wymianą połowy objętości medium StemPro™-34 bez cytokin każdego dnia. Czwartego dnia komórki były adaptowane z medium StemPro™-34 do kompletnego medium mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies, 100-0276) przez zmianę połowy objętości medium każdego dnia. Następnie, zasiane PBMC były utrzymywane w medium mTeSR™ Plus (do 12 pasażu), a następnie Essential 8™ Medium (Gibco™, Catalog number: A1517001). Komórki były monitorowane z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego odwróconego Eclipse Ts2-FL. Dwudziestego dnia, zreprogramowane kolonie komórek o najlepszej morfologii były ręcznie dzielone, zbierane za pomocą pipet i zasiewane na płytki do hodowli komórek pokryte macierzą Geltrex™. Kolonie były ręcznie selekcyjonowane i przenoszone na kolejne płytki (początkowo 12 dołkowe, następnie 6-dołkowe) za pomocą pipet przez następne 3 pasaże. Kolejne pasaże były przeprowadzane przez enzymatyczne dysocjowanie za pomocą roztworu Gibco™ Versene (Thermo Fisher, 15040066). Podczas pasażowania, po pobraniu komórek, do medium hodowlanego dodawano StemMACS™ Y27632 (Miltenyi Biotec B.V. & Co, 130-106-538), aby zwiększyć ekspansję i przeżywalność komórek po ich przeniesieniu. Hodowla komórek była prowadzona w temperaturze 37°C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Komórki były pasażowane w stosunku 1:5 - 1:10 co 2–3 dni przy użyciu roztworu Versene (Thermo Fisher Scientific, 15040066). Zamrażanie do biobankowania było przeprowadzane z użyciem Bambanker (NIPPON Genetics EUROPE, BB01) oraz roztworu zawierającego 90% Fetal Bovine Serum (Sigma 12103C) i 10% DMSO (Sigma D2650).

#### *4.2.2 Immunocytochemia.*

Pluripotencja uzyskanych iPSC była oznaczana w komórkach w 12 pasażu za pomocą zestawu do immunocytochemii Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (Thermo Fisher Scientific, A24881). Potencjał komórek iPSC do różnicowania w kierunku trzech listków zarodkowych było badane za pomocą zestawu R&D Systems Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit (#SC027B) (Użyte przeciwciała są wyszczególnione w Tabeli 2). Obrazowanie immunofluorescencji było wykonane i analizowane za pomocą platformy Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 High Content Analysis (HCA).



#### *4.2.3 Wykrywanie genomu wirusa Sendai.*

Po 12 pasażach linii iPSC były testowane pod kątem eliminacji wirusa Sendai. Całkowite RNA zostało wyizolowane z peletów komórkowych iPSC za pomocą zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (Eurx, E3598) i przepisane z całkowitego RNA na jednoniciowe cDNA za pomocą zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814). Wykrywanie wirusa Sendai metodą RT-qPCR było przeprowadzane przy użyciu TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, 4369016) i zestawu TaqMan iPSC Sendai Detection kit (Applied Biosystems, A13640) zgodnie z protokołem producenta (reakcja była przeprowadzana na systemie QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-dołkowym, 0.2 mL). Całkowite RNA do kontroli pozytywnej zostało uzyskane z peletów komórkowych wykonanych i zabezpieczonych bezpośrednio po transdukcji wirusem Sendai.

#### *4.2.4 Różnicowanie do trzech listków zarodkowych.*

Różnicowanie w kierunku trzech listków zarodkowych zostało przeprowadzone na komórkach oddzielonych podczas 12 pasażu przy użyciu zestawu R&D Systems Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit (#SC027B)

#### *4.2.5 Kariotypowanie.*

gDNA zostało wyizolowane z peletów komórkowych iPSC w 12. pasażu, przy użyciu zestawu GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit (Eurx, kat: E35510). Analiza spektrofotometryczna stężenia DNA została przeprowadzona za pomocą spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, ND-2000). Ocena kariotypu została wykonana z izolatu DNA z komórek w 12. pasażu metodą „Global Screening Array + Multi Disease content 24 v3 BeadChip” na aparacie Illumina iScan, przez Life&Brain GENOMICS, Bonn, Germany. Analizę genotypu wykonano w programie GenomeStudio V2.0.5

#### *4.2.6 Genotypowanie Krótkich Powtórzeń Tandemowych (STR).*

Genotypowanie STR zostało przeprowadzone w 12 pasażu przez Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska, przy użyciu zestawu GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, 4476135). Amplifikowano 22 loci STR oraz locus płci - Amelogeninę. Wyniki uzyskano przy użyciu analizatora genetycznego 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) i oprogramowania Familias v3.2.

#### 4.2.7 Wykrywanie Mykoplazmy.

Brak zanieczyszczenia hodowli komórkowych mykoplazmą oceniano okresowo za pomocą zestawu Venor®GeM qOneStep (MINERVA Biolabs, 11-91250), zgodnie z protokołem producenta (reakcję przeprowadzono na systemie QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-dołkowym, 0.2 mL).

Szczegółowa lista użytych przeciwciał i starterów została przedstawiona w Tabeli 2.

	<b>Przeciwciała użyte w oznaczeniach immunocytochemicznych</b>			
	<b>Przeciwciało (w j. Angielskim)</b>	<b>roztwór</b>	<b>Numer katalogowy #</b>	<b>RRID</b>
Markery pluripotencji (wszystkie linie)	Rabbit anti-OCT4	1:200	Thermo Fisher Cat# A24867	RRID: AB_2650999
	Mouse anti-SSEA4	1:100	Thermo Fisher Cat# A24866	RRID: AB_2651001
	Mouse anti-TRA-1-60	1:100	Thermo Fisher Cat# A24868	RRID: AB_2651002
	Rat anti-SOX2	1:100	Thermo Fisher Cat# A24759	RRID: AB_2651000
Przeciwciała drugorzędowe (wszystkie linie)	Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG3	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A24877	RRID: AB_2651008

	Przeciwciała użyte w oznaczeniach immunocytochemicznych			
	Przeciwciało (w j. Angielskim)	roztwór	Numer katalogowy #	RRID
	Alexa Fluor™ 488 donkey anti-rat	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A24876	RRID:AB_2651007
	Alexa Fluor™ 555 goat anti-mouse IgM	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A24871	RRID:AB_2651009
	Alexa Fluor™ 555 donkey anti-rabbit	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A24869	RRID:AB_2651006
Markery różnicowania w trzy listki zarodkowe (linia CF001, COPD001)	anti-TUJ1 (host: rabbit)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A25532	RRID:AB_2651003
	anti-AFP (host: mouse IgG1)	1:500	Thermo Fisher Scientific Cat# A25530	RRID:AB_2651004

	Przeciwciała użyte w oznaczeniach immunocytochemicznych			
	Przeciwciało (w j. Angielskim)	roztwór	Numer katalogowy #	RRID
	anti-SMA (host: mouse IgG2a)	1:200	Synaptic Systems Cat# A25531	RRID:AB_2651005
Przeciwciała drugorzędowe (linie CF001, COPD001)	Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG1	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A25536	RRID:AB_2651011
	Alexa Fluor™ 555 goat anti-mouse IgG2a	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A25533	RRID:AB_2651012
	Alexa Fluor™ 647 donkey anti-rabbit	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A25537	RRID:AB_2857990
Markery różnicowania w trzy listki zarodkowe (linia CF002)	Goat Anti-OTX2	1:200	R&D Systems Cat #963273	RRID: AB_2157172

	Przeciwciała użyte w oznaczeniach immunocytochemicznych			
	Przeciwciało (w j. Angielskim)	roztwór	Numer katalogowy #	RRID
	Goat Anti-SOX17	1:200	R&D Systems Cat #963121	RRID: AB355060
	Goat Anti-BRACHYURY	1:200	R&D Systems Cat #963427	RRID: AB_2200235
Przeciwciała drugorzędowe (linia CF 002)	Goat IgG NorthernLights™ NL557-conjugated Antibody	1:200	R&D Systems Cat # NL001	RRID: AB_663766

Tabela 2. Wykaz użytych przeciwciał.

	Startery użyte w badaniach		
	Cel	Długość	Forward/Reverse primer (5'-3')
<b>Eliminacja transgenów wirusa Sendai</b> (qPCR - TaqMan)	SeV	Amplicon Length: 59	Assay ID: Mr04269880_mr
	SEV-OCT3/4	Amplicon Length: 82	Assay ID: Mr04269878_mr

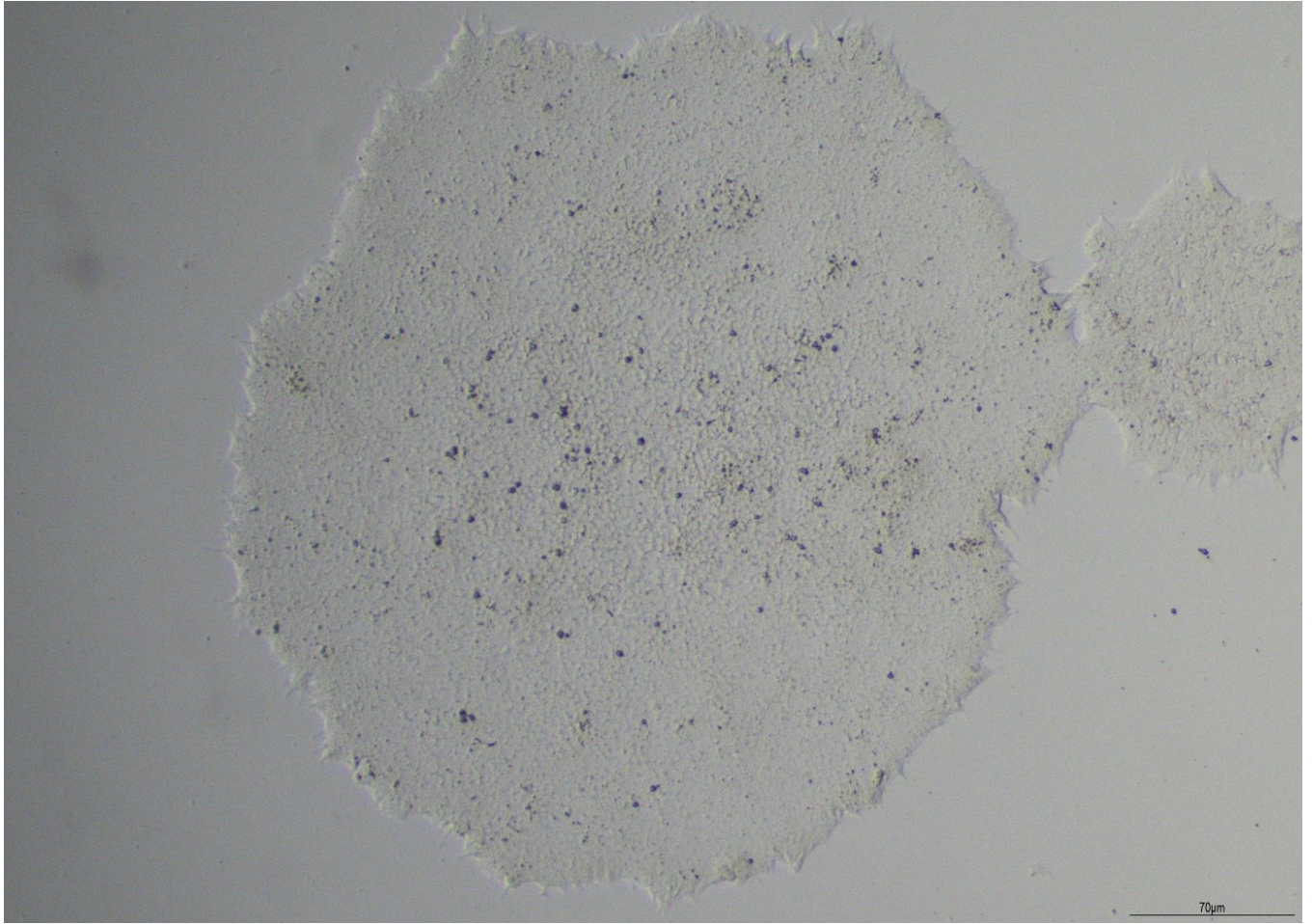
	Startery użyte w badaniach		
	Cel	Długość	Forward/Reverse primer (5'-3')
	SEV-cMYC	Amplicon Length: 89	Assay ID: Mr04269876_mr
	SEV-SOX2	Amplicon Length: 62	Assay ID: Mr04269881_mr
	SEV-Klf4	Amplicon Length: 74	Assay ID : Mr04269879_mr

Tabela 3. Wykaz użytych starterów.

## 5 Wyniki.

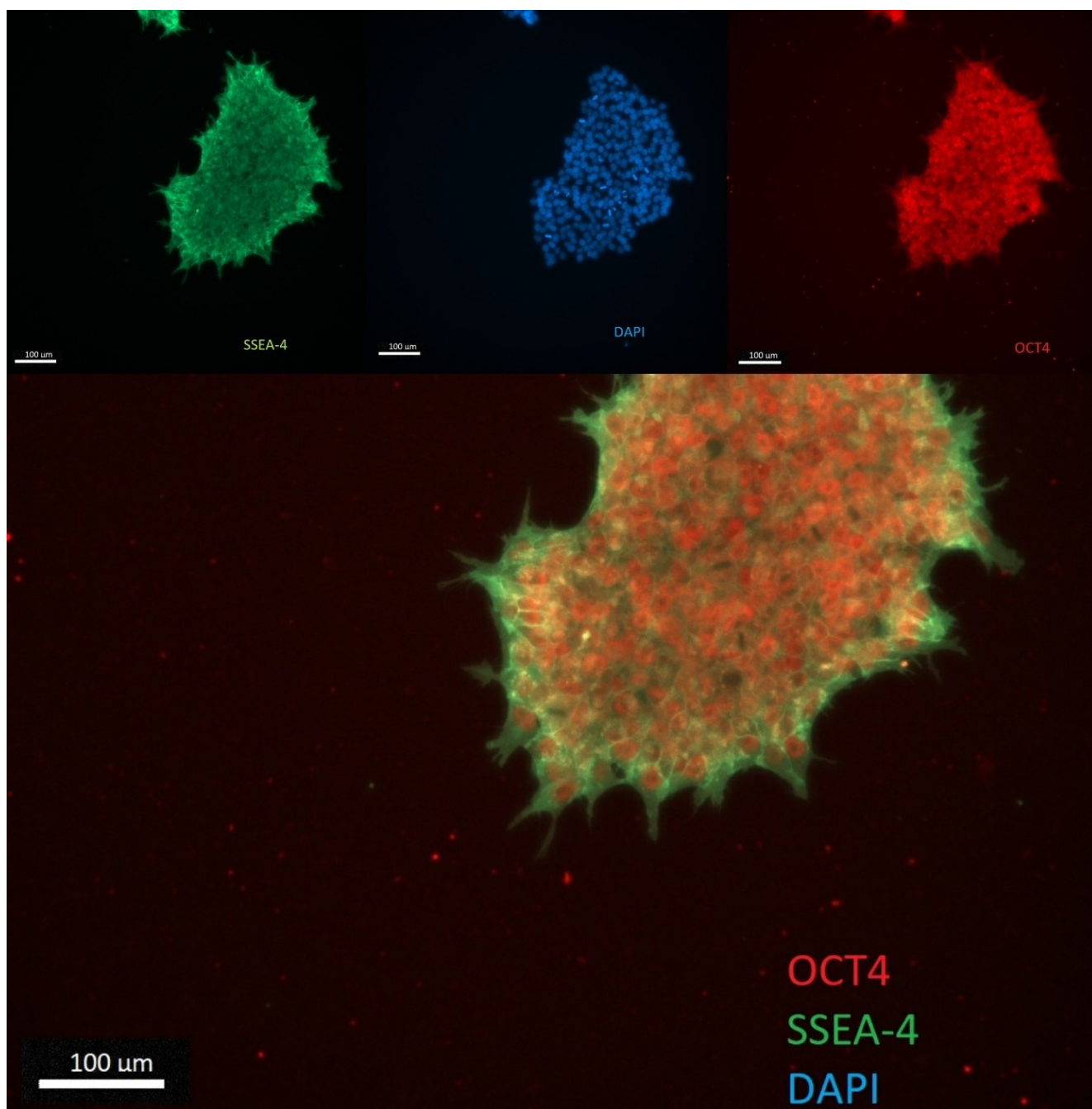
### 5.1 Linia hiPSC CF001.

Linie hiPSC CF001 wyprowadzono z PBMC wyizolowanych z krwi pobranej od 30-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej, pacjenta chorującego na CF, noszącego mutację F508del/F508del w genie CFTR. Linia iPSC została wygenerowana przy użyciu nieintegrującego zestawu do transdukcji wirusem Sendai CytoTune-iPS 2.0 (ThermoFisher Scientific, A16517), dostarczającego czynniki transkrypcyjne Yamanaki (OSKM): OCT4, SOX2, cMYC i KLF4. Po transdukcji wirusem Sendai, komórki były hodowane w warunkach bez podłoża odżywczego (ang. feeder free) przy użyciu Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific, A1413202) i przeniesione do medium mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies, 100-0276). Dwadzieścia cztery dni po transdukcji wirusem Sendai, zaobserwowano pierwsze kolonie iPSCs. Kolonie wykazały typową morfologię dla hiPSCs (Ryc. 1). Pluripotencję potwierdzono poprzez oznaczenie immunofluorescencyjne markerów powierzchni komórkowej SSEA4, TRA-1-60 oraz markerów jądrowych OCT4, SOX2 (Ryc 2,3) w komórkach znajdujących się na etapie pasażu numer 16. Po bezpośrednim różnicowaniu *in vitro* w kierunku trzech listków zarodkowych wykonano barwienie immunofluorescencyjne stosując marker ektodermalny (beta-III tubulina), marker mezodermalny (aktyna mięśni gładkich) i marker endodermalny (alfa-fetoproteina). Pozytywne barwienie wykazało potencjał pluripotencjalny tej linii iPSC (Ryc. 4). Utrata genów wirusa Sendai i egzogennych czynników reprogramujących została potwierdzona metodą RT-qPCR w pasażu numer 22 (Ryc. 5,6,7,8). Wyprowadzone hiPSC wykazały prawidłowy kariotyp (Ryc. 9). Analiza krótkich powtórzeń tandemowych (STR) wykazała, że ta linia iPSC miała taką samą tożsamość genetyczną jak linia komórek dawcy we wszystkich 22 analizowanych loci. Zanieczyszczenie mykoplazmą było oznaczane okresowo w medium hodowlanym metodą qPCR uzyskując wyniki negatywne. Sekwencjonowanie metodą Sangera wykazało homozygotyczną mutację Phe508del w genie CFTR w iPSC (Ryc. 10). Podsumowując, linia iPSC CF001 została pomyślnie wyprowadzona, jest pluripotenna i wykazuje potencjał wielokierunkowego różnicowania.

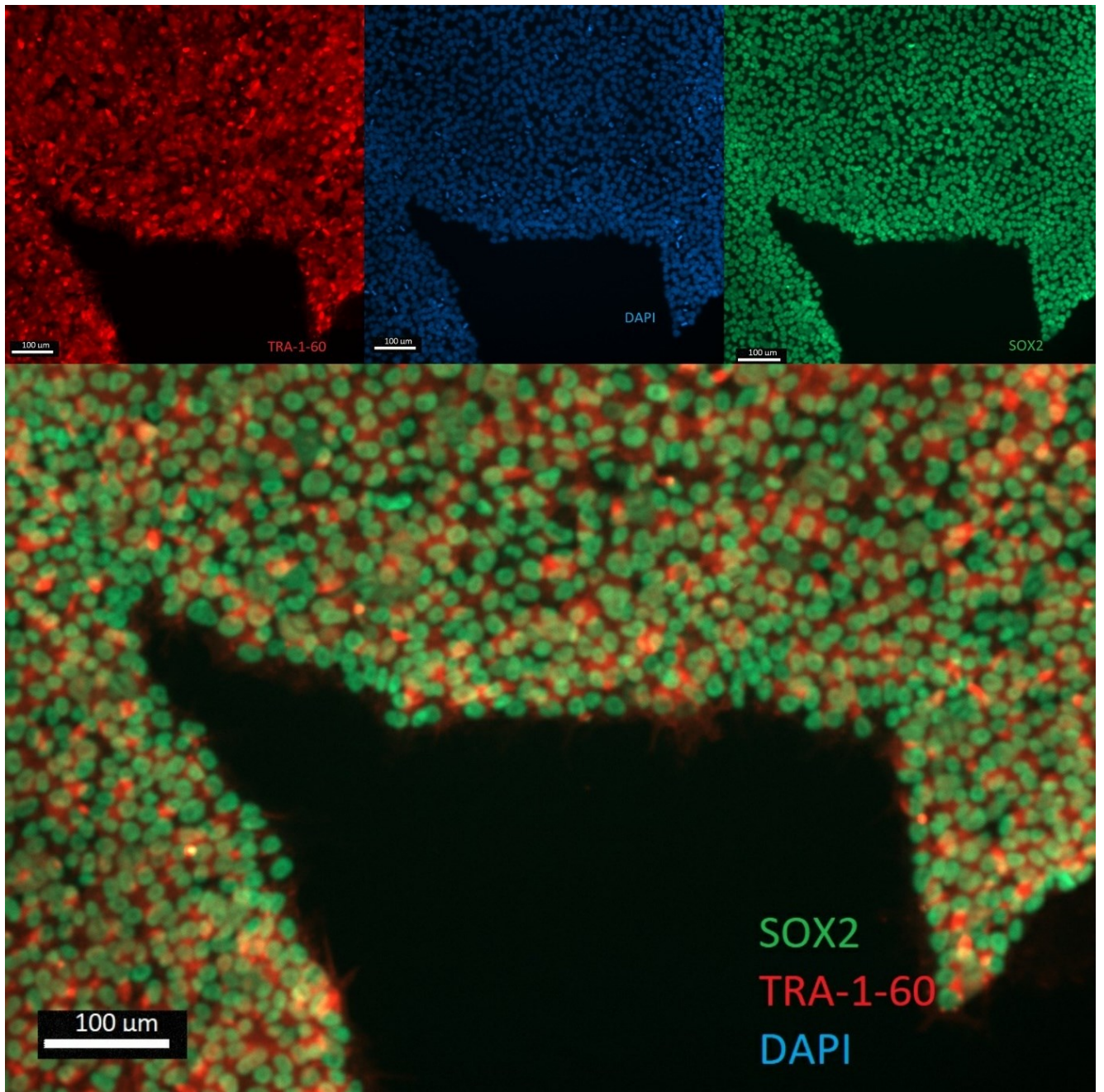


Rycina 1. Morfologia kolonii iPSC CF001.

