

AUTOREFERAT

1. **Imię i Nazwisko:** Tomasz Cichoń
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i rok ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

magister inżynier

Temat pracy: „Oczyszczanie preparatów plazmidowego DNA od endotoksyny oraz jej wpływ na transfekcję *in vitro* i *in vivo*”

Promotor: Prof. dr hab. S. Szala

Recenzenci: Prof. dr hab. M. Chorąży

Data nadania: 29 września 2000r.

Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny w Gliwicach. Praca magisterska przygotowana w Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach.

doktor nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna

Temat pracy: „Antyangiogenna terapia genowa w hamowaniu doświadczalnych przerzutów u myszy”.

Promotor: Prof. dr hab. S. Szala

Recenzenci: Prof. dr hab. M. Jakóbsiak, Prof. dr hab. Cz. Radzikowski

Data zatwierdzenia: 14 Grudnia 2005r.

Stopień nadała: Rada Naukowa Centrum-Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

06.12.1999r. w Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku technik;

2001r. w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku chemika;

od 2001r. do 2006r. w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku asystenta;

od 2006r. do 2010r. w Zakładzie Biologii Molekularnej na stanowisku adiunkta;

od 1 października 2010r. w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej

Nowotworów na stanowisku adiunkta;

od 1.01.2020r. w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie,

Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach, w Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów na stanowisku adiunkta;

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

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Komórki mezenchymalne w naprawie uszkodzonej tkanki mięśniowej.

Osiągnięcia naukowo - badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Moja przygoda z pracą naukową rozpoczęła się w roku 1999. W roku tym, będąc jeszcze słuchaczem piątego roku studiów Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej, zostałem zatrudniony w Zakładzie Biologii Molekularnej Centrum Onkologii w Gliwicach, w grupie Pana Prof. Stanisława Szali. Wcześniej, przez kilkanaście miesięcy, w ramach wolontariatu zapoznawałem się z pracą laboratoryjną w grupie Pana Prof. Marka Rusina oraz grupie wspomnianego już Pana Prof. Stanisława Szali.

Droga mojej kariery zawodowej przebiegała począwszy od stanowiska technika (1999r.), poprzez chemika (2001r.), asystenta naukowo-badawczego (2001r.) aż do adiunkta (od 2006r.). Pozwoliło mi to na poznanie funkcjonowania zakładu badawczego od podstaw oraz zdobycie niezbędnej praktyki pozwalającej na samodzielnie prowadzenie badań naukowych. Pod kierownictwem Pana Prof. S. Szali wykonałem pracę magisterską pt.: "Oczyszczanie preparatów plazmidowego DNA od endotoksyny oraz jej wpływ na transfekcję *in vitro* i *in vivo*", którą w 2000 roku obroniłem na Politechnice Śląskiej z wynikiem bardzo dobrym. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy magisterskiej zostały opublikowane w pracy pt.: "Direct *in vivo* transfer of plasmid DNA into murine tumors: effects of endotoxin presence and transgene localization" Budryk M, Cichoń T, Szala S., Acta Biochim Pol. 2001;48(3):795-800.

Od samego początku pracy w grupie Pana Prof. S. Szali prowadziłem badania na zwierzętach. Początkowo jako osoba uczestnicząca i wykonująca najprostsze zadania polegające na przygotowaniu zwierząt do doświadczeń, a z czasem już jako samodzielnie wykonujący procedury na zwierzętach. W ramach doświadczeń na myszach opracowałem model doświadczalnych przerzutów w płucach z wykorzystaniem komórek mysiego czerniaka B16-F10, ortotopowy model mysiego glejaka GL261, ortotopowy model mysiego raka nerki RENCA oraz model niedokrwiennej kończyny u myszy.

W okresie przed doktoratem brałem udział w realizacji sześciu projektów grantowych, a w jednym z nich byłem kierownikiem. W okresie tym byłem głównym autorem jednej oryginalnej pracy naukowej oraz współautorem kolejnych czterech. Mój łączny *Impact Factor* z prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora wynosi - 7,405.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie biologia medyczna uzyskałem 14 grudnia 2005r. Rozprawę doktorską pt.: „Antyangiogenna terapia genowa w hamowaniu doświadczalnych przerzutów u myszy”, podobnie jak pracę magisterską, wykonałem pod kierownictwem Pana Prof. S. Szali. Na posiedzeniu w dniu 14 grudnia 2005r. Rada Naukowa Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie postanowiła wyróżnić moją rozprawę doktorską. Posiadając stopień doktora oraz ugruntowaną pozycję w grupie Prof. S. Szali, jeszcze mocniej zaangażowałem się w funkcjonowanie i rozwój grupy.

Pierwszym moim przedsięwzięciem, które zakończyłem z sukcesem, było zaplanowanie i zorganizowanie laboratorium immunohistochemii. Do tej pory, nasza grupa nie posiadała takiego laboratorium, a wszelkie badania histochemiczne oraz immunohistochemiczne były wykonywane dzięki uprzejmości kolegów z innych grup. W ramach projektów grantowych zakupiliśmy niezbędny sprzęt (m.in. mikrotom). Ja natomiast opanowałem podstawowe techniki stosowane w histochemii oraz immunohistochemii, które z powodzeniem stosowałem, a następnie przekazałem moim kolegom. Obecnie nasza grupa posiada w pełni wyposażoną pracownię immunohistochemiczną, gdzie wykonywane są

złożone barwienia immunohistochemiczne oraz immunofluorescencyjne na skrawkach mrożeniowych, jak również parafinowych.

Byłem również pomysłodawcą i inicjatorem a następnie współautorem, projektu pt.: „Utworzenie Centrum Badań Translacyjnych w Dziedzinie Onkologii Molekularnej” w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, priorytet 2 „Infrastruktura sfery B+R”. Celem projektu było prowadzenie wysokiej jakości badań nad molekularnymi mechanizmami procesu nowotworzenia i nowymi przeciwnowotworowymi strategiami terapeutycznymi. Projekt został pozytywnie zaopiniowany i uzyskał dofinansowanie w wysokości 36 mln zł. Niestety Instytut zrezygnował z jego realizacji. W roku 2010 otrzymałem Nagrodę Dyrektora Centrum Onkologii – Instytut oddz. w Gliwicach - za pozyskiwanie środków europejskich.

Kolejnym przedsięwzięciem inwestycyjnym, w które byłem zaangażowany, była przebudowa oraz wyposażenie instytutowej zwierzętarni. Istniejąca zwierzętarnia była przestarzała, przez co bardzo mocno ograniczała nasze możliwości badawcze. Prace budowlane w zwierzętarni zostały wykonane częściowo dzięki środkom, które wraz z kolegami pozyskałem od sponsorów (m.in. Jastrzębska Spółka Węglowa). Wyposażenie do zwierzętarni zostało zakupione dzięki środkom projektu Śląska BIOFARMA w ramach Laboratorium Terapii Doświadczalnej, za utworzenie którego byłem odpowiedzialny. Zakupiono m.in. system przyżyciowej obserwacji myszy - IVIS Lumina XR firmy Caliper oraz system klatek indywidualnie wentylowanych - IVC XJ firmy Allentown. Klatki te pozwalają na utrzymywanie i prowadzenie badań z wykorzystaniem myszy z upośledzonym układem immunologicznym.

Doświadczenia na modelach zwierzęcych stanowią dla mnie najbardziej ekscytującą część prowadzonych badań. W planowaniu doświadczeń na zwierzętach zawsze kieruję się zasadą 3R, a ich dobrostan jest dla mnie rzeczą najważniejszą. Od 2016 roku jestem jedną z trzech osób odpowiedzialnych za dobrostan zwierząt znajdujących się w instytutowej zwierzętarni. Od 2016 roku jestem również członkiem Lokalnej Komisji Etycznej w Katowicach ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W roku 2020 zostałem wybrany na drugą kadencję. Oprócz dbania o dobro zwierząt staram się również szkolić nowych badaczy. W tym celu w roku 2017 zorganizowałem i prowadziłem szkolenie dla osób wykonujących procedury związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych.