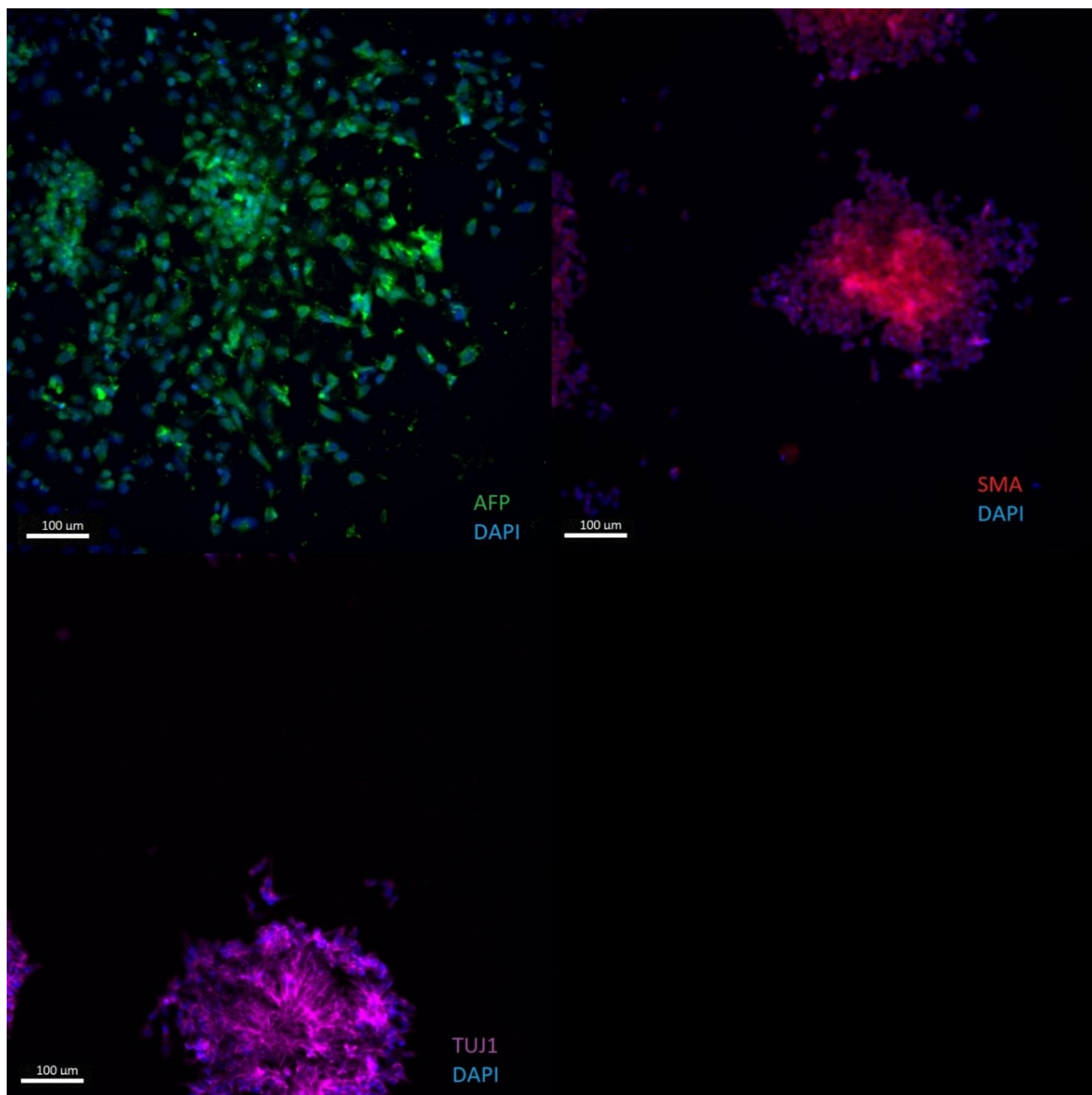




Rycina 2. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) CF001.



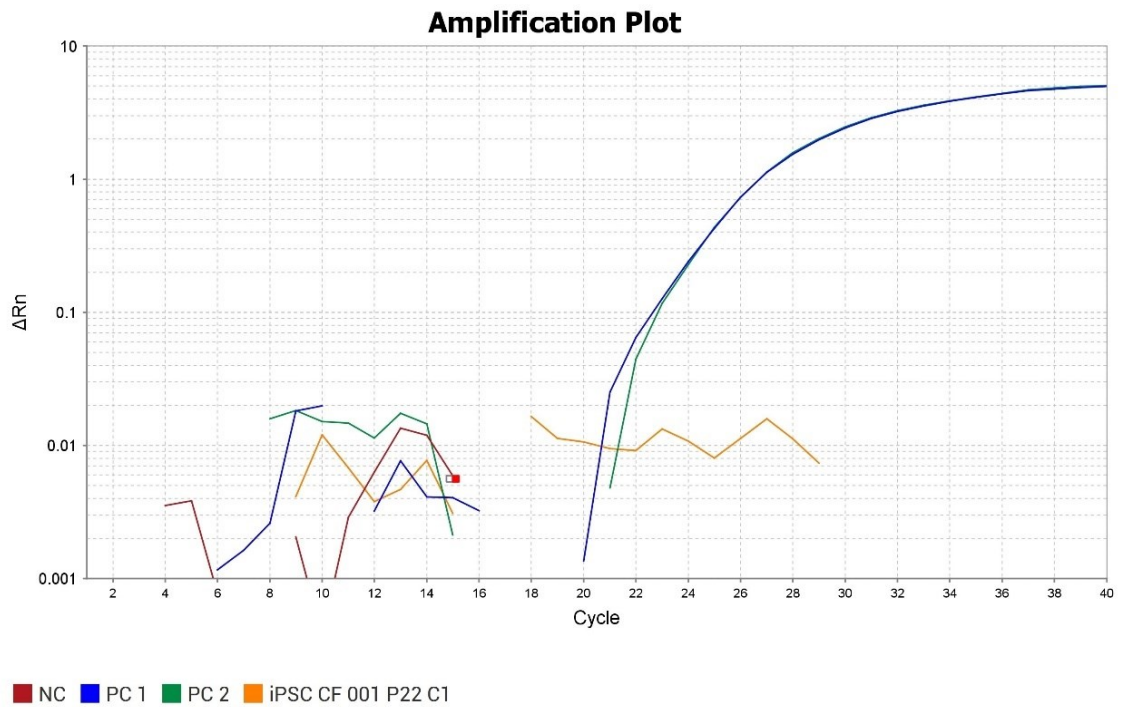
Rycina 3. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) CF001.



Rycina 4. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (AFP, SMA, TUJ1) CF001.

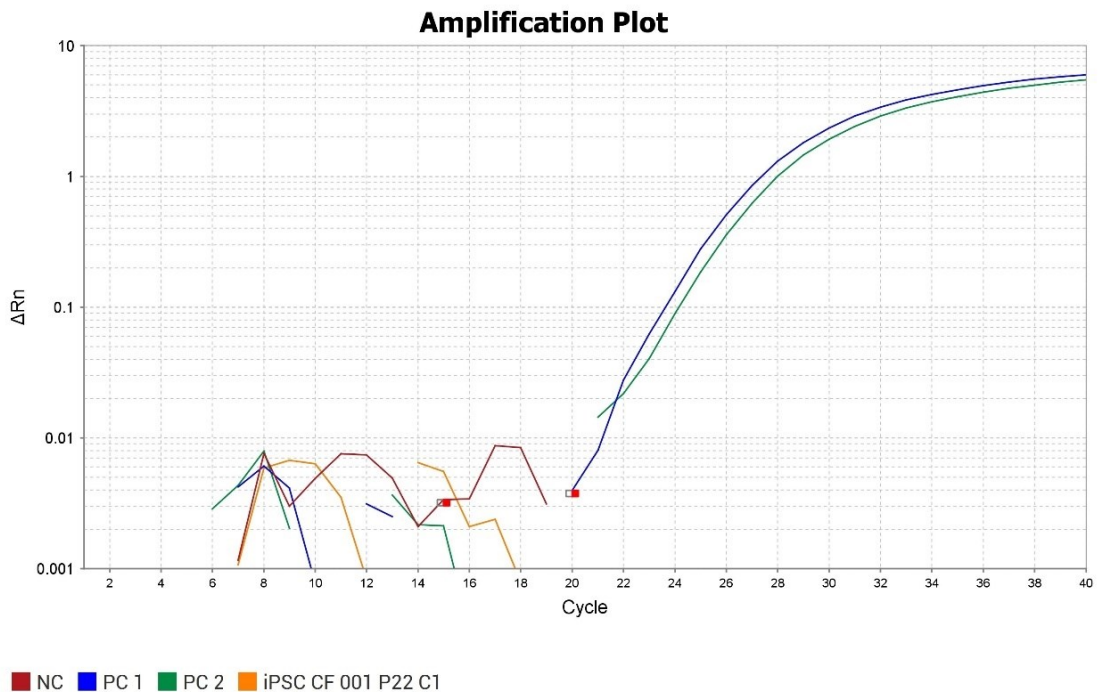


Sendai-cMyc



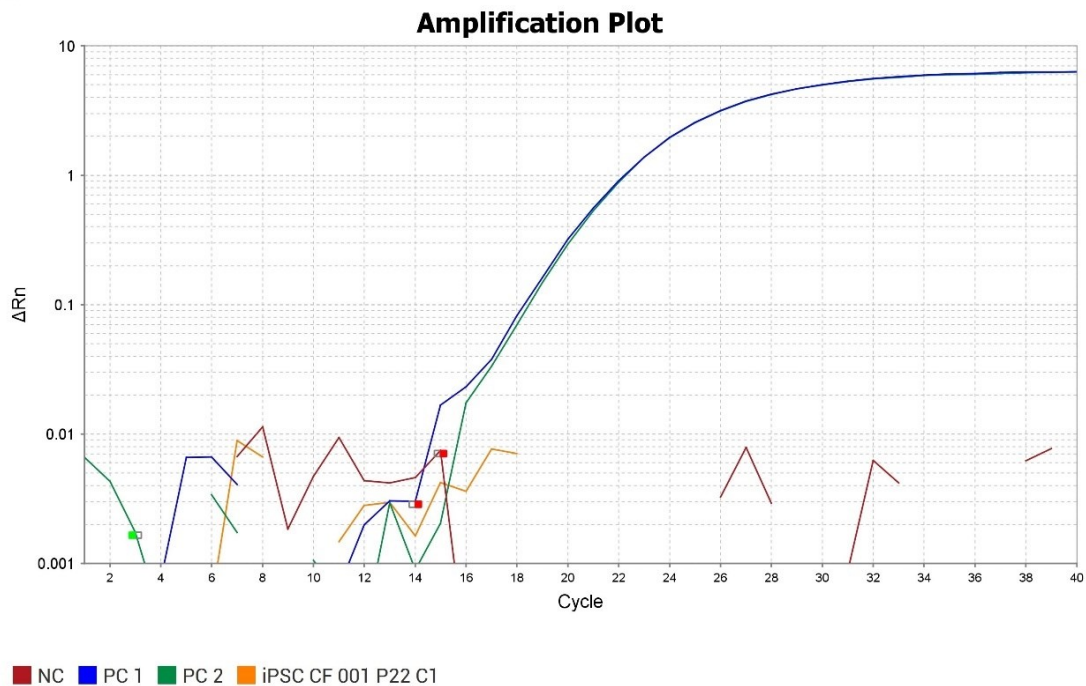
Rycina 5. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, CF001.

Sendai-OCT3/4



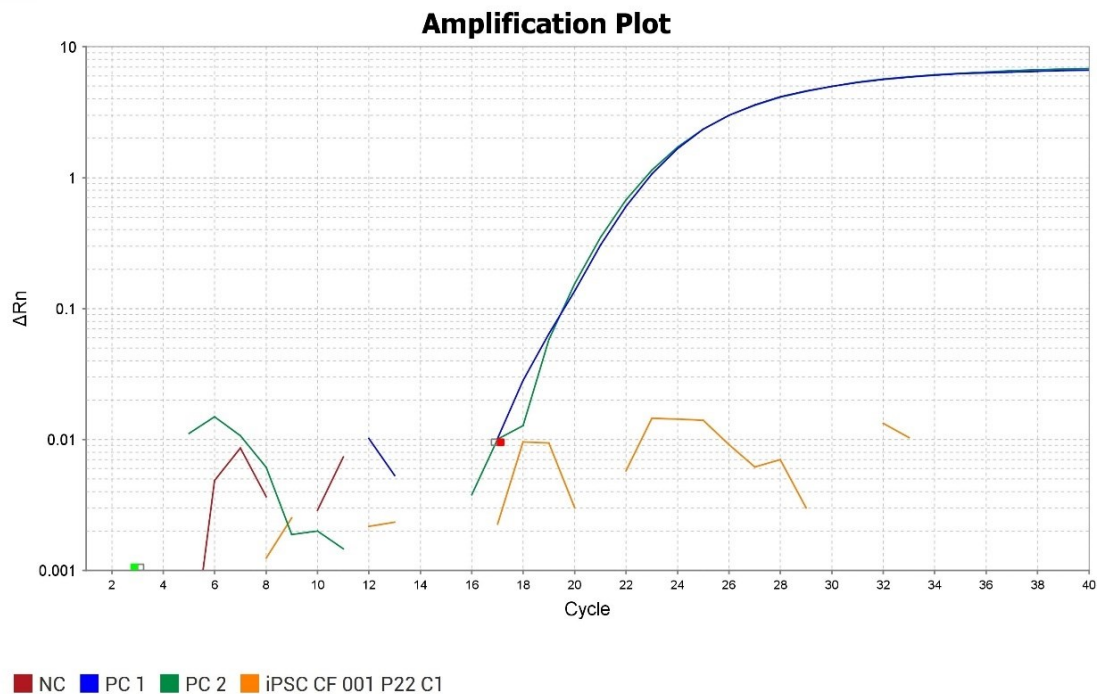
Rycina 6. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, CF001.

Sendai virus

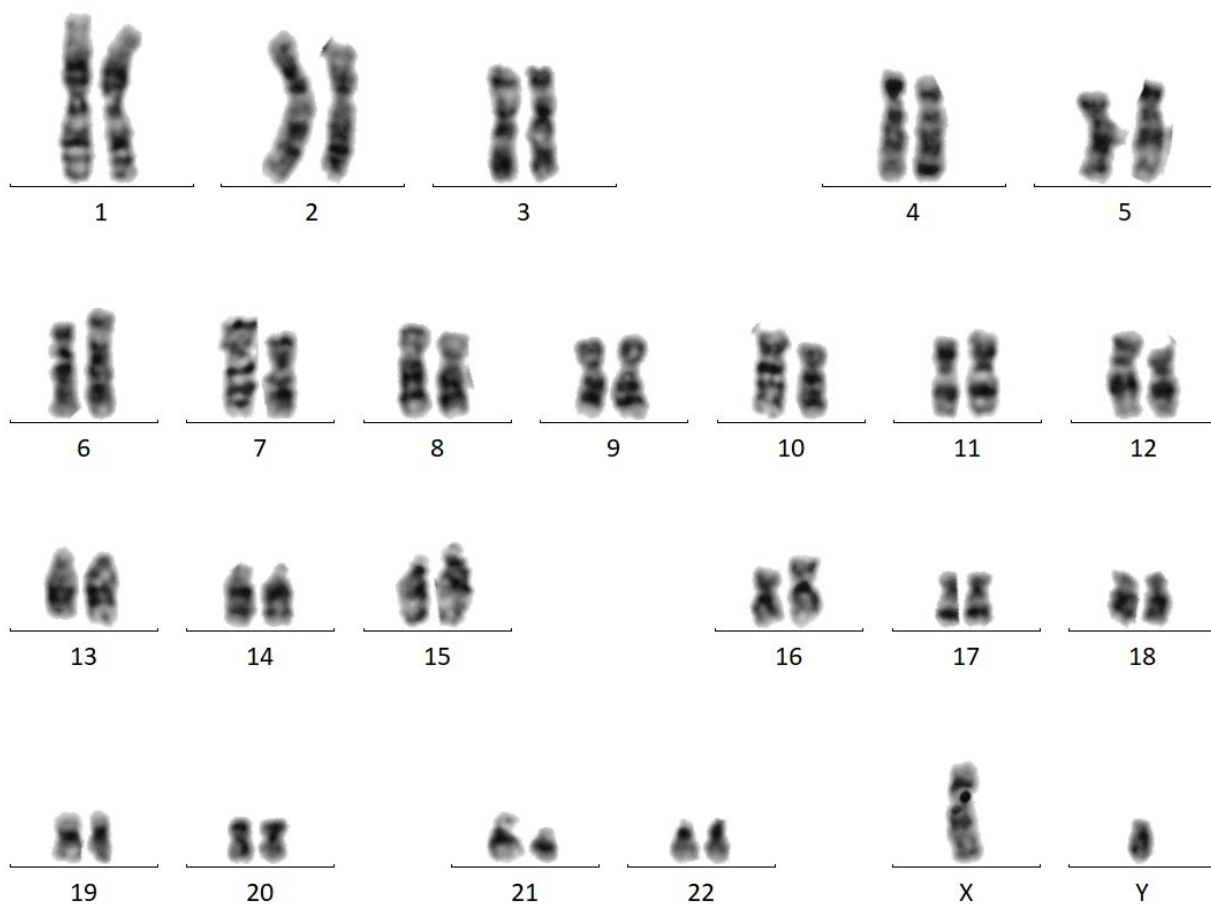


Rycina 7. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai CF001.

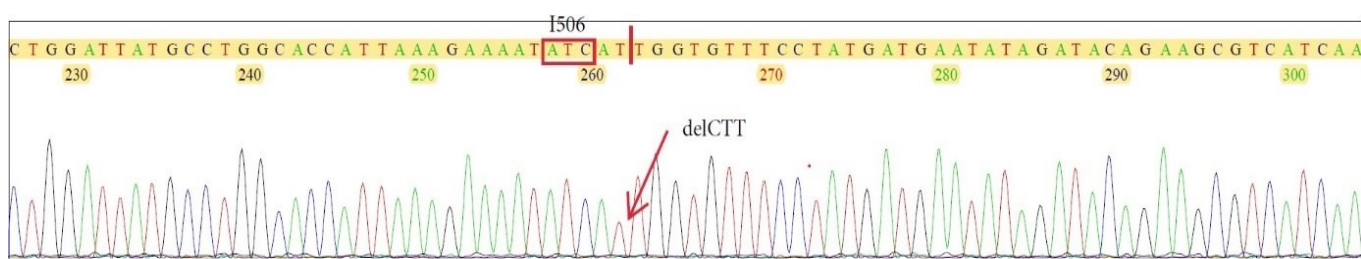
Sendai-SOX2



Rycina 8. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, CF001.



Rycina 9. Kariotyp CF001 (GTG).