Od początku mojej działalności naukowej, głównym kierunkiem moich badań było poszukiwanie nowych terapii oraz leków przeciwnowotworowych jak również badanie mikrośrodowiska nowotworowego. Prowadziłem badania, których celem było opracowanie terapii skojarzonej opartej na kombinacji chemioterapii z terapią antyangiogenną. W swoich badaniach stosowałem również czynniki antyangiogenne w celu normalizacji naczyń nowotworowych. Efektem tych badań jest kilka opublikowanych oryginalnych prac naukowych.

W roku 2003 (jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora) rozpocząłem współpracę ze Śląskim Centrum Chorób Serca w Zabrzu. W ramach projektu pt.: „Angiogeneza w niedokrwionej kończynie tylnej królika po stymulacji genami kodującymi czynniki wzrostu fibroblastów (bFGF) i hepacytów (HGF)” do niedokrwiennej kończyny królika, przy pomocy elektroporacji, wprowadzaliśmy plazmidowy DNA z genami kodującymi czynniki wzrostu: bFGF i HGF. W roku 2008 realizowałem wspólnie z SCCS w Zabrzu kolejny projekt grantowy pt.: "Ocena jakościowa i ilościowa puli endogennych, sercowych komórek macierzystych i progenitorowych (Cardiac Stem/Progenitor Cels) u pacjentów z ciężkim nieodwracalnym uszkodzeniem mięśnia sercowego"

W roku 2010 w ramach konsorcjum, które utworzyły Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu (lider projektu), Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii w Zabrzu oraz Centrum Onkologii w Gliwicach, rozpoczęliśmy realizację projektu pt.: „Sercowe komórki macierzyste i

progenitorowe – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca”. W ramach tego projektu nasza grupa po raz pierwszy rozpoczęła badania nad wykorzystaniem mezenchymalnych komórek zrębu do naprawy uszkodzonej tkanki mięśniowej. Wyniki uzyskane w ramach tego grantu (m.in. jedna z publikacji tworzących cykl habilitacyjny) były inspiracją do dalszych projektów badawczych dotyczących tej tematyki. W 2015 roku rozpocząłem, jako kierownik grantu, realizację projektu pt.: „Rola cytokiny IL-6 wydzielanej przez mezenchymalne komórki zrębu (MSC) w powstawaniu naczyń krwionośnych”. Projekt zakończył się w roku 2019, a powstałe w jego efekcie trzy publikacje są podstawą cyklu prac stanowiących przedmiot mojego postępowania habilitacyjnego.

Osiągnięcie naukowe będące przedmiotem rozprawy habilitacyjnej

Niniejsza rozprawa habilitacyjna została przygotowana na podstawie cyklu czterech prac opublikowanych w okresie 2016-2019 (w czasopismach o łącznym IF = 18,791).

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie publikacji naukowych w załączeniu.

Skorupa A, Ciszek M, Pilny E, Smolarczyk R, Jarosz-Biej M, Boguszewicz Ł, Krakowczyk Ł, Szala S, Sokół M, Cichoń T. Monitoring of diffusion properties and transverse relaxation time of mouse ischaemic muscle after administration of human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue, Cell Prolif. 2019;52(6):e12672.

Czapla J, Matuszczak S, Kulik K, Wiśniewska E, Pilny E, Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Sirek T, Zembala MO, Zembala M, Szala S, Cichoń T. The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells, Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):235.

Pilny E, Smolarczyk R, Jarosz-Biej M, Hadyk A, Skorupa A, Ciszek M, Krakowczyk Ł, Kułach N, Gillner D, Sokół M, Szala S, Cichoń T. Human ADSC xenograft through IL-6 secretion activates M2 macrophages responsible for the repair of damaged muscle tissue, Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):93.

Czapla J, Matuszczak S, Wiśniewska E, Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Głowala-Kosińska M, Śliwka J, Garbacz M, Szczypior M, Jaźwiec T, Langrzyk A, Zembala M, Szala S. Human Cardiac Mesenchymal Stromal Cells with CD105+CD34- Phenotype Enhance the Function of Post-Infarction Heart in Mice, PLoS ONE. 2016;11(7): e0158745.

Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Podstawy teoretyczne

Mezenchymalne komórki zrębu (Mesenchymal Stromal Cells, MSC) to heterogenna populacja komórek zdolnych do różnicowania w kierunku linii komórek mezodermalnych, morfologicznie zbliżonych do fibroblastów. Grupa Friedensteina jako pierwsza, pod koniec lat 60-tych ubiegłego wieku, wyizolowała ze szpiku kostnego, a następnie opisała mezenchymalne komórki zrębu MSC [1]. Przez wiele lat, wraz z pojawianiem się nowych informacji na temat właściwości komórek, próbowano znaleźć dla nich właściwą nazwę. Nazywano je mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (mesenchymal stem cells), mezenchymalnymi

komórkami zrębu (mesenchymal stromal cells), multipotentnymi komórkami zrębu (multipotent stromal cells), szpikowymi komórkami zrębu (marrow stromal cells) [2]. W 2005 roku Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (International Society for Cellular Therapy, ISCT) uznało za błędne stosowanie terminu „mezenchymalne komórki macierzyste” i zaproponowało nazwę „multipotentne mezenchymalne komórki zrębu” (Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) o akronimie MSC [3]. Do dnia dzisiejszego, nie potwierdzono możliwości MSC do różnicowania do wielu linii komórkowych, jak również zdolności do samoodnowy.

Ponieważ, MSC to bardzo heterogenna populacja komórek, pochodzących z różnych tkanek, istnieje duży problem z ich identyfikacją. W 2006 roku Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ISCT) zaproponowało trzy podstawowe cechy, które powinny posiadać MSC. (1) W hodowlach *in vitro* powinny przylegać do plastikowych podłoży. (2) Różnicować się do trzech linii komórkowych: adipocytów, chondroblastów i osteoblastów. (3) Posiadać na swojej powierzchni antygeny: CD105, CD73, CD90, jednocześnie nie posiadać antygenów CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 lub CD19 i HLA-DR [4].

Komórki mezenchymalne zrębu to komórki o działaniu plejotropowym, a ich właściwości zależą od warunków mikrośrodowiska, w którym się znajdują. Komórki mezenchymalne, podobnie jak np. makrofagi, pod wpływem czynników znajdujących się w mikrośrodowisku mogą ulegać polaryzacji. Niskie stężenie IFN- γ oraz TNF- α , powoduje polaryzację MSC do fenotypu prozapalnego - MSC1. Komórki wydzielają wtedy czynniki takie jak: IL-6, IL-8, TGF- β , MIP-1 α , MIP-1 β dzięki czemu następuje rekrutacja limfocytów T [5]. Wysokie stężenie IFN- γ oraz TNF- α powoduje polaryzację MSC do fenotypu przeciwwzapalnego – MSC2, a komórki zaczynają wydzielać czynniki takie jak:IDO, NO, PGE2, IL-4 oraz IL-10, co prowadzi do zahamowania proliferacji i cytotoksyczności limfocytów T, komórek NK, oraz dojrzewania DC i limfocytów B. Polaryzacja MSC może również nastąpić poprzez aktywację receptora TLR. Aktywacja receptora TLR4 na skutek związania LPS powoduje pojawienie się fenotypu prozapalnego (MSC1), natomiast aktywacja receptora TLR3 przy pomocy dsRNA wirusów fenotypu przeciwwzapalnego (MSC2) [6].

Komórki mezenchymalne zrębu posiadają właściwości immunomodulacyjne. Przez wydzielane czynniki m.in. IL-6, IDO, PGE2, COX-2, HGF wywierają wpływ na komórki układu immunologicznego m.in. na: makrofagi [7], limfocyty T [8], limfocyty B [9], komórki NK [10], komórki dendrytyczne [11]. Oddziaływanie komórek mezenchymalnych zrębu z komórkami układu immunologicznego, szczególnie z monocytami oraz makrofagami ma istotne znaczenie w procesach terapeutycznych z udziałem MSC. Mezenchymalne komórki zrębu pod wpływem wydzielanych czynników takich jak: IL-6, IDO, PGE2 powodują polaryzację makrofagów z fenotypu prozapalnego M1 do fenotypu przeciwwzapalnego M2 [12]. Polaryzacja makrofagów jest procesem odwracalnym. Brak m.in. IL-6 w mikrośrodowisku powoduje polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu prozapalnego M1, natomiast wysokie stężenie IL-6 powoduje polaryzację makrofagów do fenotypu przeciwwzapalnego, proangiogenego M2 [13]. Makrofagi M1 dzięki wydzielanym cytokinom prozapalnym takim jak: IL-12, IL-6, TNF- α INF- γ wykazują silne działanie bakteriobójcze oraz cytotoksyczne [14]. Makrofagi M2 poprzez wygaszanie reakcji zapalnej aktywują procesy naprawy tkanek. Wydzielają szereg cytokiny przeciwwzapalnych, takich jak: IL-10, IL-4, IL-13 oraz czynników proangiogennych m. in. VEGF [15]. Oddziaływanie między makrofagami a MSC ma istotne znaczenie w procesach naprawy uszkodzonych tkanek [16].

Potencjał terapeutyczny MSC nie polega na ich zdolności wbudowywania się w uszkodzoną tkankę a następnie różnicowania w kierunku komórek tkanki np. kardiomiocytów. Czas retencji wszczepianych MSC jest stosunkowo krótki i w zależności od drogi podania wynosi od kilku dni do kilku tygodni [17]. Kluczową rolę terapeutyczną odgrywają wydzielane

przez MSC czynniki o właściwościach immunostymulujących, proangiogennych, antyapoptotycznych oraz remodelujących macierz pozakomórkową [18]. Czynniki te wydzielane do mikrośrodowiska mogą hamować znajdujące się tam komórki układu immunologicznego (wygaszanie stanu zapalnego), aktywować procesy angiogenezy oraz wpływać na komórki macierzyste i progenitorowe, powodując ich proliferację oraz różnicowanie [19]. Te efekty obserwowane w tkance, spowodowane czynnikami wydzielanymi przez MSC, określa się mianem efektów parakrynych lub parakrynnym przekazywaniem sygnałów. Skład wydzielanych czynników przez MSC, może być w różny sposób modyfikowany, a genetycznie zmodyfikowane komórki mogą produkować ściśle określone zestawy białek [20]. MSC, do których wprowadzono gen Akt wydzielają czynniki proangiogenne (m.in. VEGF, FGF-1, IGF-2, HGF) [21] a te do których wprowadzono gen kodujący chemotaktyczne białko SDF-1, wydzielają HGF, ale jednocześnie hamują syntezę kolagenów I i III, a także metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 [22]. Oprócz genetycznych modyfikacji MSC, mogą być przekształcane przez hipoksję, szok cieplny, zwiększone ciśnienie tlenu oraz różne czynniki farmakologiczne (np. estrogeny, atorwastatynę) [23].

MSC, ze względu na swój ogromny potencjał, wykorzystywane są w leczeniu wielu chorób o podłożu kardiologicznym, ortopedycznym, hematologicznym, neurologicznym, autoimmunologicznym i wielu innych. Wg Clinical Trials do tej pory zarejestrowano ponad 1400 badań klinicznych z wykorzystaniem MSC (1156 dla „mesenchymal stem cells” i 252 „mesenchymal stromal cells”) (www.clinicaltrials.gov).

Omówienie wyników badań stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej.

Zaprezentowany cykl prac doświadczalnych stanowi podsumowanie wyników badań prowadzonych w ramach dwóch projektów badawczych, których celem było zbadanie możliwości wykorzystania komórek mezenchymalnych do naprawy uszkodzonej tkanki mięśniowej.

Jak już wspomniałem wcześniej, badania nad wykorzystaniem komórek mezenchymalnych w naprawie uszkodzonych tkanek rozpocząłem w roku 2010 w ramach projektu pt.: „Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe – nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca” współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka „Dotacje na innowacje”. Głównym celem projektu było opracowanie skutecznej terapii pacjentów z ciężką niewydolnością serca, opartej na terapii komórkowej wykorzystującej autologiczne komórki posiadające potencjał regeneracyjny.