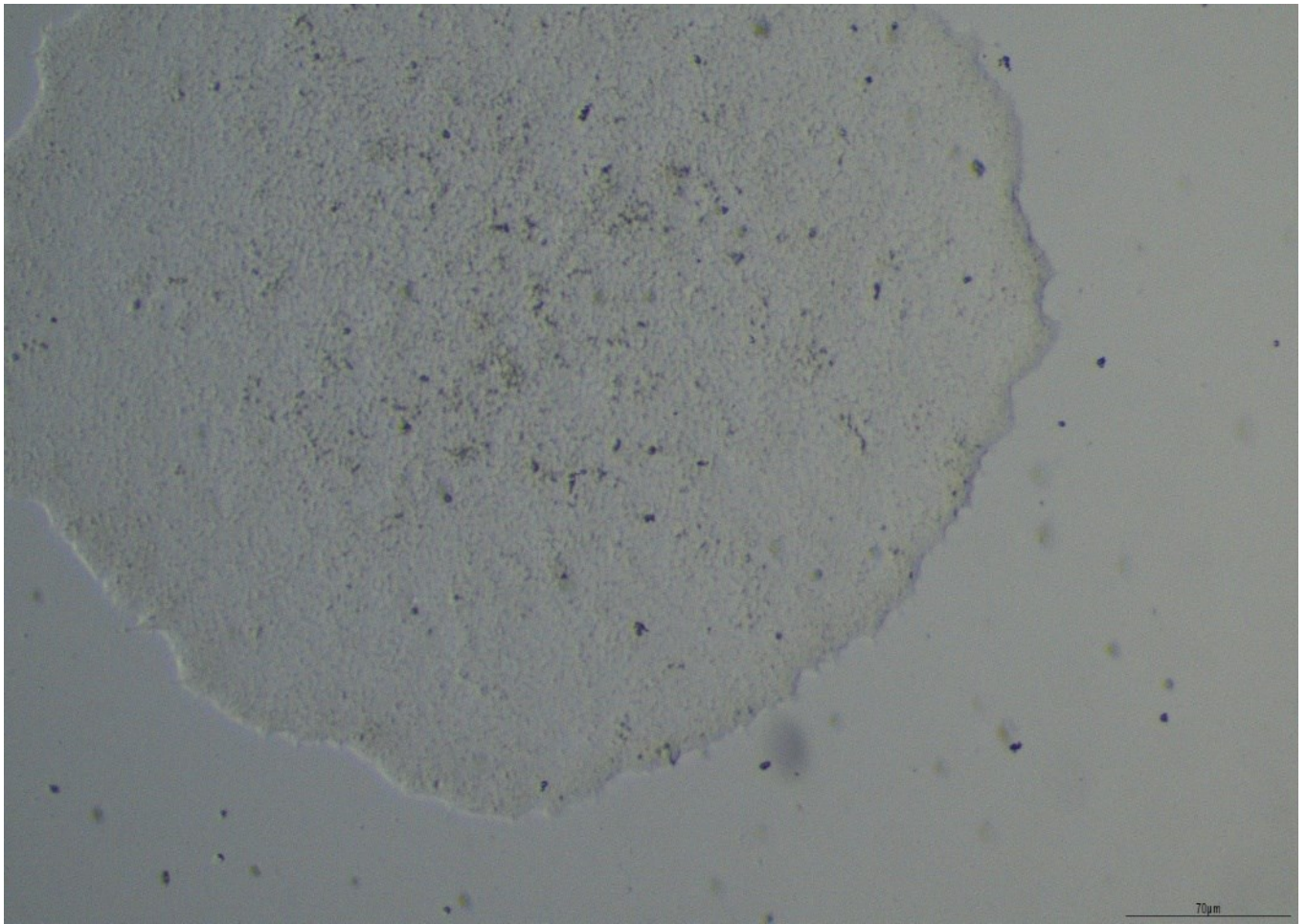


Rycina 10. Analiza mutacji del508 CF001 (sekwencjonowanie).

## 5.2 Linia hiPSC COPD001.

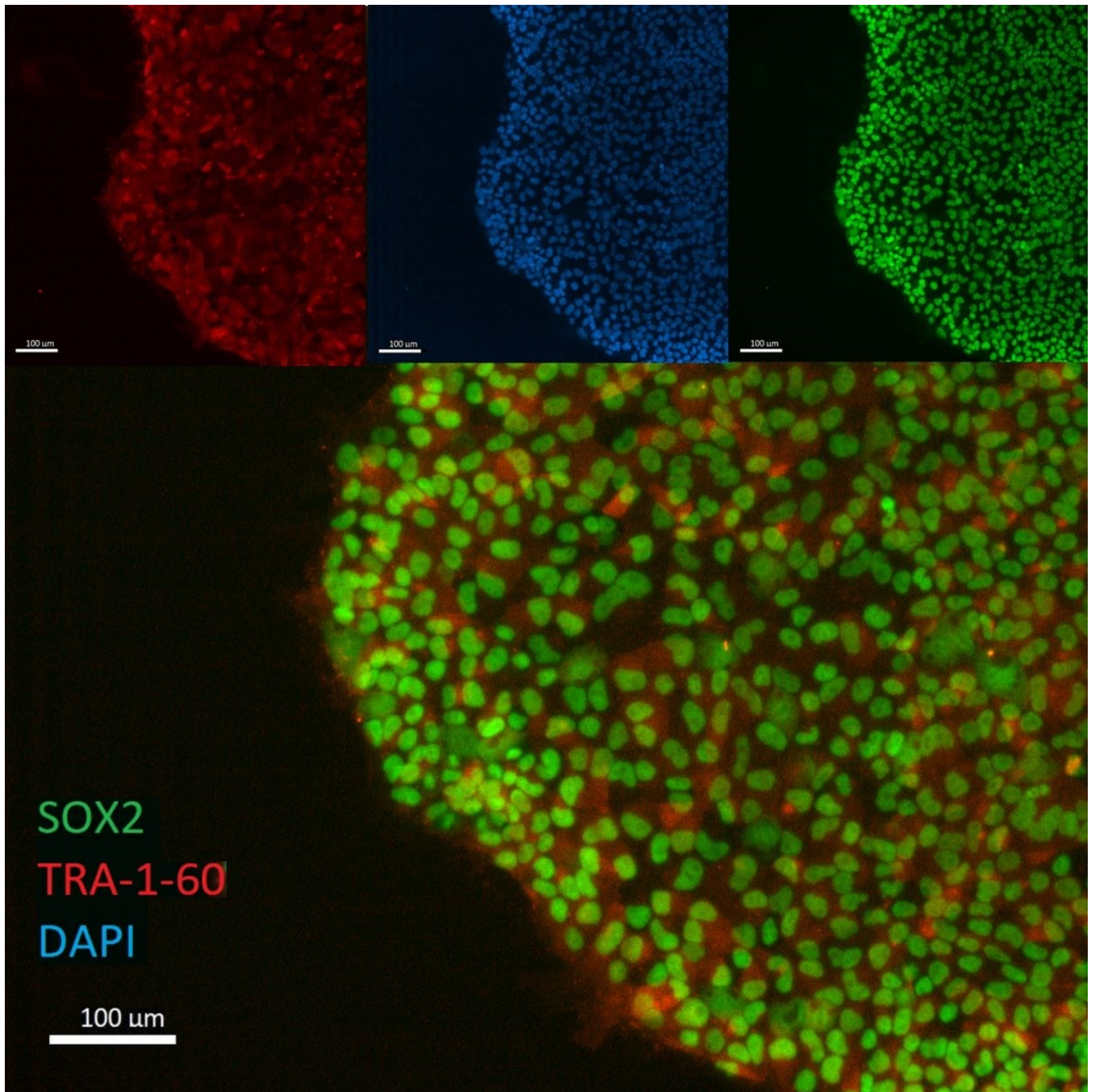
Linia iPSC została wyprowadzona z PBMC pobranych od 50-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej chorującego na POChP o wczesnym początku i stopniu ciężkim. Linia iPSC została wygenerowana przy użyciu nieintegrującego zestawu do transdukcji wirusem Sendai CytoTune-iPS 2.0 (ThermoFisher Scientific, A16517) z użyciem czynników transkrypcyjnych Yamanaki: OCT4, SOX2, cMYC i KLF4. Po transdukcji komórki były hodowane w warunkach bez feederów przy użyciu Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific, A1413202) i przeniesione do medium mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies, 100-0276). Piętnaście dni po transdukcji zaobserwowano tworzenie się kolonii iPSC. Kolonie wykazywały typową dla iPSCs (Rycina 11) morfologię. Pluripotencję potwierdzono poprzez immunobarwienie markerów powierzchni komórkowej SSEA4, TRA-1-60 oraz markerów jądrowych OCT4, SOX2 w pasażu 18. (Ryc. 12,13). Zdolność linii iPSC do różnicowania się w trzy listki zarodkowe została wykazana poprzez bezpośrednie różnicowanie *in vitro*, a następnie pozytywne barwienie markerami ektodermalnymi (beta-III tubulina), markerami mezodermalnymi (aktyna mięśni gładkich) i markerami endodermalnymi (alfa-fetoproteina) (Ryc. 14). Utrata genów wirusa Sendai i egzogennych czynników reprogramujących została potwierdzona metodą RT-PCR w pasażu numer 22 (Ryc. 14,15,16,17). iPSC wykazały prawidłowy kariotyp (Ryc 18). Analiza krótkich powtórzeń tandemowych (STR) wykazała, że ta linia iPSC miała taką samą tożsamość genetyczną jak linia komórek dawcy we wszystkich 22 analizowanych loci. Medium hodowlane zostało zbadane pod kątem zanieczyszczenia mykoplazmą metodą PCR, co wykazało wynik negatywny (dodatkowe). Podsumowując, linia iPSC COPD001 została pomyślnie wyprowadzona, jest pluripotenna i wykazuje potencjał wielokierunkowego różnicowania.



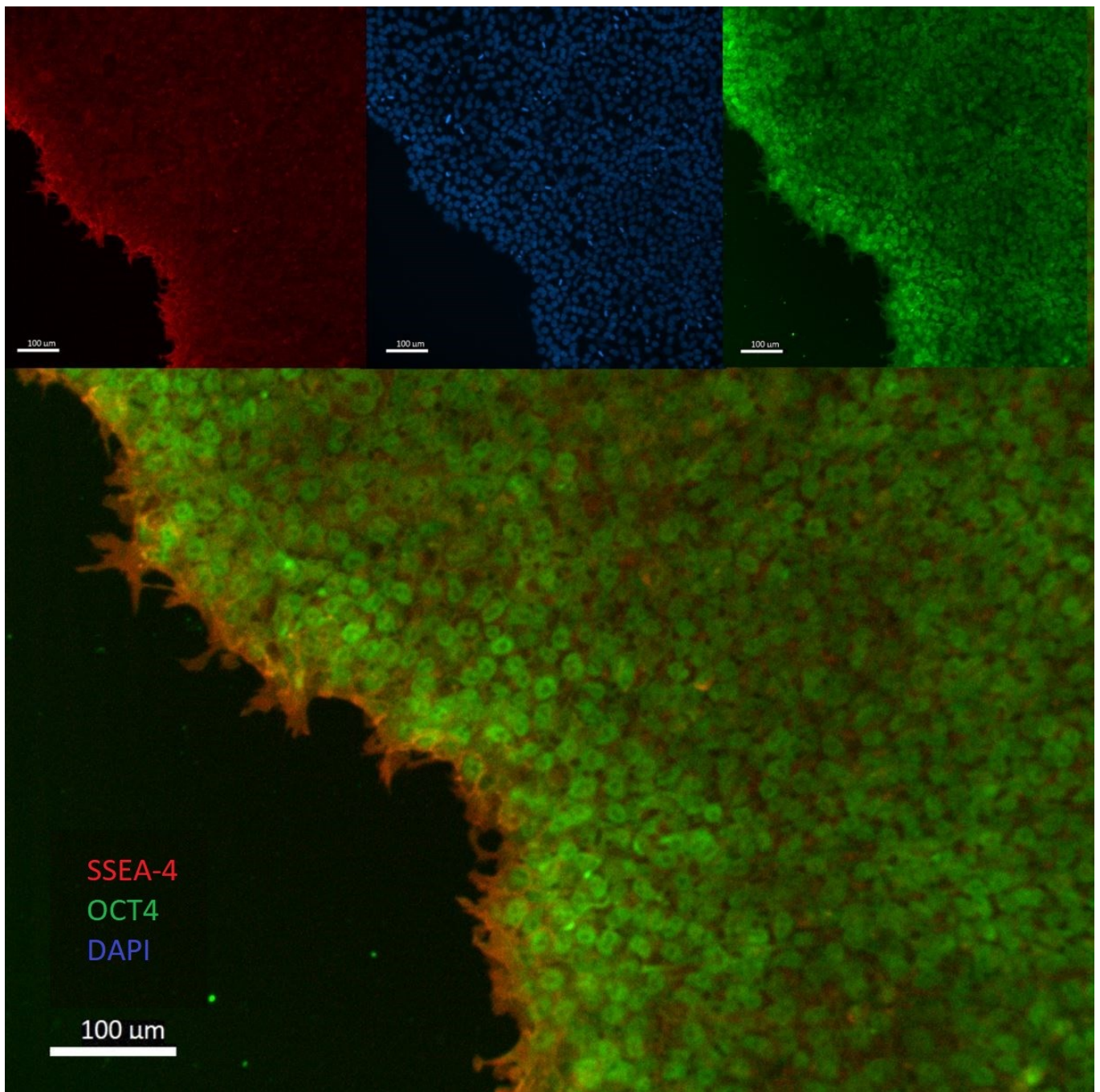


Rycina 11. Morfologia kolonii iPSC COPD001.



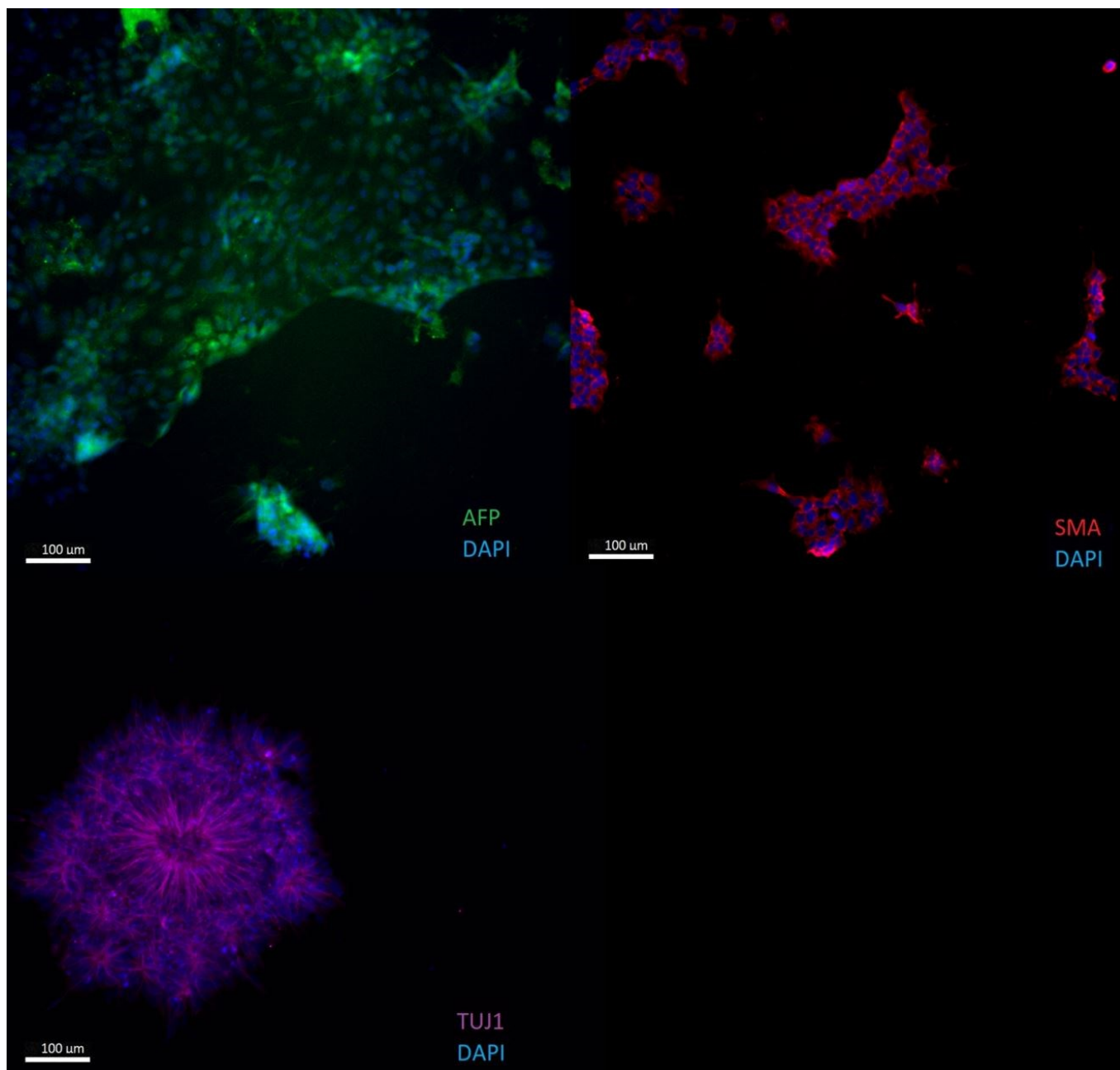


Rycina 12. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) COPD001.

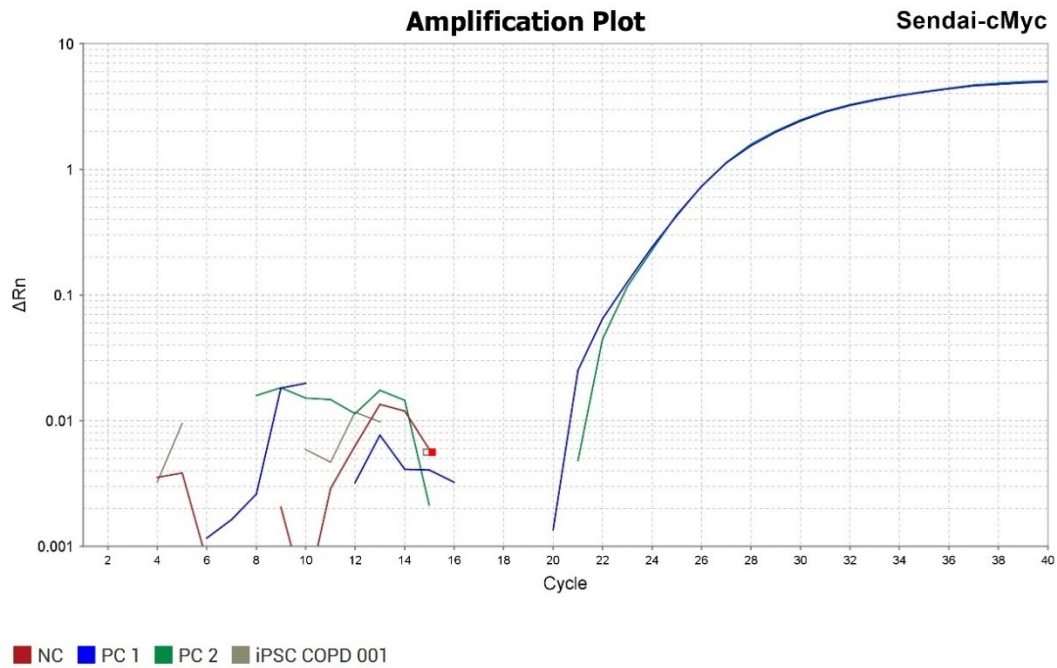


Rycina 13. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) COPD001.

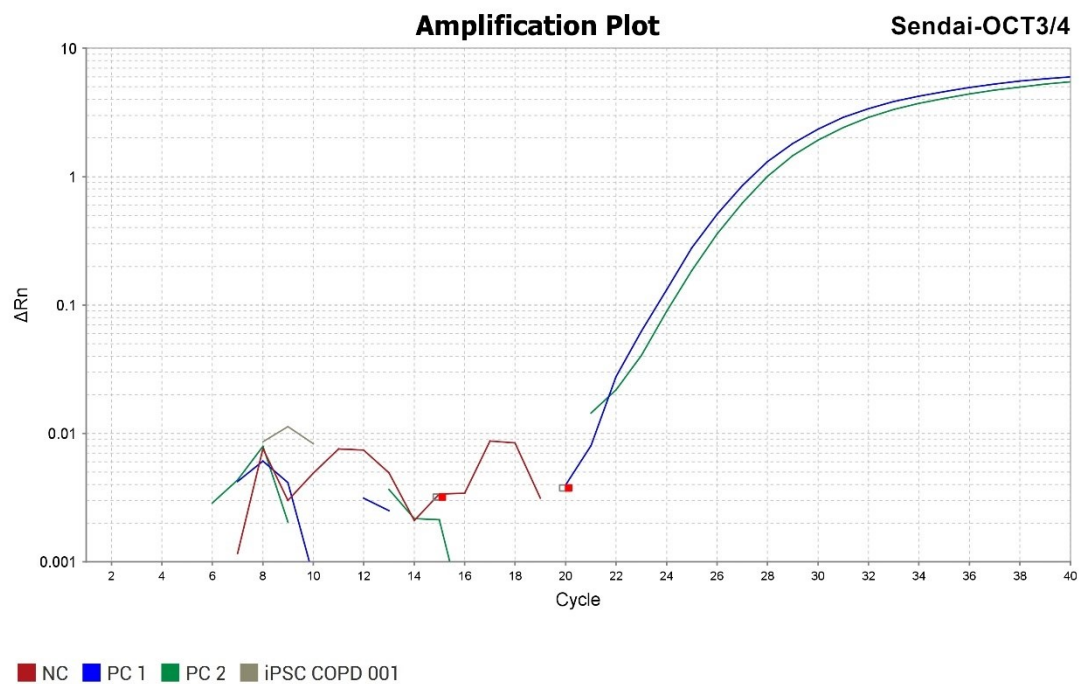




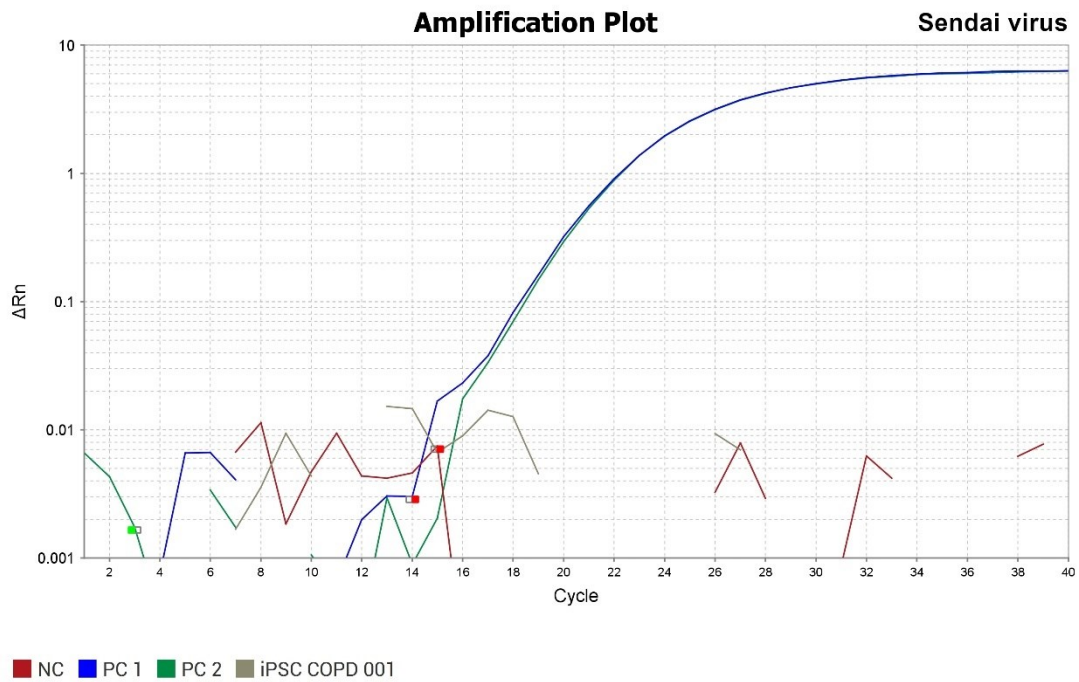
Rycina 14. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (AFP, SMA, TUJ1) COPD001.



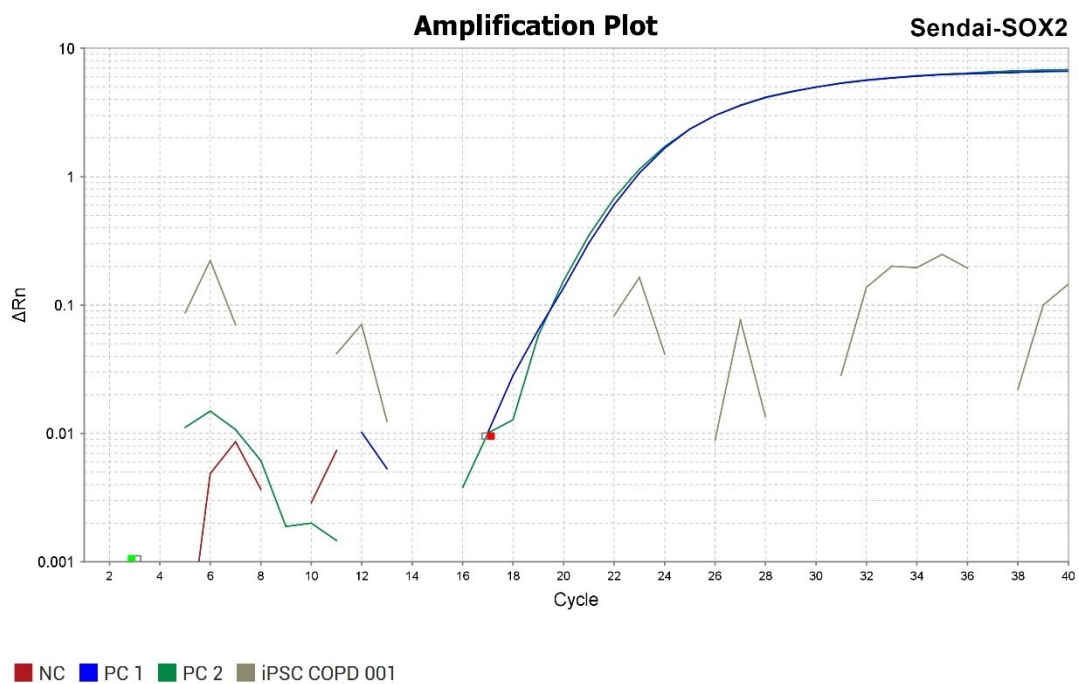
Rycina 15. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, COPD001.



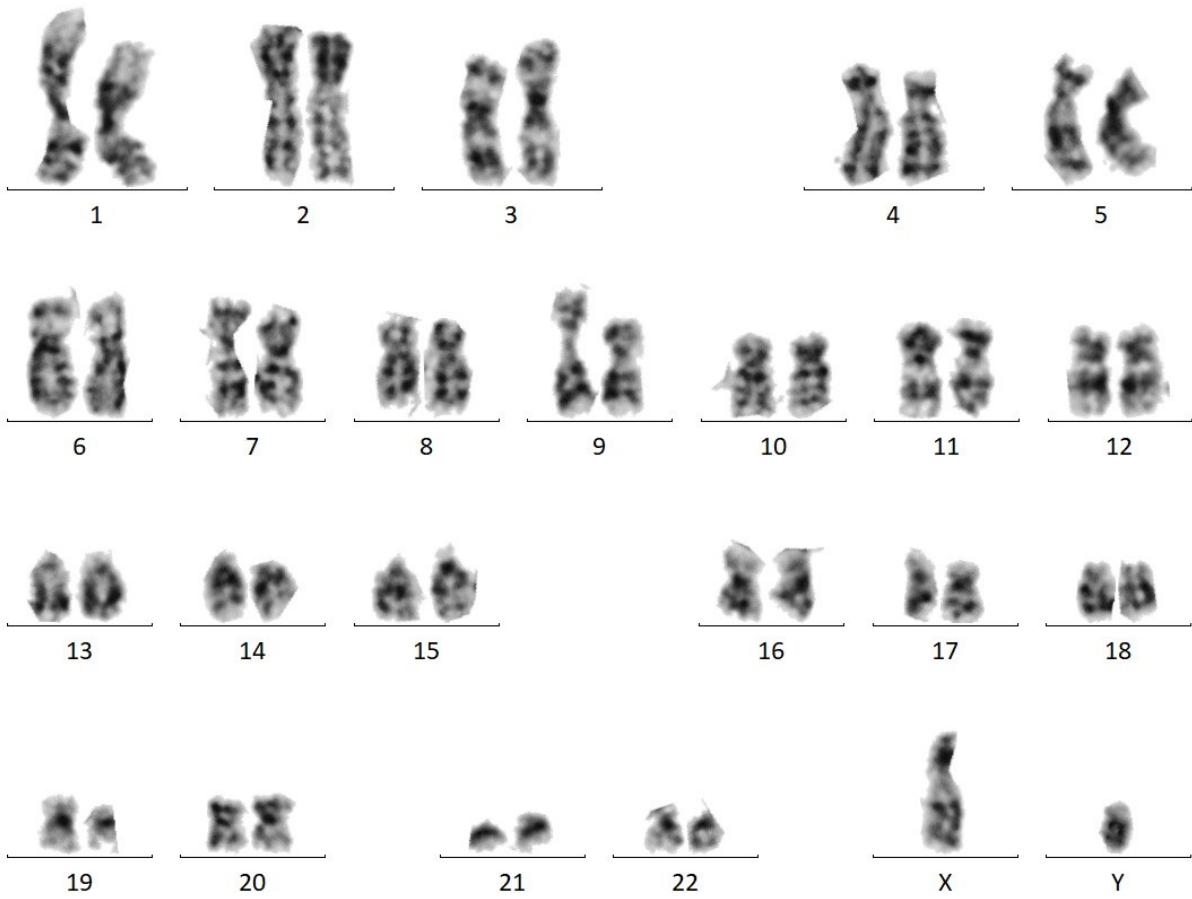
Rycina 16. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, COPD001.



Rycina 17. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai, COPD001.



Rycina 18. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, COPD001.

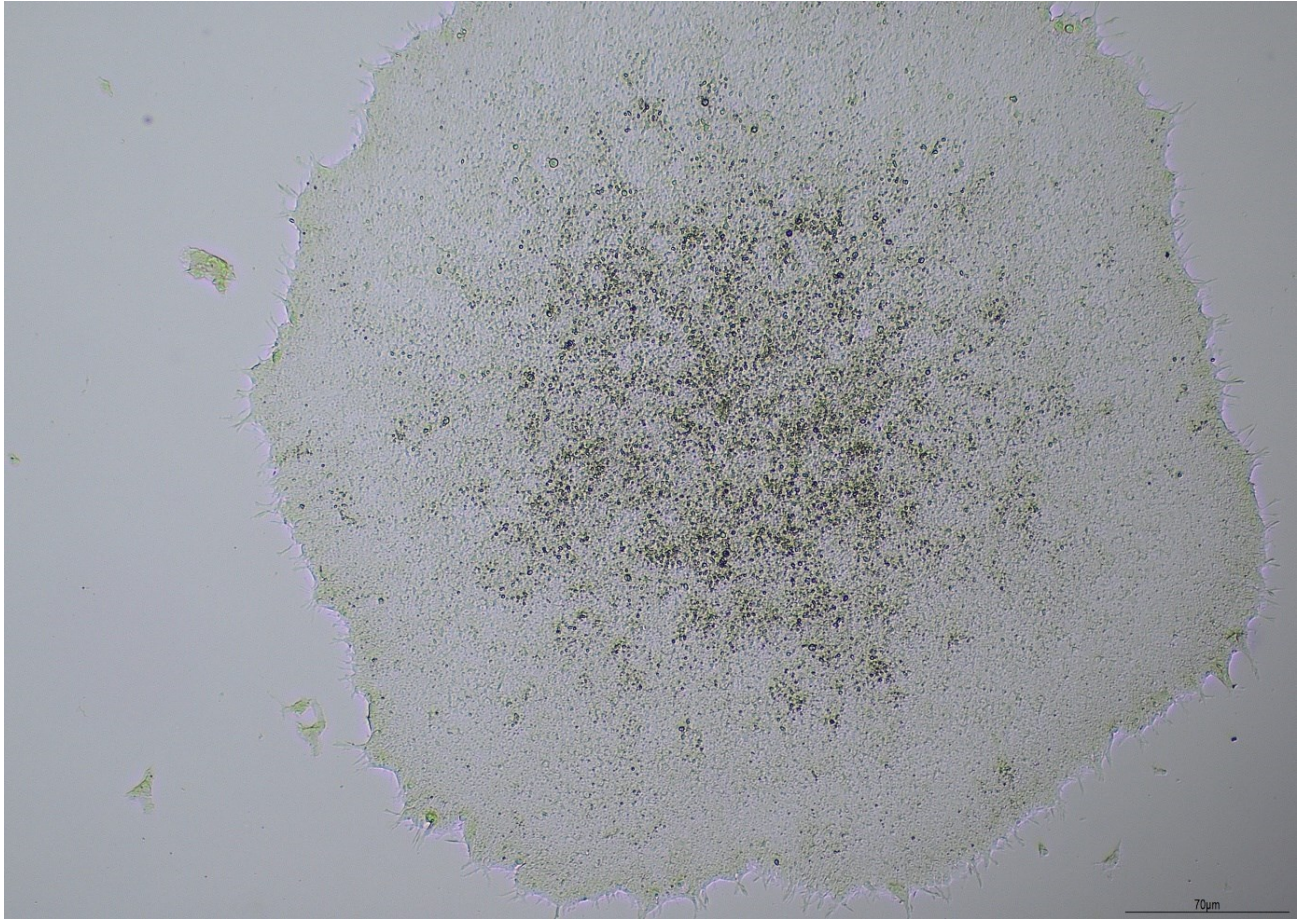


Rycina 19. Kariotyp COPD001 (GTG).

### 5.3 Linia hiPSC CF002.

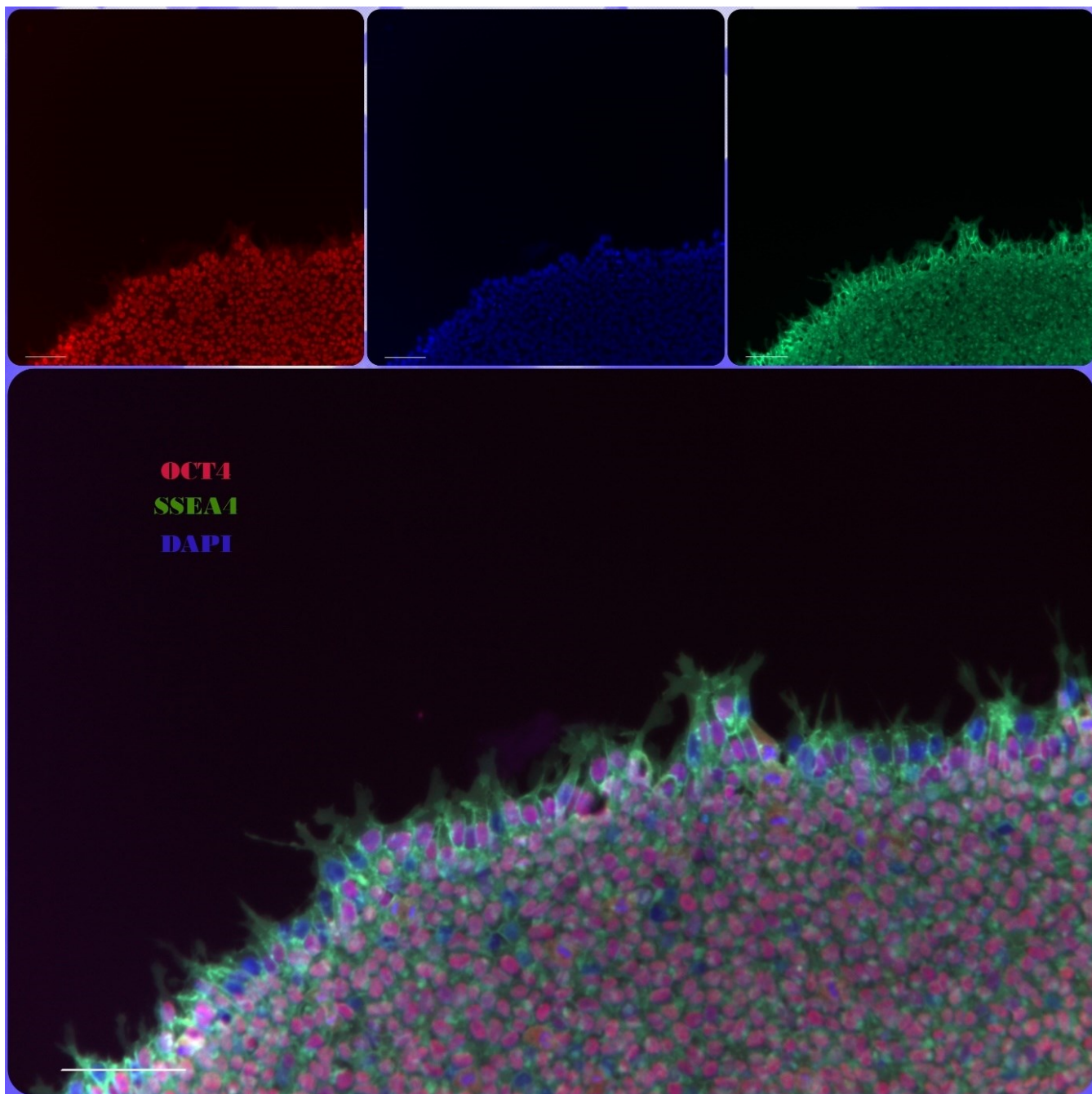
Linie hiPSC CF002 wyprowadzono z PBMC -letniej kobiety rasy kaukaskiej, pacjentki *heterozygotyczną mutacją CFTR* i *fenotypem związanym z CFTR*, noszącej mutację F508del w genie CFTR. Linia iPSC została wygenerowana przy użyciu nieintegrującego zestawu do transdukcji wirusem Sendai CytoTune-iPS 2.0 (ThermoFisher Scientific, A16517), dostarczającego czynniki transkrypcyjne Yamanaki: OCT4, SOX2, cMYC i KLF4. Po transdukcji wirusem Sendai, komórki były hodowane w warunkach bez feederów przy użyciu Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Thermo Fisher Scientific, A1413202) i przeniesione do medium mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies, 100-0276) w 7. dniu po transdukcji. Dwadzieścia cztery dni po transdukcji wirusem Sendai, powstały iPSC. Kolonie wykazały typową morfologię przypominającą iPSC (Ryc. 20). Pluripotencję potwierdzono poprzez immunobarwienie markerów powierzchni komórkowej SSEA4, TRA-1-60 oraz markerów jądrowych OCT4, SOX2 (Ryc. 21,22) w pasażu numer 16. Pozytywne barwienie, z użyciem markeru ektodermalnego (OTX2), mezodermalnego (Brachyury) i endodermalnego (SOX17) zaobserwowano po bezpośrednim różnicowaniu in vitro, co wykazało zdolność tej linii iPSC do różnicowania się w trzy listki zarodkowe (Ryc. 23). Utrata genów wirusa Sendai i egzogennych czynników reprogramujących została potwierdzona metodą RT-PCR w pasażu numer 22 (Ryc. 24,25,26,27,28). iPSC wykazały prawidłowy kariotyp (Ryc 29). Analiza krótkich powtórzeń tandemowych (STR) wykazała, że ta linia iPSC miała taką samą tożsamość genetyczną jak linia komórek dawcy we wszystkich 22 analizowanych loci. Zanieczyszczenie mykoplazmą zostało zbadane w medium hodowlanym metodą PCR i wykryto wyniki negatywne w iPSC (Ryc. 30,31,32). Podsumowując, linia iPSC CF002 została pomyślnie wyprowadzona, jest pluripotenna i wykazuje potencjał wielokierunkowego różnicowania.



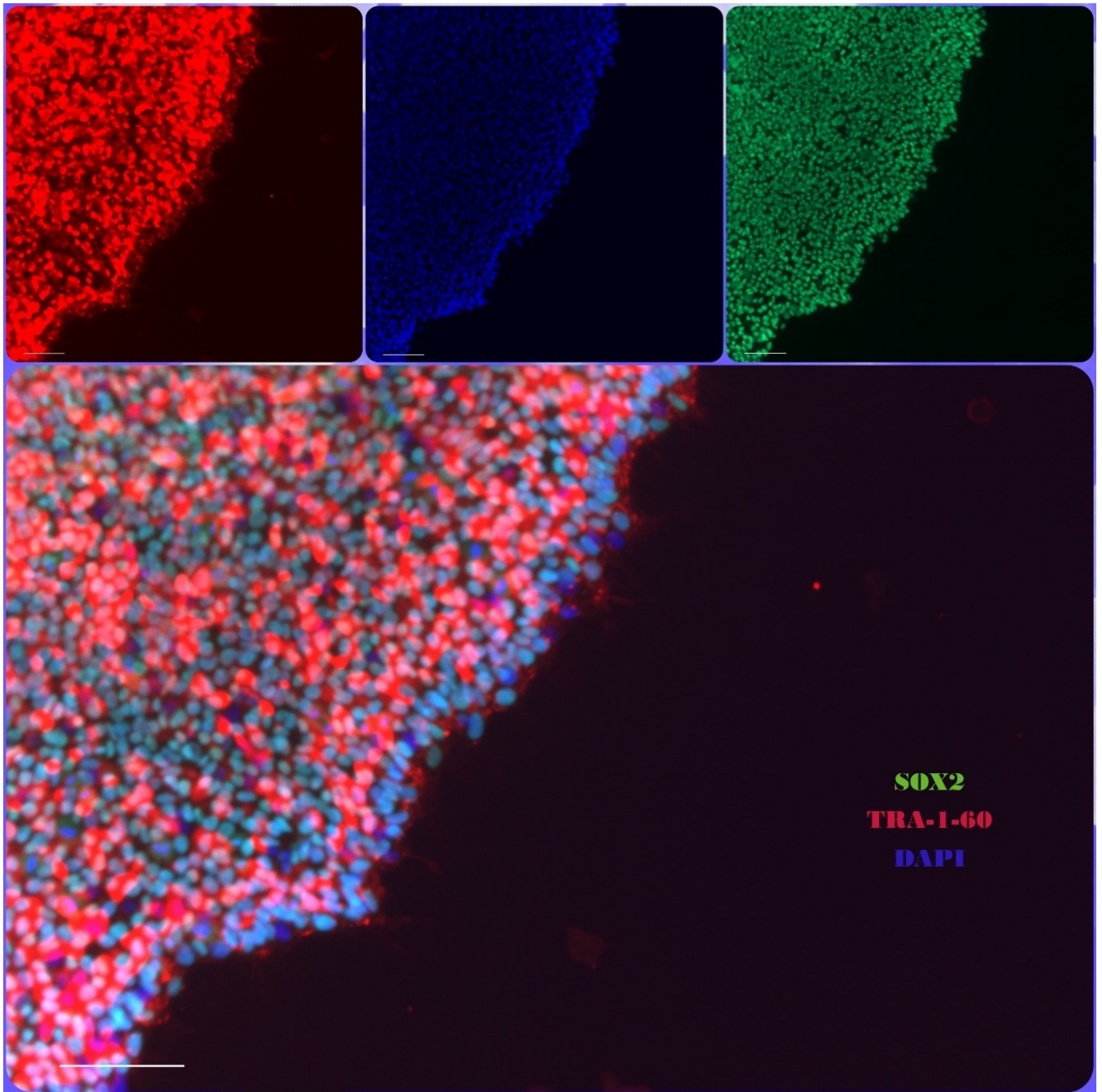


Rycina 20. Morfologia kolonii iPSC CF002.