Na podstawie doniesień literaturowych uznaliśmy że, populacja komórek mezenchymalnych (MSC) izolowanych z ludzkiego serca o fenotypie CD105⁺CD34⁻ posiada właściwości, które czynią je odpowiednimi do zastosowania w terapii komórkowej uszkodzonego/pozawałowego mięśnia sercowego. Celem naszych badań było wyizolowanie z ludzkich serc (usuwanych podczas transplantacji serca) MSC o fenotypie CD105⁺CD34⁻, oraz zbadanie ich potencjału regeneracyjnego na modelu mysiego zawału serca oraz mysiego modelu niedokrwiennej kończyny. W badaniach wykorzystywaliśmy komórki CD105⁺CD34⁻, izolowane z fragmentów prawej komory serca, pochodzące od 19 pacjentów. Komórki CD105⁺CD34⁻, w warunkach *in vitro*, wykazywały zdolność do różnicowania w kierunku adipocytów, osteoblastów i chondroblastów, jak również wydzielaly Interleukinę 6 i 8, oraz cząsteczki GRO. Interleukina 6 stanowiła cytokinę dominującą. W badaniach na mysim modelu

niedokrwiennej kończyny zaobserwowaliśmy, że podanie jednego miliona komórek CD105⁺CD34⁻ do niedokrwienego mięśnia powoduje jego szybszą odbudowę i poprawę funkcjonowania kończyny w porównaniu do myszy grupy kontrolnej otrzymujących PBS⁻. W niedokrwinnym mięśniu kończyny u myszy po podaniu komórek CD105⁺CD34⁻ zaobserwowaliśmy również większą liczbę naczyń krwionośnych, w porównaniu z grupą kontrolną otrzymującą PBS⁻. Komórki CD105⁺CD34⁻ podawaliśmy w okolicy blizny pozawałowej w siódmym dniu po wywołaniu zawału. U zwierząt, którym podano komórki CD105⁺CD34⁻ nastąpiło zmniejszenie wielkości blizny pozawałowej, w porównaniu do grupy myszy kontrolnych, którym podano PBS⁻. Stwierdziliśmy również zmniejszenie ilości kolagenu w grupie terapeutycznej, w stosunku do grupy kontrolnej PBS⁻. Zaobserwowaliśmy, że podanie komórek CD105⁺CD34⁻ zwiększa liczbę naczyń krwionośnych w bliźnie pozawałowej oraz w obszarze z nią graniczącym. Zmniejszenie blizny pozawałowej, jak również jej lepsze ukrwienie, wpłynęło na poprawę pracy pozawałowego serca. Na podstawie badania echokardiograficznego ustalono, że po 6 tygodniach od podania komórek, w grupie myszy, którym podano komórki CD105⁺CD34⁻, nastąpił wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF) z 38,8% (dzień podania komórek) do 42,5%. Natomiast, w grupie myszy kontrolnych, obserwowano dalszy spadek kurczliwości serca. W pobliżu wszczepionych komórek CD105⁺CD34⁻, zidentyfikowaliśmy makrofagi o fenotypie M2 (F4/80⁺CD206⁺) oraz niewielką liczbę makrofagów M1 (F4/80⁺CD86⁺). Przetawione wyniki zostały opublikowane w pracy: Czapla J, Matuszczak S, Wiśniewska E, Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, **Cichoń T**, Głowala-Kosińska M, Śliwka J, Garbacz M, Szczypior M, Jaźwiec T, Langrzyk A, Zembala M, Szala S: „*Human Cardiac Mesenchymal Stromal Cells with CD105⁺CD34⁻ Phenotype Enhance the Function of Post-Infarction Heart in Mice*”