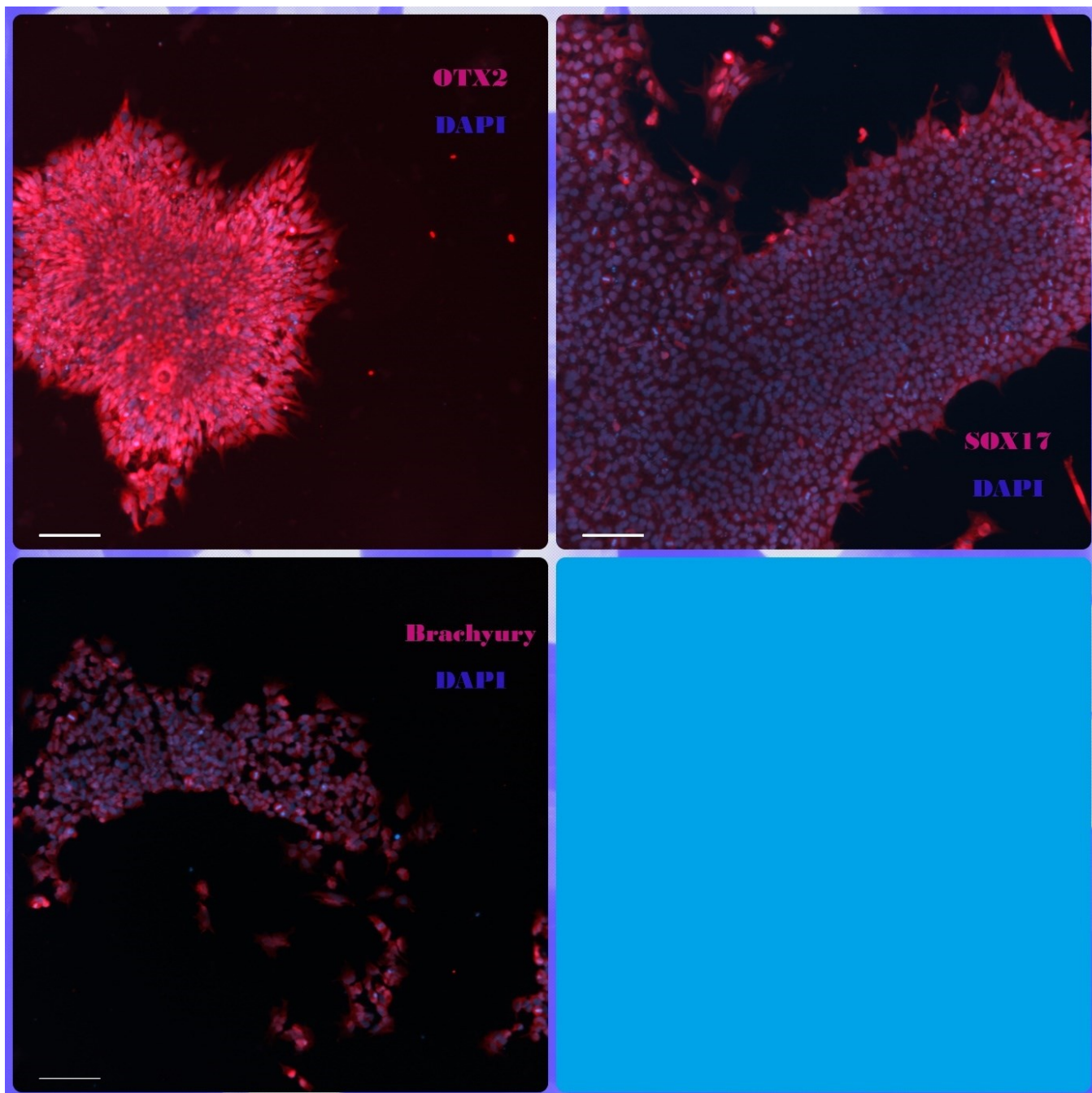




Rycina 21. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) CF002.



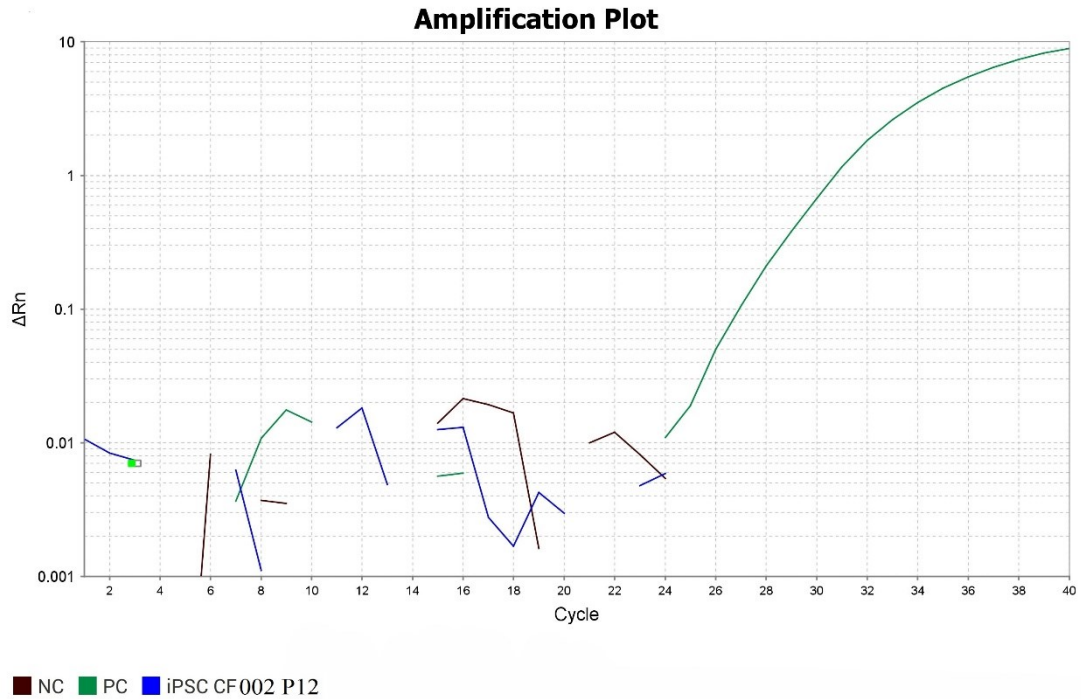
Rycina 22. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) CF002.



Rycina 23. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (OTX2, SOX17, Brachyury) CF002.

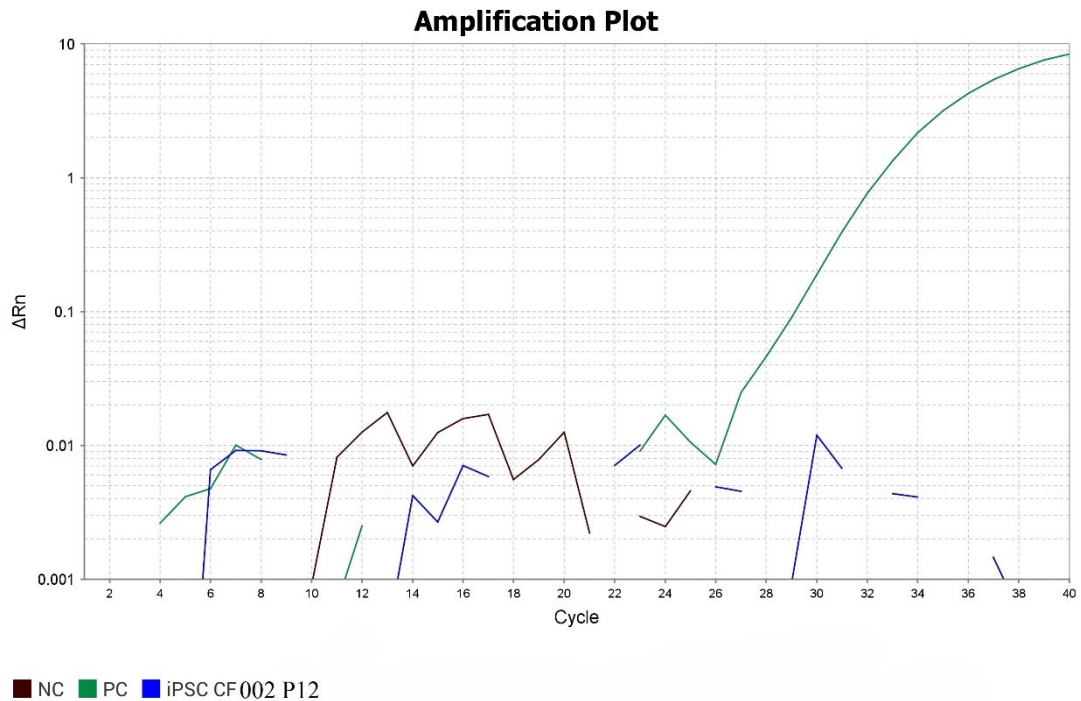


Sendai-SOX2



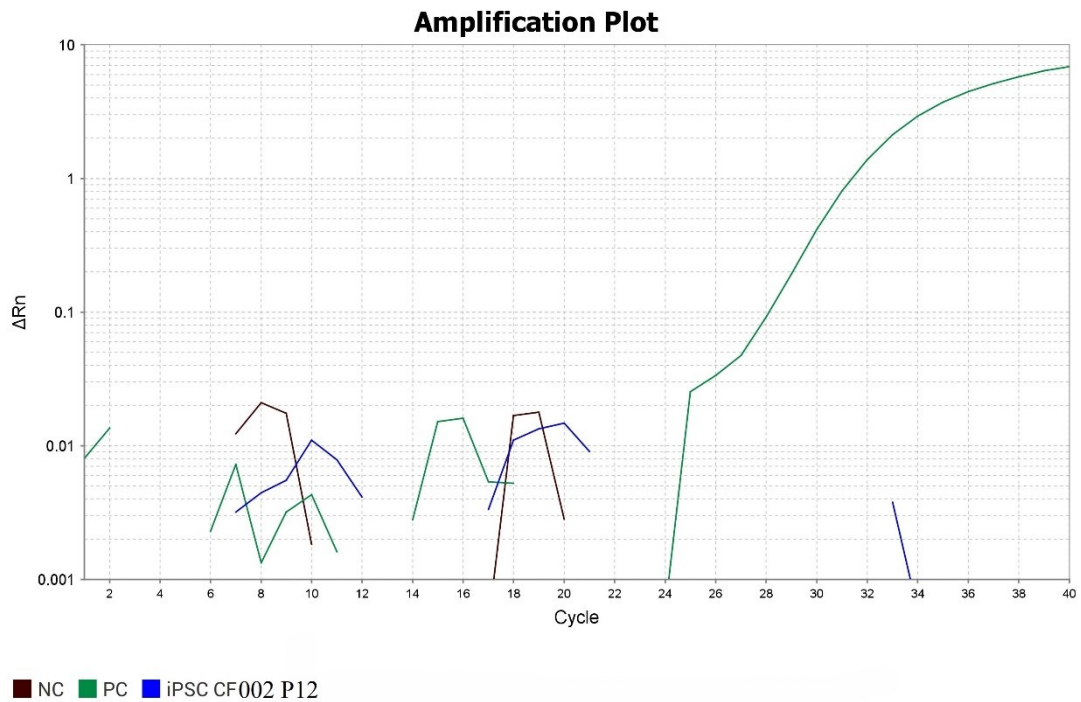
Rycina 24. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, CF002.

Sendai virus



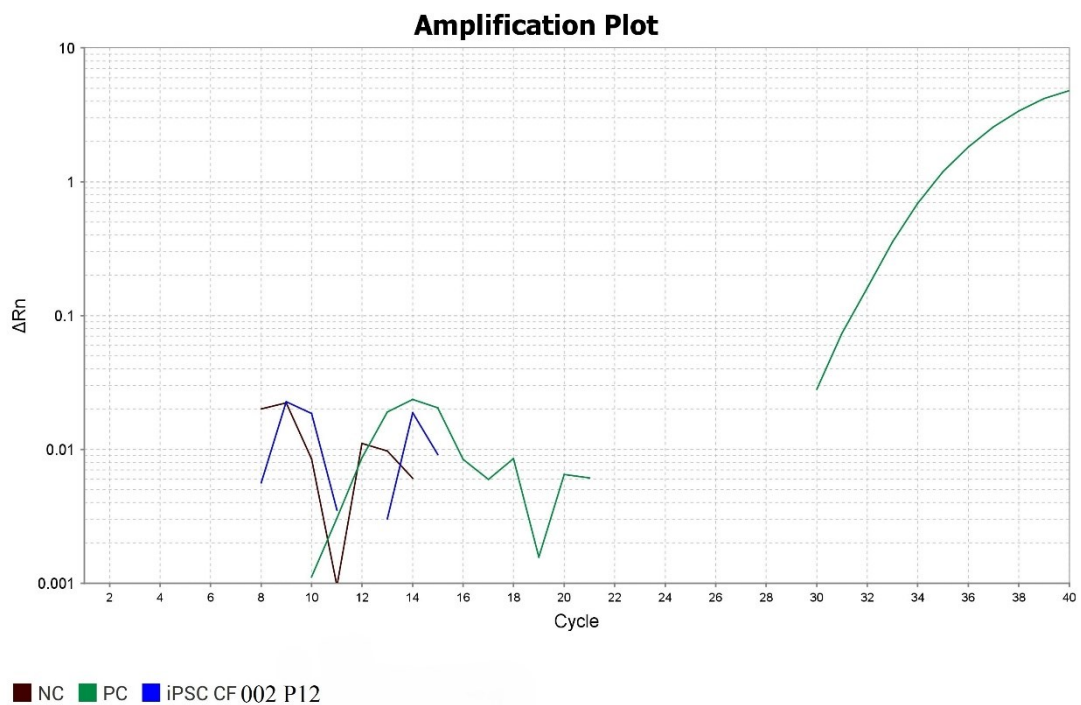
Rycina 15. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai, CF002.

Sendai-cMyc



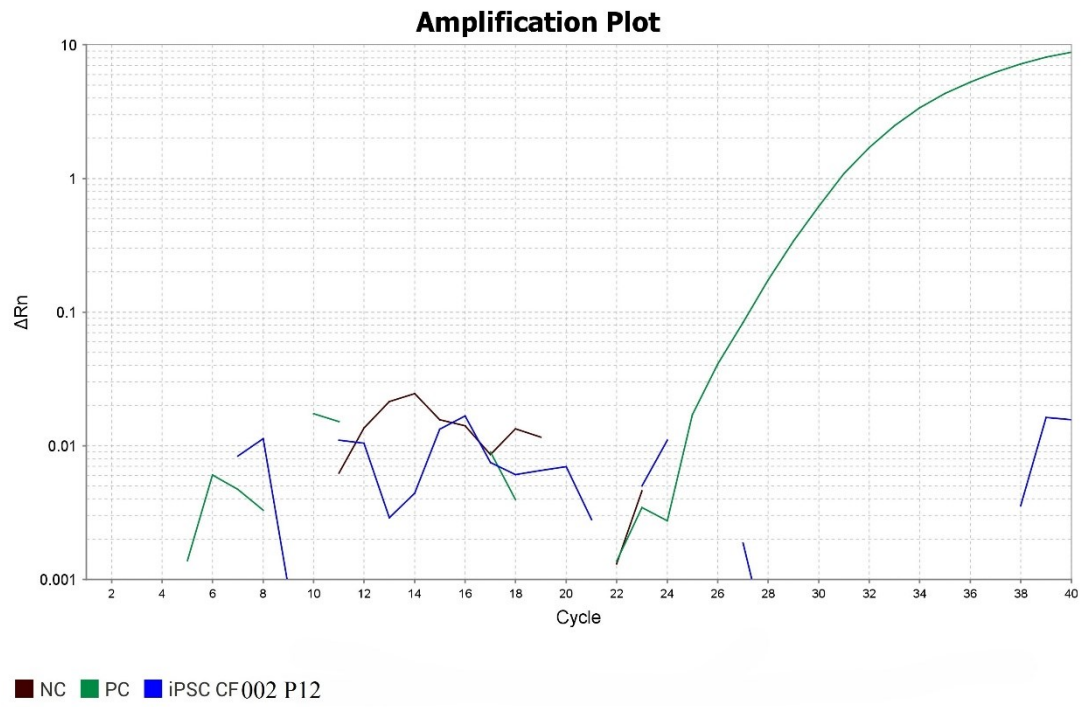
Rycina 26. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, CF002.

Sendai - Klf4

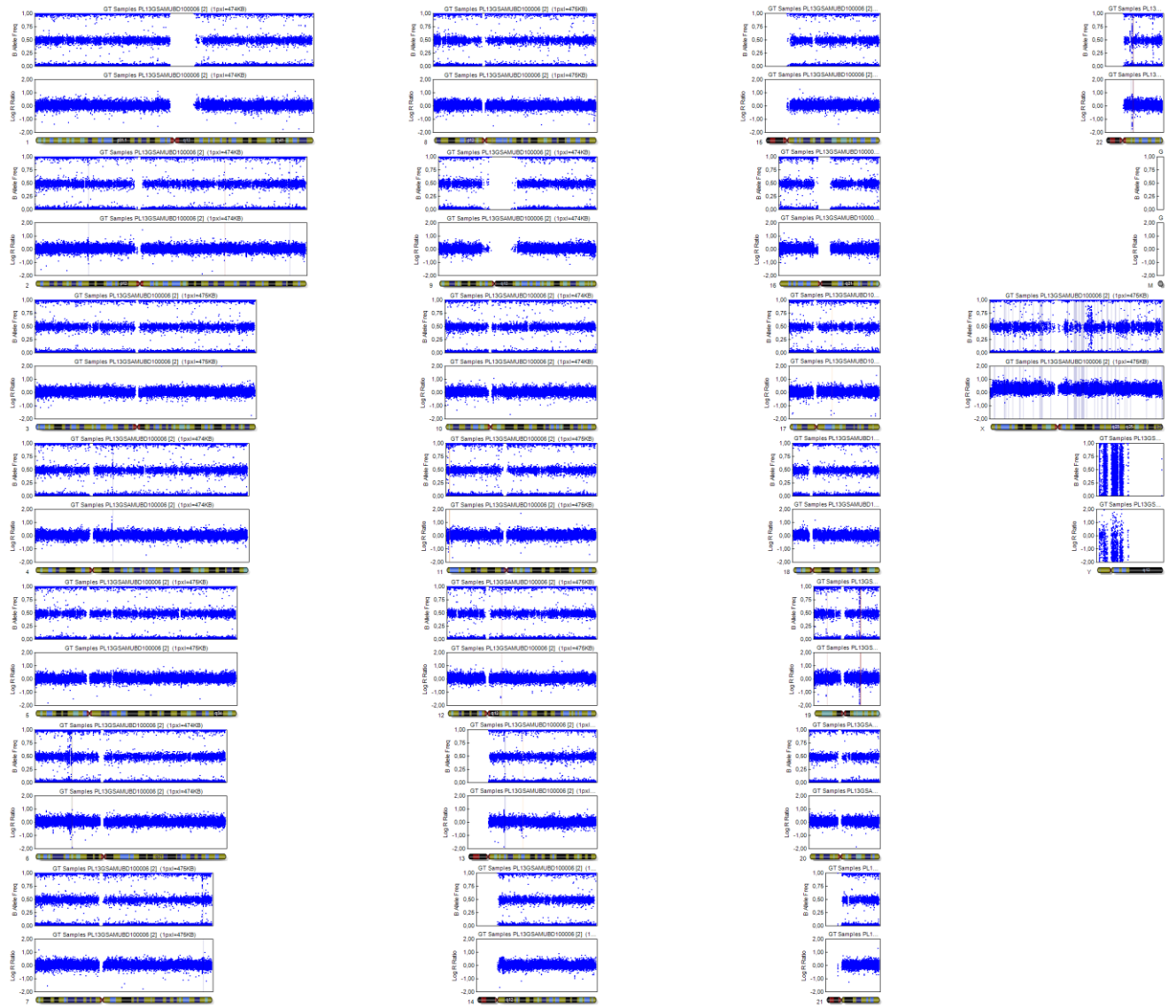


Rycina 27. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, Klf4, CF002.

Sendai-OCT3/4

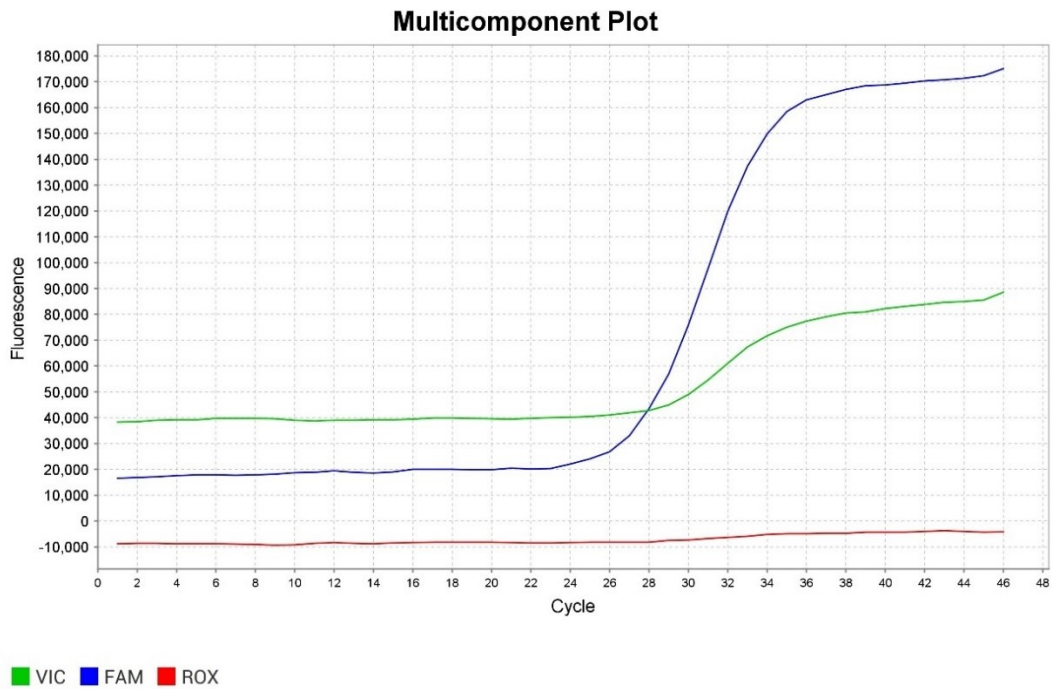


Rycina 28. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, CF002.



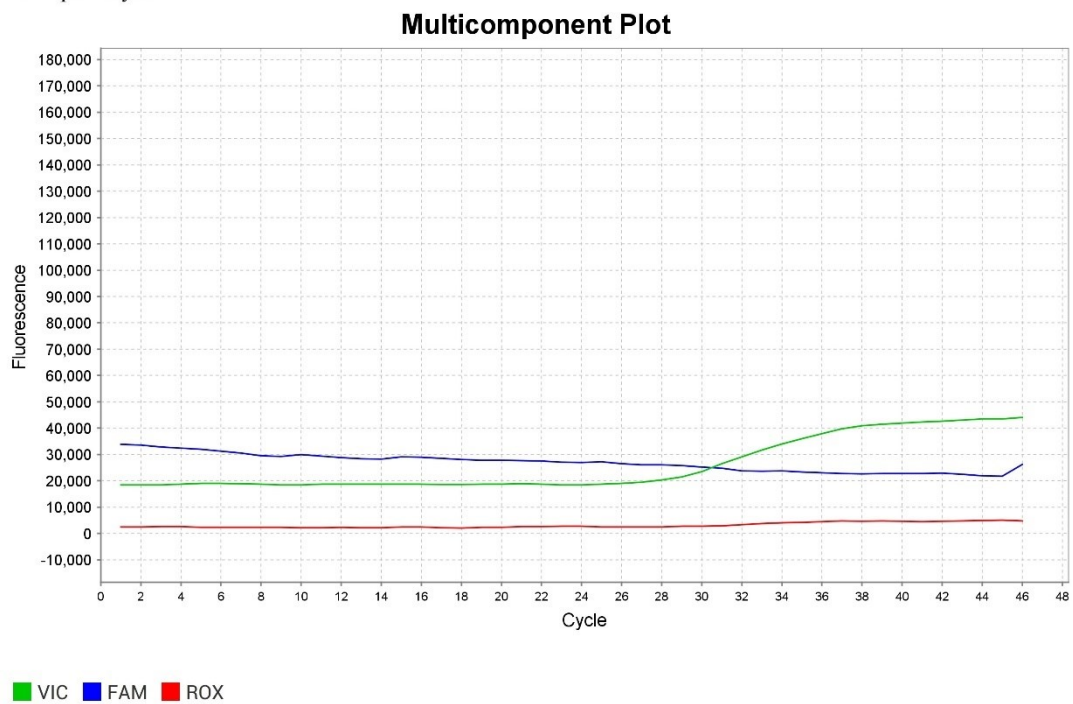
Rycina 29. Karyotyp CF002 (kariomapowanie - system Illumina iScan).

positive control  
myco



Rycina 30. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą kontrola pozytywna (qPCR).

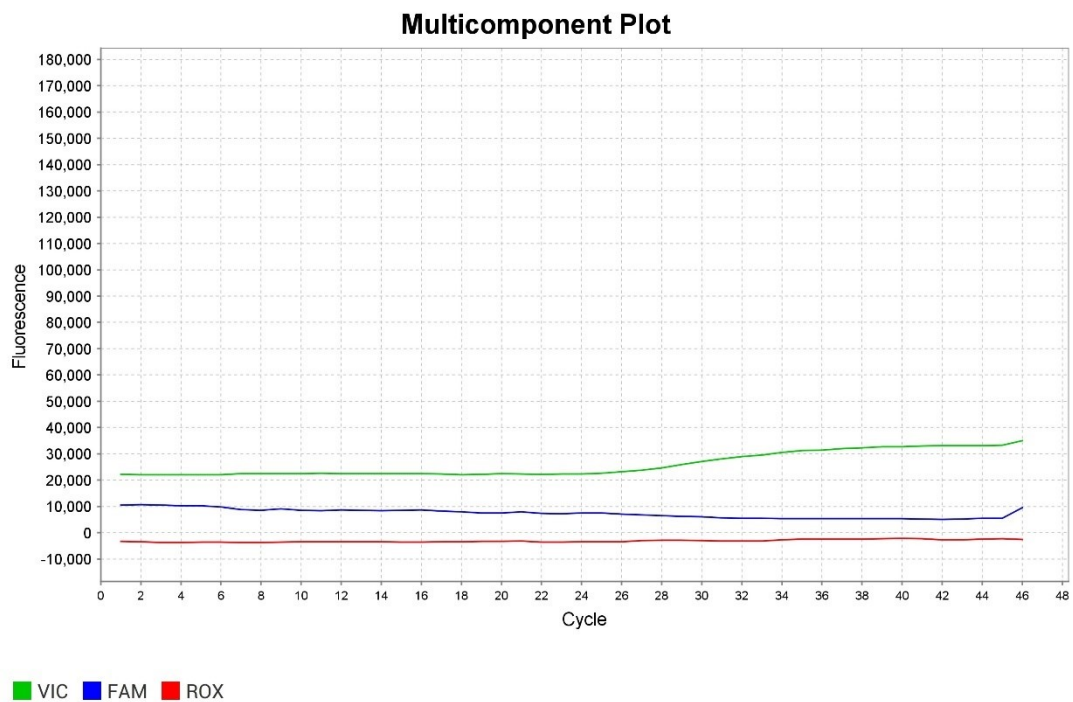
iPSC CF002 p12 myco



Rycina 31. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą - próbka badana (qPCR, hodowla CF002, pasaż 12).



Negative control  
myco



Rycina 32. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą kontrola negatywna (qPCR).

## **6 Dyskusja.**

### ***6.1 Porównanie wyników z literaturą.***

Otrzymane wyniki są zbieżne z tymi dostępnymi w literaturze. (58) Choć opisywano potencjalne różnice we wzroście hiPSC w zależności od wieku i chorób pacjenta, od którego pobrano PBMC, podczas hodowli nie zauważono istotnych różnic w liczebności kolonii między pacjentami. (59)

### ***6.2 Umiejętności i techniki nabyte przez doktoranta podczas prowadzenia badań naukowych.***

Podczas realizacji pracy doktorskiej, doktorant opanował umiejętności i techniki:

- zasady pracy laboratoryjnej i obsługa dostępnego sprzętu, krytyczny przegląd literatury, analiza i optymalizacja protokołów, planowanie zadań, praca w zespole, analiza wyników,
- izolacja PBMC z krwi obwodowej,
- hodowla komórkowa PBMC oraz hiPSC,
- reprogramowanie PBMC i generowanie hiPSC za pomocą nieintegrujących wektorów wirusowych Sendai,
- izolacja DNA, RNA, ocena jakości i stężeń izolatów,
- podstawy technik PCR oraz RT-PCR,
- techniki barwień i obrazowania immunofluorescencyjnego,
- różnicowanie hiPSC w kierunku trzech listków zarodkowych,
- podstawy biobankowania.

## 6.3 *Badania nad najczęstszymi chorobami Układu Oddechowego z wykorzystaniem hiPSCs.*

### 6.3.1 *Mukowiscydoza.*

Mukowiscydoza (CF) jest autosomalną recesywną chorobą spowodowaną defektami w białku CFTR. Jest to najczęstsza choroba jednogenowa u pacjentów rasy kaukaskiej z autosomalnym recesywnym dziedziczeniem. Białko CFTR to kanał chlorkowy znajdujący się w błonie komórek nabłonkowych. Mutacja w genie *CFTR*, zlokalizowanym na chromosomie 7, prowadzi do zmniejszenia liczby kanałów CFTR lub zakłóca funkcjonowanie tych kanałów [2,3]. Do tej pory opisano ponad 2100 różnych mutacji w genie *CFTR*, ale nie wszystkie z nich powodują CF. Według badaczy istnieje 6 głównych klas mutacji, choć mogą występować kombinacje kilku z nich. (60,61) Najczęstszą mutacją jest F508del ( $\Delta F508$ ) - około 90% pacjentów nosi co najmniej jedną kopię tego allelu. Jest to delecja trzech nukleotydów w 508. kodonie na długim ramieniu chromosomu 7 (locus 7q31.2), co prowadzi do usunięcia reszty fenyloalaniny, a następnie do nieprawidłowego przetwarzania wewnątrzkomórkowego białka CFTR. (62) CF jest chorobą monogenową, ale wykazuje znaczną zmienność fenotypową - o czym świadczy szerokie spektrum ciężkości choroby obserwowane u pacjentów z tym samym genotypem. (63) Tworzenie bibliotek genetycznych w korelacji z fenotypem oraz badaniami molekularnymi i czynnościowymi komórek hiPSCs różnicowanych w komórki układu oddechowego, może dostarczyć informacji na temat możliwych genetycznych przyczyn tych różnic w połączeniu z oceną ich efektu na poziomie komórkowym.

CF manifestuje się głównie w układzie oddechowym. Defektywne białko CFTR zmniejsza uwalnianie jonów Cl<sup>-</sup> z komórek, co prowadzi do hiperaktywacji nabłonkowych kanałów sodowych (ENaC). Wysoka absorpcja jonów Na<sup>+</sup> powoduje dehydratację i zagęszczenie wytwarzanego śluzu. (64) Śmiertelność w CF jest najczęściej spowodowana infekcjami płuc, rozstrzeniami oskrzeli, niedrożnością dróg oddechowych i postępującą niewydolnością oddechową. (65) CF wpływa również na inne układy i narządy z powodu dysfunkcji komórek nabłonkowych. Często zajęte są: trzustka (złe wchłanianie), gruczoły potowe (szok cieplny), nasieniowody (niepłodność) i wątroba (marskość żółciowa). (66)

W ostatnich latach dokonano znaczącego postępu w leczeniu CF. Zostały wdrożone innowacyjne leki ukierunkowane na podstawowe defekty CFTR takie jak lumakaftor, iwakaftor, tezakaftor i eleksakaftor. (66–68) Pacjentami w wysoko wyspecjalizowanych

ośrodkach zajmują się zespoły interdyscyplinarne. Doprowadziło to do znacznej poprawy zarówno wyników klinicznych, jak i jakości życia pacjentów z CF. (69)

Terapia modulatorami CFTR przyniosła przełom, natomiast wciąż istnieje wielu pacjentów z mutacjami, które nie kwalifikują się do ich użycia (szczególnie w przypadku mutacji nonsensownych). (70) Odnotowano również różnice w odpowiedzi na leczenie u pacjentów z tą samą mutacją, co skłania do dalszych poszukiwań przyczyn oraz innych punktów uchwytu i możliwości potencjalnych terapii. (71–74) Modele CF oparte na hiPSCs stały się standardem w badaniach nad chorobą oraz testowaniu odpowiedzi komórkowych w modelach 2D oraz 3D aktualnych i potencjalnych terapii. (53,75,76) Możliwość wyprowadzania hiPSCs zarówno z fibroblastów, PBMC, jak i komórek pobranych metodą wymazu z nosa pozwala na komfortowe pobranie materiału również od młodszych pacjentów. (77,78)

### *6.3.2 Przewlekła Obturacyjna Choroba Płuc.*

Przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) jest częstą chorobą układu oddechowego, charakteryzującą się trwałym ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Objawy POChP obejmują przewlekły kaszel, duszności, krótki oddech, odkrztuszanie plwociny oraz ucisk w klatce piersiowej. (79) Choroba ta prowadzi do zaostrzeń, które mogą być śmiertelne, szczególnie u pacjentów z chorobami współistniejącymi, takimi jak nadciśnienie płucne, otyłość czy cukrzyca. (80) Jest to jedna z głównych przyczyn przewlekłej chorobowości i umieralności na świecie, a jej znaczenie przypuszczalnie będzie rosło w miarę starzenia się populacji i ciągłego narażenia na czynniki ryzyka zachorowania. (81) Głównym czynnikiem ryzyka rozwoju POChP jest palenie tytoniu. Warto jednak zauważyć, że nawet 25-45% pacjentów z POChP to osoby, które nigdy nie paliły, co wskazuje na znaczenie innych czynników, takich jak predyspozycje genetyczne i zanieczyszczenie środowiska. (82) Główną przyczyną występowania POChP u młodych niepalących osób jest niedobór alpha-1-antytrypsyny (AAT). Niedobór AAT jest genetycznym schorzeniem, które prowadzi do wczesnego rozwoju POChP, oraz predysponuje do nasilonego przewlekłego zapalenia oskrzeli i rozedmy płuc. Obniżony poziom inhibitora proteazy AAT, prowadzi do niekontrolowanej aktywności proteaz w płucach, promując destrukcję tkanki płucnej. (83)

Wydarzenia we wczesnym okresie życia (np. rozwój płuc w okresie prenatalnym, narażenie na infekcje w dzieciństwie) mogą wpływać na maksymalnie osiągniętą funkcję płuc i zwiększać ryzyko rozwoju POChP.

Ludzkie pluripotencjalne komórki macierzyste stanowią unikalną okazję do modelowania rozwoju płuc i oceny wpływu czynników na ich funkcje. (84,85) Modelem tej choroby mogą być również tkanki nabłonka dróg oddechowych wyprowadzone z hiPSC od pacjentów z ciężką postacią POChP. (86) Coraz częściej powstają biobanki z liniami hiPSCs oraz powiązany danymi klinicznymi istotnymi dla choroby, które mogą być współdzielone w innych ośrodkach i pomóc uchwycić znaczną różnorodność fenotypową populacji pacjentów. Inicjatywa takiego repozytorium dla hiPSCs wyprowadzonych od osoby z genetycznym zaburzeniem niedoboru alfa-1-antytrypsyny (AATD). Takie komórki mogą modelować cechy patogenezę AATD. Linie mogą być zróżnicowane w celu wygenerowania zarówno linii komórkowych wątroby, jak i płuc, a następnie analizowane. Ponadto, linie hiPSC mogą być modyfikowane za pomocą edycji CRISPR/Cas9 w celu dokonania naprawy mutacji i oceny jej efektu. (87)

Generowane organoidy nosogardła i oskrzeli od zdrowych osób oraz osób z POChP, odtwarzają różnice cech choroby na poziomie indywidualnym. Organoidy znalazły również zastosowanie w badaniu przyczyn częstszych infekcji u pacjentów z POChP. W organoidach z POChP zaobserwowano hiperplazję komórek kubkowych i zmniejszoną częstotliwość ruchu rzęsek a transkryptomika pojedynczych komórek ujawniła dowody na zmienione trajektorie różnicowania komórek. Infekcja SARS-CoV-2 w organoidach z POChP wykazała bardziej produktywną replikację w oskrzelach, kluczowym miejscu infekcji w ciężkim COVID-19 niż w organoidach od zdrowych osób. Co więcej, ekspozycja organoidów na wirusy i bakterie wywołała silniejszą odpowiedź prozapalną w organoidach z POChP.

Przedstawione analizy wykazały, że organoidy mogą odtwarzać fizjologiczne mikrośrodowisko płuc na poziomie indywidualnym oraz być wykorzystywane do badania interakcji gospodarz-patogen, aby wyselekcjonować najbardziej narażone grupy na ciężki przebieg choroby oraz badać narządowy przebieg nowo pojawiających się chorób zakaźnych. (88)

Jak wiemy, przewlekłe zapalenie i zaburzone mechanizmy naprawcze po uszkodzeniu nabłonka są zaangażowane w rozwój przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP). Modele 3D, takie jak sferoidy płucne, które odzwierciedlają wielokomórkową tkankę płucną, umożliwiają lepsze zrozumienie interakcji nabłonkowo-mezenchymalnych w POChP. Poprzez połączenie podejść transkryptomicznych i proteomicznych prowadzone były badania dotyczące interakcji nabłonkowo-mezenchymalnych w POChP oraz po zakażeniu SARS-CoV-2. Te eksperymenty ujawniły złożoność nieprawidłowych odpowiedzi zapalnych, dysfunkcji mitochondrialnej i śmierci komórek w POChP, co dostarcza głębszy wgląd w nasilone uszkodzenia tkanek,

obserwowane u pacjentów chorujących na POChP z zakażeniem SARS-CoV-2. Naukowcy użyli również tego modelu aby potwierdzić skuteczność przeciwciał neutralizujących ACE2 w zapobieganiu zakażeniu SARS-CoV-2 w pęcherzykach płucnych, które przez wielu były postrzegane jako przyszłą terapię COVID-19. (89,90)

### 6.3.3 *Astma.*

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną dróg oddechowych, charakteryzującą się zmienną i odwracalną obturacją dróg oddechowych, nadreaktywnością oskrzeli i przewlekłym stanem zapalnym. Przyczyny astmy są wieloczynnikowe i obejmują zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe, takie jak alergeny, zanieczyszczenia powietrza, infekcje wirusowe i stres.