Uzyskane wyniki zostały wykorzystane jako punkt wyjścia do dalszych badań z wykorzystaniem komórek mezenchymalnych, prowadzonych m.in. w ramach projektu NCN OPUS pt.: „Rola cytokiny IL-6 wydzielanej przez mezenchymalne komórki zrębu (MSC) w powstawaniu nowych naczyń krwionośnych”, którego byłem kierownikiem. Głównym celem badawczym tego projektu było wyjaśnienie mechanizmu naprawy uszkodzonego/niedokrwienego mięśnia, z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek zrębu. W badaniach wykorzystaliśmy ludzkie mezenchymalne komórki zrębu izolowane z podskórnej tkanki tłuszczowej zlokalizowanej w okolicach brzucha (hADSC – human adipose tissue- derived stromal cells). Izolacja komórek mezenchymalnych z tłuszczu posiada wiele zalet. Najważniejsze z nich to bezpieczny i prosty sposób pobierania tkanki tłuszczowej, najczęściej w trakcie liposukcji, oraz duża wydajność izolacji komórek. Szacuje się, że jest ona około pięć razy bardziej wydajna niż np. izolacja komórek mezenchymalnych ze szpiku kostnego [24]. W trakcie badań ustalono, że czas przeżycia hADSC po transferze do mięśnia kończyny u myszy C57BL/6NCr1 wynosi około 14 dni. W sąsiedztwie hADSC obserwowany jest naciek immunosupresyjnych i proangiogennych makrofagów M2. Postawiliśmy zatem hipotezę, według której, proces naprawy uszkodzonej tkanki mięśniowej z wykorzystaniem hADSC przebiega według następującego mechanizmu: hADSC wydzielają IL-6. Cytokina ta aktywuje makrofagi M2, które stymulują powstawanie nowych naczyń krwionośnych i naprawę uszkodzonej tkanki. Aby potwierdzić naszą hipotezę przeprowadziliśmy dwa doświadczeń polegające na wykluczeniu jednego z elementów zaproponowanego przez nas mechanizmu. W pierwszym doświadczeniu z wykorzystaniem liposomów zawierających kłodronian przeprowadzono deplecję makrofagów. W grupie myszy, którym podawano hADSC wraz z liposomami z kłodronianem, liczba nowo powstałych naczyń krwionośnych była mniejsza, niż u myszy, którym podano hADSC z liposomami z PBS⁻ i zbliżona do liczby

naczyń u myszy, którym podano sam PBS⁻. W doświadczeniu drugim założyliśmy, że zablokowanie ludzkiej IL-6 przy pomocy przeciwciała anti-IL-6 zahamuje aktywację makrofagów M2. U myszy, którym podawano przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej IL-6, a następnie hADSC, nie zaobserwowano napływu makrofagów M2. Liczba nowopowstałych naczyń krwionośnych w tej grupie myszy była mniejsza, niż w grupie myszy, które otrzymały hADSC, ale porównywalna z liczbą naczyń u myszy, które otrzymały PBS⁻.

Postanowiliśmy również sprawdzić, czy do naprawy uszkodzonego mięśnia wystarczy sama ludzka IL-6, bez konieczności podawania hADSC. Aby odpowiedzieć na to pytanie, grupie myszy podano białko ludzkiej lub mysiej IL-6. Kontrolę stanowiły myszy, którym podano PBS⁻ i hADSC. U myszy, którym podano białko IL-6, ludzkie lub mysie, liczba makrofagów była podobna, lecz większa niż u myszy, którym podano PBS⁻. Natomiast liczba naczyń, w grupie gdzie podano ludzką IL-6, była większa, niż w grupie gdzie podano mysią IL-6. Największą liczbę napływających makrofagów oraz naczyń krwionośnych zaobserwowano w grupie myszy, którym podano hADSC.

Na podstawie uzyskanych przez nas wyników możemy stwierdzić, że mechanizm naprawy uszkodzonego mięśnia z wykorzystaniem hADSC polega na wydzielaniu przez nie IL-6, która aktywuje makrofagi M2 stymulujące powstawanie nowych naczyń krwionośnych.

Przetawione wyniki zostały opublikowane w pracy: Pilny E, Smolarczyk R, Jarosz-Biej M, Hadyk A, Skorupa A, Ciszek M, Krakowczyk Ł, Kułach N, Gillner D, Sokół M, Szala S, **Cichoń T**: *Human ADSC xenograft through IL-6 secretion activates M2 macrophages responsible for the repair of damaged muscle tissue.*