Badania wykazały, że mezyngialne komórki macierzyste (MSC) pochodzące z iPSC (iPSC-MSC) mogą chronić komórki nabłonka oskrzeli przed uszkodzeniami wywołanymi hipoksją, co jest istotne w kontekście astmy, gdzie uszkodzenia nabłonka mogą prowadzić do zaostrzeń choroby. iPSC-MSC mogą także zapobiegać alergicznemu zapaleniu dróg oddechowych u myszy. Leczenie iPSC-MSC przed fazą wyzwania alergenem chroniło zwierzęta przed większością patologicznych zmian specyficznych dla alergii, takich jak infiltracja komórek zapalnych i produkcja śluzu w płucach, a także zmniejszało poziom immunoglobulin Th2 (np. IgE) i cytokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) w materiale pobranego podczas płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Mechanizm ochronny iPSC-MSC obejmuje regulację ekspresji mikroRNA-21, który wpływa na szlaki sygnałowe związane z zapaleniem i apoptozą komórek nabłonka oskrzeli. iPSC-MSC mogą w przyszłości stać się składnikiem terapii astmy, szczególnie w obliczu możliwości inżynierii genetycznej do wprowadzaniu zmian do genomu komórek, które mogą zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo terapii komórkowych. (91–94)

Przykładem użyteczności w terapii astmy modyfikacji genetycznych iPSC są badania, które wykazały, że komórki iPSC transdukowane genem dekoriny (*Dcn*) mogą modulować układ immunologiczny i kontrolować remodelowanie tkanek w astmie alergicznej. W badaniach na myszach z astmą alergiczną, leczenie iPSC transdukowanymi genem *Dcn* prowadziło do zmniejszenia nadreaktywności dróg oddechowych, obniżenia poziomu interleukin (IL-4, IL-5, IL-13, IL-33), całkowitego IgE oraz leukotrienów, a także do zmniejszenia wydzielania śluzu, hiperplazji komórek kubkowych i zapalenia eozynofilowego. (95)

Ponadto, badania nad różnicowaniem iPSC w komórki nabłonka dróg oddechowych umożliwiły stworzenie platformy do badania genów podatności na astmę. Takie platformy *in*

*in vitro* pozwalają na szczegółowe badanie interakcji genetycznych i środowiskowych, które mogą przyczynić się do rozwoju astmy, oraz umożliwiają testowanie nowych leków w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych. (96)

#### 6.3.4 *Idiopatyczne Włóknienie Płuc.*

Idiopatyczne włóknienie płuc (IPF), jest przewlekłą, postępującą chorobą płuc charakteryzującą się nieodwracalnym uszkodzeniem i bliznowaceniem tkanki płucnej, co prowadzi do stopniowego pogorszenia funkcji oddechowej. Choroba ta związana jest z nieprawidłową odpowiedzią naprawczą na mikrouszkodzenia nabłonka płuc, co skutkuje nadmiernym odkładaniem się macierzy zewnątrzkomórkowej i utratą elastyczności tkanki płucnej. Objawy IPF obejmują duszność, suchy kaszel, zmęczenie i utratę masy ciała. Przyczyny choroby nie są w pełni zrozumiane, ale uważa się, że czynniki genetyczne, środowiskowe i immunologiczne odgrywają kluczową rolę w jej patogenezie.

W celu modelowania IPF również zastosowanie mają modele oparte na iPSC. Badania wykazały, że organoidy pęcherzykowe pochodzące z iPSC, stymulowane koktajlem profibrotycznych i zapalnych cytokin, mogą odtwarzać kluczowe aspekty IPF, takie jak trwała przebudowa nabłonka i zwiększona produkcja macierzy zewnątrzkomórkowej. Analiza RNA-seq tych organoidów po użyciu koktajlu ujawniła zwiększoną proporcję komórek o fenotypie KRT5-/KRT17+, jaką można zaobserwować także w tkance płucnej pacjentów z IPF. Ponadto, wprowadzenie do organoidu nintedanibu i pirfenidonu (leków antyfibrotycznych), wykazało wpływ na markery macierzy zewnątrzkomórkowej, mediatory pro-fibrotyczne i reprogramacji nabłonka, potwierdzając, że system ten może być używany do poszukiwania i testowania nowych leków. (97)

Kolejnym typem modelu komórkowego jest generowanie interfejsu powietrzno-cieczowego (ALI) z komórek pochodzących z iPSC. Umożliwia to stałą ocenę różnicowania komórek nabłonka pęcherzykowego typu II (A2II) co umożliwia ocenę patogenezy IPF. (98)

#### 6.3.5 *Rak Płuca.*

Rak płuca jest jednym z najczęściej diagnozowanych nowotworów na świecie i stanowi główną przyczynę zgonów z powodu nowotworów. Wyróżnia się dwa główne typy raka płuca: niedrobnokomórkowy rak płuca (NSCLC) i drobnokomórkowy rak płuca (SCLC). NSCLC stanowi większość przypadków i obejmuje podtypy takie jak gruczolakorak, rak płaskonabłonkowy i rak wielkokomórkowy.

Rak płuca jest wynikiem złożonej interakcji między czynnikami genetycznymi a środowiskowymi. Palenie tytoniu jest najważniejszym czynnikiem ryzyka, ale również narażenie na substancje takie jak azbest, radon i zanieczyszczenia powietrza może zwiększać ryzyko zachorowania. Genetyczne predyspozycje również odgrywają rolę, a mutacje w genach takich jak EGFR, KRAS, ROS1 i ALK są często związane z rozwojem raka płuca.

Modele iPSCs w nowotworach, mogą być wykorzystywane do analizy mechanizmów molekularnych raka płuca na poziomie komórkowym, oceny skuteczności i toksyczności nowych leków przeciwnowotworowych, tworzenia spersonalizowanych modeli choroby, oraz badania mechanizmów oporności na leczenie.

Jednym z przykładów zastosowania iPSC w badaniach nad rakiem płuca jest modelowanie NSCLC z mutacją RETC634Y. Wykazano, że iPSC mogą być używane do generowania komórek progenitorowych płuc (LPC) charakteryzującymi się specyficznymi mutacjami. Te modele pozwalają na badanie mechanizmów molekularnych związanych z mutacjami RET oraz testowanie nowych terapii celowanych. (99)

Przykładem oceny toksyczności leków onkologicznych jest badanie nad gefitynibem, lekiem stosowanym w leczeniu NSCLC z mutacjami EGFR. Wykorzystując iPSC pochodzące od pacjentów, którzy doświadczyli różnych poziomów hepatotoksyczności po leczeniu gefitynibem, naukowcy byli w stanie odtworzyć te różnice w warunkach laboratoryjnych. Wyniki te sugerują, że iPSC mogą być używane do przewidywania toksyczności leków przed ich klinicznym zastosowaniem. (100)



## 7 Wnioski.

Komórki hiPSCs mają wiele zastosowań i mogą być postrzegane jako przyszłe kluczowe narzędzie w badaniach i terapii chorób układu oddechowego.

Przedstawione wyniki ukazują pomyślne wyprowadzanie trzech linii komórkowych hiPSC przy użyciu nieintegrujących wektorów wirusowych Sendai oraz ich charakterystykę.

Wyprowadzone linie zostały biobankowane (mrożenie było przeprowadzane na praktycznie każdym pasażu), co umożliwia ponowne rozpoczęcie hodowli od każdego etapu. Umożliwia to zastosowanie tych linii w ćwiczeniu umiejętności hodowli komórkowych i charakterystyki komórek, modelowaniu chorób, tworzeniu organoidów, badaniach toksykologicznych i inżynierii genetycznej. Pacjenci, od których pobrano komórki zostali wytypowani pod względem chorób i użyteczności linii hiPSC w dalszych badaniach, skriningu markerów chorób układu oddechowego i edycji genetycznej.

Walidacja i optymalizacja protokołów wyprowadzania i charakterystyki hiPSC zapewni dostęp do technologii i możliwość generowania kolejnych linii.

W perspektywie przyszłych badań należy ująć rozwój kolejnych metod reprogramowania oraz zastosowanie iPSCs w terapii komórkowej i regeneracyjnej. Istotnym kierunkiem przyszłej aktywności jest nauka i zastosowanie protokołów inżynierii genetycznej (np. CRISPR/Cas9) na komórkach hiPSC.

Podczas badań starano się dochować jak największej staranności i zachować wszelkie standardy i zasady obowiązujące przy pracy laboratoryjnej i hodowlach komórkowych. Nabyte umiejętności są owocem wielu prób oraz nauki różnych technik laboratoryjnych i obsługi udostępnionego sprzętu. Oprócz umiejętności technicznych w pracy naukowej bardzo istotną rolę odgrywają interakcje międzyludzkie i nawiązywanie współpracy. Doświadczenie przy pracy laboratoryjnej umożliwia poznanie wielu ludzi i postaw wobec początkujących naukowców. Tym bardziej należy docenić życzliwość osób, które służą innym pomocą, radą i życzliwością.

## 8 Streszczenie w języku polskim.

Praca doktorska koncentruje się na badaniach nad ludzkimi indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (hiPSC) i ich zastosowaniach w leczeniu chorób układu oddechowego, takich jak mukowiscydoza (CF) i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP). Przedstawia wyniki pomyślnego wyprowadzenia i charakterystyki trzech linii ludzkich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (hiPSC) z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) pacjentów z mukowiscydozą (CF) oraz przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP). Linie komórkowe oznaczono jako CF001, CF002 oraz COPD001. Do reprogramowania komórek wykorzystano nieintegrujące wektory wirusowe Sendai, dostarczające czynniki transkrypcyjne Yamanaki (OCT4, SOX2, cMYC i KLF4). Wszystkie trzy linie wykazały typową morfologię kolonii hiPSC. Pluripotencję potwierdzono poprzez immunobarwienie markerów powierzchniowych (SSEA4, TRA-1-60) oraz jądrowych (OCT4, SOX2). Zdolność do różnicowania się w trzy listki zarodkowe wykazano poprzez pozytywne barwienie odpowiednich markerów po bezpośrednim różnicowaniu *in vitro*. Utratę genów wirusa Sendai i egzogennych czynników reprogramujących potwierdzono metodą RT-qPCR. Analiza kariotypu wykazała prawidłowy kariotyp we wszystkich liniach. Genotypowanie krótkich powtórzeń tandemowych (STR) potwierdziło tożsamość genetyczną wyprowadzonych linii z komórkami dawców. Okresowe testy na obecność mykoplazmy w medium hodowlanym dawały wyniki negatywne. Wyprowadzone linie hiPSC zostały scharakteryzowane zgodnie z aktualnymi standardami i zbiobankowane, co umożliwi ich wykorzystanie w dalszych badaniach nad chorobami układu oddechowego, modelowaniu chorób, tworzeniu organoidów, badaniach toksykologicznych oraz inżynierii genetycznej. W przyszłości planowane jest dalsze rozwijanie metod reprogramowania i zastosowanie hiPSC w terapii komórkowej i regeneracyjnej.

## **9 Streszczenie w języku angielskim.**

The doctoral thesis focuses on research into human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and their applications in treating respiratory diseases such as cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). It presents the results of successful derivation and characterization of three lines of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The cell lines were designated as CF001, CF002, and COPD001. Non-integrating Sendai viral vectors delivering Yamanaka transcription factors (OCT4, SOX2, cMYC, and KLF4) were used for cell reprogramming. All three lines exhibited typical hiPSC colony morphology. Pluripotency was confirmed through immunostaining of surface markers (SSEA4, TRA-1-60) and nuclear markers (OCT4, SOX2). The ability to differentiate into the three germ layers was demonstrated by positive staining of appropriate markers after direct in vitro differentiation. The loss of Sendai virus genes and exogenous reprogramming factors was confirmed by RT-qPCR. Karyotype analysis showed a normal karyotype in all lines. Short tandem repeat (STR) genotyping confirmed the genetic identity of the derived lines with the donor cells. Periodic tests for mycoplasma presence in the culture medium yielded negative results. The derived hiPSC lines were characterized according to current standards and biobanked, enabling their use in further research on respiratory diseases, disease modeling, organoid creation, toxicological studies, and genetic engineering. Future plans include further development of reprogramming methods and the application of hiPSCs in cell and regenerative therapy.

## 10 Piśmiennictwo.

1. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term ‘stem cell’. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):35–8.
2. Dietel M. Boveri at 100: the life and times of Theodor Boveri. *J Pathol*. 2014 Oct;234(2):135–7.
3. Maehle AH. Ambiguous Cells: The Emergence of the Stem Cell Concept in the Nineteenth and Twentieth Centuries. *Notes Rec R Soc Lond*. 2011 Dec 20;65(4):359–78.
4. A MA. DER LYMPHOZYT ALS GEMEINSAME STAMMZELLE DER VERSCHIEDENEN BLUTELEMENTE IN DER EMBRYONALEN ENTWICKLUNG UND IM POSTFETALEN LEBEN DER SäuGETIERE. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2009;1(3):9–13.
5. Konstantinov IE. In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med*. 2000;43(2):269–76.
6. Haecker V. Über Gedächtnis, Vererbung und Pluripotenz. Gustav Fischer; Jena: 1914. pp. 63–85.
7. Andrews PW. The origins of human pluripotent stem cells: the road from a cancer to regenerative medicine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2024 May;60(5):514–20.
8. Stevens LC. The biology of teratomas. *Adv Morphog*. 1967;6:1–31.
9. Kleinsmith LJ, Pierce GB. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res*. 1964 Oct;24:1544–51.
10. Pierce GB. Neoplasms, Differentiations and Mutations. *Am J Pathol*. 1974 Oct;77(1):103–18.

11. Capp JP. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol*. 2019 Jun 11;2019:5189232.
12. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452–4.
13. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634–8.
14. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul;292(5819):154–6.
15. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145–7.
16. Zacharias DG, Nelson TJ, Mueller PS, Hook CC. The Science and Ethics of Induced Pluripotency: What Will Become of Embryonic Stem Cells? *Mayo Clin Proc*. 2011 Jul;86(7):634–40.
17. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
18. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663–76.
19. Colman A. Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel laureates in medicine or physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):5740–1.

20. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917–20.
21. Lendahl U. 100 plus years of stem cell research-20 years of ISSCR. *Stem Cell Reports*. 2022 Jun 14;17(6):1248–67.
22. Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Biores Open Access*. 2020 Apr 28;9(1):121–36.
23. Cieślak-Pobuda A, Knoflach V, Ringh MV, Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017 Jul 1;1864(7):1359–69.
24. Deng XY, Wang H, Wang T, Fang XT, Zou LL, Li ZY, et al. Non-Viral Methods For Generating Integration-Free, Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2015 Mar;10(2):153–8.
25. Kilic P, Cosar B. An Optimized Protocol for piggyBac-Induced iPSC Generation from hPBMCs by Automatic Electroporation. *Methods Mol Biol*. 2024;2736:193–205.
26. Davis RP, Nemes C, Varga E, Freund C, Kosmidis G, Gkatzis K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human foetal fibroblasts using the Sleeping Beauty transposon gene delivery system. *Differentiation*. 2013;86(1–2):30–7.
27. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells*. 2022 Jun 1;40(6):546–55.

28. Baghbaderani BA, Syama A, Sivapatham R, Pei Y, Mukherjee O, Fellner T, et al. Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications. *Stem Cell Rev.* 2016;12:394–420.
29. Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, Aoyama N, Baptista R, Bedford P, et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Medicine.* 2018 Oct;13(7):859–66.
30. Kato R, Matsumoto M, Sasaki H, Joto R, Okada M, Ikeda Y, et al. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Sci Rep.* 2016 Sep 26;6:34009.
31. Nagasaka R, Matsumoto M, Okada M, Sasaki H, Kanie K, Kii H, et al. Visualization of morphological categories of colonies for monitoring of effect on induced pluripotent stem cell culture status. *Regenerative Therapy.* 2017 Jun 1;6:41–51.
32. Mamaeva A, Krasnova O, Khvorova I, Kozlov K, Gursky V, Samsonova M, et al. Quality Control of Human Pluripotent Stem Cell Colonies by Computational Image Analysis Using Convolutional Neural Networks. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 21;24(1):140.
33. Chu SL, Sudo K, Yokota H, Abe K, Nakamura Y, Tsai MD. Human induced pluripotent stem cell formation and morphology prediction during reprogramming with time-lapse bright-field microscopy images using deep learning methods. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* 2023 Feb 1;229:107264.
34. Suresh Babu S, Duvvuru H, Baker J, Switalski S, Shafa M, Panchalingam KM, et al. Characterization of human induced pluripotent stems cells: Current approaches, challenges, and future solutions. *Biotechnol Rep (Amst).* 2023 Jan 24;37:e00784.

35. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014 Sep;111(6):1021–46.
36. Cheng YS, Xu M, Chen G, Beers J, Chen CZ, Liu C, et al. A Protocol for Culture and Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells After Induction. *Current Protocols*. 2023;3(8):e866.
37. O’Shea O, Steeg R, Chapman C, Mackintosh P, Stacey GN. Development and implementation of large-scale quality control for the European bank for induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Research*. 2020 May 1;45:101773.
38. Jo HY, Han HW, Jung I, Ju JH, Park SJ, Moon S, et al. Development of genetic quality tests for good manufacturing practice-compliant induced pluripotent stem cells and their derivatives. *Sci Rep*. 2020 Mar 3;10(1):3939.
39. Andrews P, Baker D, Benvenisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, et al. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Regenerative Medicine*. 2015 Mar;10(2s):1–44.
40. Andrews PW, Ben-David U, Benvenisty N, Coffey P, Eggan K, Knowles BB, et al. Assessing the Safety of Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives for Clinical Applications. *Stem Cell Reports*. 2017 Jul 11;9(1):1–4.
41. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev*. 2017;13(1):7–16.
42. Dashtban M, Panchalingam KM, Shafa M, Ahmadian Baghbaderani B. Addressing Manufacturing Challenges for Commercialization of iPSC-Based Therapies. *Methods Mol Biol*. 2021;2286:179–98.



43. Horiguchi I, Kino-oka M. Current Developments in the Stable Production of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Engineering*. 2021 Feb 1;7(2):144–52.
44. Steeg R, Mueller SC, Mah N, Holst B, Cabrera-Socorro A, Stacey GN, et al. EBiSC best practice: How to ensure optimal generation, qualification, and distribution of iPSC lines. *Stem Cell Reports*. 2021 Aug 10;16(8):1853–67.
45. Seltsmann S, Lekschas F, Müller R, Stachelscheid H, Bittner MS, Zhang W, et al. hPSCreg--the human pluripotent stem cell registry. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(D1):D757-763.
46. Stacey GN, Healy L. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Stem Cell Res*. 2021 May;53:102265.
47. Ludwig TE, Andrews PW, Barbaric I, Benvenisty N, Bhattacharyya A, Crook JM, et al. ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research. *Stem Cell Reports*. 2023 Sep 12;18(9):1744–52.
48. Calvert BA, Ryan Firth AL. Application of iPSC to Modelling of Respiratory Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1237:1–16.
49. Ament A, Kuznetsova I, Alexopoulos I, Vazquez-Armendariz A, Herold S. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC) derived lung organoids for disease modelling. *ERJ Open Research* [Internet]. 2023 Mar 9 [cited 2024 Aug 8];9(suppl 10). Available from: [https://openres.ersjournals.com/content/9/suppl\\_10/34](https://openres.ersjournals.com/content/9/suppl_10/34)
50. Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J*. 2019 Feb 15;38(4):e100300.
51. Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, Hill DR, Overeem AW, Shea LD, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc*. 2019 Feb;14(2):518–40.

52. Li Y, Wu Q, Sun X, Shen J, Chen H. Organoids as a Powerful Model for Respiratory Diseases. *Stem Cells Int.* 2020 Mar 11;2020:5847876.
53. Berical A, Lee RE, Lu J, Beermann ML, Le Suer JA, Mithal A, et al. A multimodal iPSC platform for cystic fibrosis drug testing. *Nat Commun.* 2022 Jul 29;13(1):4270.
54. Goecke T, Ius F, Ruhparwar A, Martin U. Unlocking the Future: Pluripotent Stem Cell-Based Lung Repair. *Cells.* 2024 Jan;13(7):635.
55. Allan KM, Farrow N, Donnelley M, Jaffe A, Waters SA. Treatment of Cystic Fibrosis: From Gene- to Cell-Based Therapies. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021 Mar 16 [cited 2024 Aug 8];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.639475/full>
56. Nakamura Y, Niho S, Shimizu Y. Cell-Based Therapy for Fibrosing Interstitial Lung Diseases, Current Status, and Potential Applications of iPSC-Derived Cells. *Cells.* 2024 Jan;13(11):893.
57. Madrid M, Sumen C, Aivio S, Saklayan N. Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Curr Protoc.* 2021 Mar;1(3):e88.
58. Kim Y, Rim YA, Yi H, Park N, Park SH, Ju JH. The Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Blood Cells: An Efficient Protocol Using Serial Plating of Reprogrammed Cells by Centrifugation. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1329459.
59. Sardo VL, Ferguson W, Erikson GA, Topol EJ, Baldwin KK, Torkamani A. The effect of aging on human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2017 Jan;35(1):69–74.
60. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016 Nov 19;388(10059):2519–31.

61. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell*. 2016 Feb 1;27(3):424–33.
62. Taylor-Cousar JL, Mall MA, Ramsey BW, McKone EF, Tullis E, Marigowda G, et al. Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles. *ERJ Open Res*. 2019 Apr;5(2):00082–2019.
63. Butnariu LI, Țarcă E, Cojocaru E, Rusu C, Moisă Ștefana M, Leon Constantin MM, et al. Genetic Modifying Factors of Cystic Fibrosis Phenotype: A Challenge for Modern Medicine. *Journal of Clinical Medicine*. 2021 Jan;10(24):5821.
64. Donaldson SH, Boucher RC. Sodium Channels and Cystic Fibrosis. *CHEST*. 2007 Nov 1;132(5):1631–6.
65. Zolin A, Bossi A, Cirilli N, Kashirskaya N, Padoan R. Cystic Fibrosis Mortality in Childhood. Data from European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Sep;15(9):2020.
66. Ong T, Ramsey BW. Cystic Fibrosis: A Review. *JAMA*. 2023 Jun 6;329(21):1859–71.
67. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med*. 2019 Nov 7;381(19):1809–19.
68. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med*. 2018 Oct 25;379(17):1612–20.

69. Gramegna A, Addy C, Allen L, Bakkeheim E, Brown C, Daniels T, et al. Standards for the care of people with cystic fibrosis (CF); Planning for a longer life. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2024 May 1;23(3):375–87.
70. Kramer-Golinkoff E, Camacho A, Kramer L, Taylor-Cousar JL. A survey: Understanding the health and perspectives of people with CF not benefiting from CFTR modulators. *Pediatr Pulmonol*. 2022 May;57(5):1253–61.
71. Caverly LJ, Riquelme SA, Hisert KB. The Impact of Highly Effective Modulator Therapy on Cystic Fibrosis Microbiology and Inflammation. *Clin Chest Med*. 2022 Dec;43(4):647–65.
72. Fajac I, Sermet I. Therapeutic Approaches for Patients with Cystic Fibrosis Not Eligible for Current CFTR Modulators. *Cells*. 2021 Oct;10(10):2793.
73. Dębczyński M, Gorrieri G, Mojsak D, Guida F, Zara F, Scudieri P. ATP12A Proton Pump as an Emerging Therapeutic Target in Cystic Fibrosis and Other Respiratory Diseases. *Biomolecules*. 2023 Sep 27;13(10):1455.
74. McGarry ME, McColley SA. Cystic fibrosis patients of minority race and ethnicity less likely eligible for CFTR modulators based on CFTR genotype. *Pediatr Pulmonol*. 2021 Jun;56(6):1496–503.
75. Simsek S, Zhou T, Robinson CL, Tsai SY, Crespo M, Amin S, et al. Modeling Cystic Fibrosis Using Pluripotent Stem Cell-Derived Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016 May;5(5):572–9.
76. Jiang JX, Wellhauser L, Laselva O, Utkina I, Bozoky Z, Gunawardena T, et al. A new platform for high-throughput therapy testing on iPSC-derived lung progenitor cells from cystic fibrosis patients. *Stem Cell Reports*. 2021 Oct 21;16(11):2825–37.
77. Dębczyński M, Mojsak D, Tamburro S, Baldassari S, Musante I, Casciaro R, et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line (IGGi002A) from

nasal cells of a cystic fibrosis patient homozygous for the G542X-CFTR mutation. *Stem Cell Research*. 2023 Oct 1;72:103232.

78. Pollard BS, Pollard HB. Induced pluripotent stem cells for treating cystic fibrosis: State of the science. *Pediatr Pulmonol*. 2018 Nov;53(S3):S12–29.

79. Fazleen A, Wilkinson T. Early COPD: current evidence for diagnosis and management. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14:1753466620942128.

80. Decramer M, Rennard S, Troosters T, Mapel DW, Giardino N, Mannino D, et al. COPD as a lung disease with systemic consequences--clinical impact, mechanisms, and potential for early intervention. *COPD*. 2008 Aug;5(4):235–56.

81. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Dec 3;1(1):1–21.

82. Pando-Sandoval A, Ruano-Ravina A, Candal-Pedreira C, Rodríguez-García C, Represas-Represas C, Golpe R, et al. Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in never-smokers: A systematic review. *Clin Respir J*. 2022 Feb 10;16(4):261–75.

83. Strange C. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Associated COPD. *Clin Chest Med*. 2020 Sep;41(3):339–45.

84. Ahmed E, Fieldes M, Mianné J, Bourguignon C, Nasri A, Vachier I, et al. Generation of four severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patient-derived induced pluripotent stem cell lines from peripheral blood mononuclear cells. *Stem Cell Research*. 2021 Oct 1;56:102550.

85. Deolmi M, Decarolis NM, Motta M, Makrinioti H, Fainardi V, Pisi G, et al. Early Origins of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prenatal and Early Life Risk Factors. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 27;20(3):2294.

86. Ahmed E, Fieldes M, Bourguignon C, Mianné J, Petit A, Jory M, et al. Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Severe COPD into Functional Airway Epithelium. *Cells*. 2022 Aug 5;11(15):2422.
87. Kaseran JE, Hurley K, Dodge M, Villacorta-Martin C, Vedaie M, Jean JC, et al. A Highly Phenotyped Open Access Repository of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2020 Jul 2;15(1):242–55.
88. Chan LLY, Anderson DE, Cheng HS, Ivan FX, Chen S, Kang AEZ, et al. The establishment of COPD organoids to study host-pathogen interaction reveals enhanced viral fitness of SARS-CoV-2 in bronchi. *Nat Commun*. 2022 Dec 10;13(1):7635.
89. Dagher R, Moldobaeva A, Gubbins E, Clark S, Madel Alfajaro M, Wilen CB, et al. Human iPSC-Based Model of COPD to Investigate Disease Mechanisms, Predict SARS-COV-2 Outcome, and Test Preventive Immunotherapy. *Stem Cells*. 2024 Mar 14;42(3):230–50.
90. Liu Y, Huang H. ACE2, a drug target for COVID-19 treatment? *Ir J Med Sci*. 2023;192(2):919–21.
91. Huang S, Li Y, Zeng J, Chang N, Cheng Y, Zhen X, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Asthma Therapy: Mechanisms and Strategies for Enhancement. *Cell Transplantation* [Internet]. 2023 Dec [cited 2024 Aug 11];32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10278440/>
92. Li CL, Xu ZB, Fan XL, Chen HX, Yu QN, Fang SB, et al. MicroRNA-21 Mediates the Protective Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from iPSCs to Human Bronchial Epithelial Cell Injury Under Hypoxia. *Cell Transplant*. 2018 Mar;27(3):571–83.

93. Royce SG, Mao W, Lim R, Kelly K, Samuel CS. iPSC- and mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cells provide greater protection against experimental chronic allergic airways disease compared with a clinically used corticosteroid. *FASEB J.* 2019 May;33(5):6402–11.
94. Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS, et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Allergic Airway Inflammation in Mice. *Stem Cells.* 2012 Dec;30(12):2692–9.
95. Zhang R, Yin Z, Pan J, Zhai C, Athari SS, Dong L. Effect of transfected induced pluripotent stem cells with Decorin gene on control of lung remodeling in allergic asthma. *J Investig Med.* 2023 Mar;71(3):235–43.
96. Rollins S d., Hao Y, Liu T, Lvova M, Fatima A, Little A, et al. A Genotype-faithful In Vitro Airway Epithelial Tissue Culture Platform Generated From Directed Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells for the Study of Asthma Susceptibility Genes. In: A29 EPITHELIUM: FIRST LINE OF DEFENSE [Internet]. American Thoracic Society; 2023 [cited 2024 Aug 11]. p. A1248–A1248. (American Thoracic Society International Conference Abstracts). Available from: [https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/ajrccm-conference.2023.207.1\\_MeetingAbstracts.A1248](https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/ajrccm-conference.2023.207.1_MeetingAbstracts.A1248)
97. Ptasinski V, Monkley SJ, Öst K, Tammia M, Alsafadi HN, Overed-Sayer C, et al. Modeling fibrotic alveolar transitional cells with pluripotent stem cell-derived alveolar organoids. *Life Sci Alliance.* 2023 Aug;6(8):e202201853.
98. Schruf E, Schroeder V, Le HQ, Schönberger T, Raedel D, Stewart EL, et al. Recapitulating idiopathic pulmonary fibrosis related alveolar epithelial dysfunction in a human iPSC-derived air-liquid interface model. *FASEB J.* 2020 Jun;34(6):7825–46.
99. Marcoux P, Hwang JW, Desterke C, Imeri J, Bennaceur-Griscelli A, Turhan AG. Modeling RET-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC):

Generation of Lung Progenitor Cells (LPCs) from Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *Cells*. 2023 Dec 15;12(24):2847.

100. Fujisaka Y, Nakagawa T, Tomoda K, Watanabe M, Matsunaga N, Tamura Y, et al. The cytotoxicity of gefitinib on patient-derived induced pluripotent stem cells reflects gefitinib-induced liver injury in the clinical setting. *Oncol Lett*. 2023 Oct 18;26(6):520.



## 11 Wykaz tabel i rycin.

Rycina 1. Morfologia kolonii iPSC CF001.

Rycina 2. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) CF001.

Rycina 3. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) CF001.

Rycina 4. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (AFP, SMA, TUJ1) CF001.

Rycina 5. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, CF001.

Rycina 6. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, CF001.

Rycina 7. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai CF001.

Rycina 8. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, CF001.

Rycina 9. Kariotyp CF001 (GTG).

Rycina 10. Analiza mutacji del508 CF001 (sekwencjonowanie).

Rycina 11. Morfologia kolonii iPSC COPD001.

Rycina 12. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) COPD001.

Rycina 13. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) COPD001.

Rycina 14. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (AFP, SMA, TUJ1) COPD001.

Rycina 15. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, COPD001.

Rycina 16. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, COPD001.

Rycina 17. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai, COPD001.

Rycina 18. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, COPD001.

Rycina 19. Kariotyp COPD001 (GTG).

Rycina 20. Morfologia kolonii iPSC CF002.

Rycina 21. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (OCT4, SSEA-4) CF002.

Rycina 22. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku pluripotencji (SOX2, TRA-1-60) CF002.

Rycina 23. Barwienia immunofluorescencyjne w kierunku trzech listków zarodkowych (OTX2, SOX17, Brachyury) CF002.

Rycina 24. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, SOX2, CF002.

Rycina 25. Detekcja resztkowego RNA wirusa Sendai, CF002.

Rycina 26. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, c-MYC, CF002.

Rycina 27. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, Klf4, CF002.

Rycina 28. Detekcja egzogenego czynnika reprogramującego. Ocena obecności RNA kodującego, OCT3/4, CF002.

Rycina 29. Kariotyp CF002 (kariomapping - system Illumina iScan).

Rycina 30. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą kontrola pozytywna (qPCR).

Rycina 31. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą - próbka badana (qPCR, hodowla CF002, pasaż 12).

Rycina 32. Przykładowa analiza badania w kierunku zanieczyszczenia mykoplazmą kontrola negatywna (qPCR).

Tabela 1. Kamienie milowe w rozwoju komórek macierzystych.

Tabela 2. Wykaz użytych przeciwciał.

Tabela 3. Wykaz użytych starterów.

## 12 Dorobek naukowy.

### 12.1 Wykaz publikacji naukowych i wystąpień konferencyjnych.

#### 12.1.1 Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe.

W czasopismach z „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	IF	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2023	1.	<b>Stem Cell Research</b> : 2023: 72, 4 pp., Article ID: 103232. <b>Dębczyński Michał</b> , Mojsak Damian, Tamburro Serena, Baldassari Simona, Musante Ilaria, Casciaro Rosaria, Cicirello Fabian, Zara Federico, Scudieri Paolo, Gorreri Giulia.  Generation of an induced pluripotent stem cell line (IGGi002A) from nasal cells of a cystic fibrosis patient homozygous for the G542X-CFTR mutation.	0,8	70
<b>Liczba prac: 1</b>			<b>Suma</b>	<b>70</b>
<b>punktów:</b>			<b>0,8</b>	<b>70</b>

W czasopismach bez „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2023	1.	<b>International Journal of Environmental Research and Public Health</b> : 2023: 20, 2, 12 pp, Article ID 1583.	20

Rok	Opis bibliograficzny pracy	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
	Mojsak Damian, <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Minarowski Łukasz, Kasiukiewicz Agnieszka, Moniuszko-Malinowska Anna, Czupryna Piotr, Mróz Robert Marek.  Impact of COVID-19 in patients with lung cancer: a descriptive analysis.	
<b>Liczba prac: 1</b> <b>punktów:</b>		<b>Suma</b> <b>20</b>

### 12.1.2 Opisy przypadków.

W czasopismach z „impact factor”:

Rok	Opis bibliograficzny pracy	IF	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2022	1. <b>Clinical Cancer Investigation Journal</b> : 2022: 11, 1, 4 pp.  Mojsak Damian, <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Ewing's sarcoma in a 58-year-old man: oncological diagnosis in the time of COVID-19.	0,1	20
	2. <b>American Journal of Case Reports</b> : 2022: 23, 7 pp, Article ID 936420.  Mojsak Damian, <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Moniuszko-Malinowska Anna, Mróz Robert Marek.  The many faces of immune checkpoint inhibitor-associated pneumonitis: 4 case reports.	1,2	70
	3. <b>American Journal of Case Reports</b> : 2022: 23, 6 pp., Article ID: e936536.  <b>Dębczyński Michał</b> , Mojsak Damian, Kuklińska Beata, Mróz Robert Marek.	1,2	70

Rok		Opis bibliograficzny pracy	IF	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
		A 75-year-old female smoker with advanced small-cell lung cancer and eastern cooperative oncology group performance status 2 who responded to combination immunochemotherapy with atezolizumab, etoposide, and carboplatin.		
<b>Liczba prac: 3 punktów:</b>			<b>Suma</b> 2,5	<b>160</b>

W czasopismach bez „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2022	1.	<b>Medycyna po Dyplomie:</b> 2022: 31, 4, s. 101-105.  Mojsak Damian, <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Idiopatyczne włóknienie płuc jako czynnik ryzyka raka płuca.	5
	2.	<b>Diabetologia po Dyplomie:</b> 2022, 2, s. 51-54.  <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Cukrzyca w trakcie immunoterapii z powodu raka płaskonabłonkowego płuca - opis przypadku.	5
<b>Liczba prac: 2 punktów:</b>			<b>Suma</b> 10

### 12.1.3 Prace poglądowe.

W czasopismach z „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	IF	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku	
2023	1.	<p><b>Biomolecules</b>: 2023: 13, 10, 10 pp., Article ID: 1455.</p> <p><b>Dębczyński Michał</b>, Gorrieri Giulia, Mojsak Damian, Guida Floriana, Zara Federico, Scudieri Paolo.</p> <p>Uwagi: Equal contribution: <b>Michał Dębczyński</b>, Giulia Gorrieri, Damian Mojsak.</p> <p><i>ATP12A</i> proton pump as an emerging therapeutic target in cystic fibrosis and other respiratory diseases.</p>	4,8	100	
	2.	<p><b>Advances in Medical Sciences</b>: 2023: 68, 1, s. 111-120.</p> <p><b>Dębczyński Michał</b>, Mojsak Damian, Minarowski Łukasz, Maciejewska Monika, Lisowski Paweł, Mróz Robert.</p> <p>Genome-engineering technologies for modeling and treatment of cystic fibrosis.</p>	2,5	100	
<p><b>Liczba prac: 2</b></p> <p><b>punktów:</b></p>			<b>Suma</b>	<b>7,3</b>	<b>200</b>

W czasopismach bez „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2018	1.	<b>Farmacja Polska</b> : 2018: 74, 3, s. 184-188.  Rysiak Edyta, Bogdańska Ewelina, Osińska Milena, Kazberuk Adam, <b>Dębczyński Michał</b> , Turlewicz Maciej, Kierdylewicz Rafał.  Pharmaceutical care for asthma.	0
2020	2.	<b>Terapia</b> : 2020: 28, 9, s. 18-21.  <b>Dębczyński Michał</b> , Mróz Robert.  Strategie leczenia COVID-19.	5
2021	3.	<b>Współczesna Onkologia-Contemporary Oncology</b> : 2021: 25, 1, s. 53-56.  Mojsak Damian, Kuklińska Beata, <b>Dębczyński Michał</b> , Mróz Robert.  Immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer with ECOG PS 2.	70
	4.	<b>Onkologia po Dyplomie</b> : 2021: 18, 5, s. 38-45.  <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert M.  Szybko narastający płyn w jamie opłucnowej.	5
	5.	<b>Onkologia po Dyplomie</b> : 2021: 18, 2, s. 42-47.  <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Neutropenia - zagrażające życiu powikłanie leczenia onkologicznego.	5
	6.	<b>Advances in Respiratory Medicine</b> : 2021: 89, 3, s. 291-298.  <b>Dębczyński Michał</b> , Guziejko Katarzyna, Mróz Robert Marek.  Self-management and integrated pulmonary care as an essential part of treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease.	40
<b>Liczba prac: 6</b>		<b>Suma</b>	<b>125</b>
<b>punktów:</b>			



#### 12.1.4 Inne publikacje.

Streszczenia ze zjazdów krajowych: 9

Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism nieposiadających „impact factor”:

Rok		Opis bibliograficzny pracy	Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku
2022	1.	<b>Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja:</b> 2022: 8, Suppl. B, s. B65-B67.  Uwagi: Special Issue (wydanie specjalne): Zastosowanie pembrolizumabu w leczeniu nowotworów płuca.  Mojsak Damian, <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Pembrolizumab with chemotherapy in a patient with advanced NSCLC with a history of radical treatment of prostate and pyriform sinus cancers.	5
	2.	<b>Onkologia w Praktyce Klinicznej - Edukacja:</b> 2022: 8, Suppl. B, s. B68-B71.  Uwagi: Special Issue (wydanie specjalne): Zastosowanie pembrolizumabu w leczeniu nowotworów płuca.  <b>Dębczyński Michał</b> , Mojsak Damian, Kuklińska Beata, Mróz Robert.  Effect of SARS-CoV-2 virus infection on immunochemotherapy treatment in a patient with non-small-cell lung cancer.	5
<b>Liczba prac: 2 punktów:</b>		<b>Suma</b>	<b>10</b>

Czasopismo bez nadanego numeru ISSN:

<b>Rok</b>		<b>Opis bibliograficzny pracy</b>	<b>Punktacja MNiSW zgodna z listą z 2024 roku</b>
2022	1.	<b>Wiadomości Onkologiczne w Pigułce. Rak Płuca:</b> 2022, 1, s. 3-7.  Uwagi: Czasopismo bez nadanego numeru ISSN.  <b>Dębczyński Michał</b> , Kuklińska Beata, Mojsak Damian, Mróz Robert.  Dakomitynib - kwalifikacja i leczenie zaawansowanego gruczołowego raka płuc. Opis przypadku.	0
<b>Liczba prac: 1</b> <b>punktów:</b>			<b>Suma</b> <b>0</b>

**Łączna punktacja całości dorobku:**

**Impact Factor:** 10,6

**Punktacja MNiSW (zgodna z obowiązującym  
od 2024 roku wykazem ministerialnym czasopism) – artykuły:** 585

***12.2 Granty i projekty.***

Kierownik 2 projektów finansowanych z subwencji UMB

Współwykonawca 2 projektów finansowanych z subwencji UMB.

Współwykonawca 1 projektu finansowanego z projektu ABM.

Stypendysta projektu „IDUB11” na staże zagraniczne finansowanego w ramach strategicznych działań rozwojowych UMB.

### ***12.3 Staże i szkolenia.***

Staż naukowy w DiNOGMI, Università di Genova, U.O.C. Genetica Medica, IRCSS Istituto Giannina Gaslini (Włochy) w dniach 13.10.2022 – 15.01.2023, uczestnictwo w projektach dotyczących:

- uzyskiwanie komórek hIPSC metodą reprogramowania komórek nabłonka oddechowego pobranych metodą wymazu szczoteczkowego z nosa od pacjentów w mukowiscydozę, hodowla i charakterystyka hIPSCs, (projekt zakończony wspólnymi publikacjami)
- hodowlach komórkowych in vitro i modelowania nabłonka dróg oddechowych z wykorzystaniem techniki Air-Liquid Interface Cell Culture (ALI)
- inżynierii genetycznej.

Szkolenie: Gene Editing iPSCs with CRISPR / Cas9. Bio-Trac Training Program at the Montgomery College Bioscience Education Center - w dniach 14-16, 2024 (Germantown, USA).

Szkolenie Organ Modelling and 3D Cell Culture 2024 Oxford Global 18 - 19 .03.2024 (London, UK).

Szkolenie: ThermoFisher High Content Analysis Training 09.05.2023 (Białystok).

### ***12.4 Inne aktywności naukowe.***

Recenzent publikacji naukowych w czasopismach: *Psycho-Oncologie* (2024), *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* (2021), *Journal of Chemotherapy* (2024).

Członek Jury 17<sup>th</sup> Białystok International Medical Congress (2023).

Członek Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc (PTChP).

Członek Europejskiego Towarzystwa Chorób Płuc (ERS).

## 13 Zgody Komisji Bioetycznej.

---

**KOMISJA BIOETYCZNA  
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. 85 748 54 07  
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, 15.12.2022 r.

Uchwała nr: APK.002.414.2022

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 790 z późn. zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena efektywności naprawy wybranych mutacji metodą CRISPR-Cas9 w komórkach pacjentów z mukowiscydozą in vitro” przez prof. dr hab. Roberta Marka Mroza wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 15.12.2022 r. do 31.XII.2023 r.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej przy UMB

  
dr n. farm. Krzysztof Chrzański

*Pouczenie:*

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

**KOMISJA BIOETYCZNA  
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1  
15-089 Białystok  
tel. 85 748 54 07  
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

---

Białystok, 15.12.2022 r.

Uchwała nr: APK.002.415.2022

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 790 z późn. zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena fenotypu i genotypu indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) przeprogramowanych z komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs) pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP)” przez prof. dr hab. Roberta Marka Mroza wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 15.12.2022 r. do 31.XII.2023 r.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej przy UMB

  
dr n. farm. Krzysztof Chrzanowski

*Pouczenie:*

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.