Do oceny postępu naprawy uszkodzonej tkanki mięśniowej z wykorzystaniem hADSC, stosowaliśmy również obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Technika ta posiada mechanizmy do wieloparametrycznej charakterystyki uszkodzonej tkanki. Są nimi m.in. czas relaksacji poprzecznej (T2), wzrastający wraz z obrzękiem tkanek, martwicą i stanem zapalnym oraz dyfuzyjne obrazowanie tensorowe (DTI), umożliwiające mapowanie procesu dyfuzji wody. Badania MRI zostały wykonane na skanerze Bruker 9.4 T wyposażonym w system gradientowy Micro2. W 3 dniu od podania komórek w grupie myszy otrzymujących hADSC zaobserwowaliśmy zwiększony czas relaksacji T2 w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast w 7 dniu od podania hADSC zaobserwowaliśmy zarówno zwiększone T2 jak również zmniejszone wartości λ_3 tensora dyfuzji dla grupy myszy, które otrzymały hADSC w porównaniu z grupami kontrolnymi. Zwiększenie T2 wiązało się ze zwiększoną infiltracją makrofagów M2 w niedokrwiennej kończynie a zmniejszenie λ_3 dyfuzji z obecnością małych regenerujących się włókien. Wyniki uzyskane w trakcie obrazowania metodą rezonansu magnetycznego MRI potwierdziły udział makrofagów w procesie naprawy uszkodzonej/niedokrwiennej tkanki mięśniowej oraz duży potencjał metody w ocenie postępów terapii komórkowej. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w pracy: Skorupa A, Ciszek M, Pilny E, Smolarczyk R, Jarosz-Biej M, Boguszewicz Ł, Krakowczyk Ł, Szala S, Sokół M, **Cichoń T**: *Monitoring of diffusion properties and transverse relaxation time of mouse ischaemic muscle after administration of human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue.*

W badaniach naszych zauważyliśmy, że komórki izolowane z fragmentów tkanki tłuszczowej pobranej od różnych dawców różniły się morfologią, poziomem wydzielanych cytokin i czynników wzrostu oraz zdolnością do namnażania. W kilku przypadkach, wyizolowane hADSC nie dzieliły się a po pewnym czasie ginęły. Dodatkowo, na stan komórek, duży wpływ ma proces izolacji oraz skład pożywek hodowlanych. Biorąc to pod uwagę postanowiliśmy porównać kilka z dostępnych pożywek hodowlanych. Naszym celem było

opracowanie procedury hodowlanej, opartej na sprawdzonej pożywce, pozwalającej na pozyskanie dużej liczby hADSC w możliwie krótkim czasie. Dodatkowym istotnym kryterium było bezpieczeństwo pacjentów w trakcie terapii z wykorzystaniem hADSC. W tym celu porównaliśmy trzy rodzaje pożywek hodowlanych wykorzystywanych do hodowli hADSC. Pierwsza z nich to pożywka hodowlana α MEM (*α -modified Minimum Essential Medium*) suplementowana 10% lizatem z ludzkich płytek (hPL). Pożywka druga to DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) również suplementowana 10% lizatem z ludzkich płytek (hPL). I ostatnia, to DMEM suplementowane 20% surowicą bydlęcą (FBS) z dodatkiem ludzkiego czynnika wzrostu fibroblastów (10 ng/mL bFGF). Oceniliśmy wpływ testowanych pożywek hodowlanych na kinetykę wzrostu hADSC, ich morfologię i fenotyp, zdolność do różnicowania oraz potencjał klonogeny i sekretom. Nie zauważyliśmy różnic, w zależności od stosowanej pożywki hodowlanej, w morfologii, fenotypie, potencjale do różnicowania, zdolności do tworzenia klonów i wydzielanych cytokinach i czynnikach wzrostu hADSC. Zaobserwowaliśmy natomiast wpływ pożywki hodowlanej na kinetykę wzrostu hADSC. Najwyższy wskaźnik proliferacji hADSC zaobserwowano stosując jako pożywkę hodowlaną α MEM z dodatkiem 10% hPL. Uzyskane wyniki przedstawiliśmy w naszej kolejnej pracy: Czaplą J, Matuszczak S, Kulik K, Wiśniewska E, Pilny E, Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Sirek T, Zembala MO, Zembala M, Szala S, **Cichoń T**: *The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells.*

Wnioski płynące z opublikowanych prac.

1. Ludzkie mezenchymalne komórki zrębu wykazują dużą skuteczność w naprawie uszkodzonego w wyniku niedokrwienia mięśnia.
2. Jeden z możliwych mechanizmów naprawy uszkodzonego w wyniku niedokrwienia mięśnia z wykorzystaniem hADSC polega na wydzielaniu przez te komórki interleukiny 6, która aktywuje makrofagi o fenotypie M2, stymulujące powstawanie nowych naczyń krwionośnych.
3. Możliwa jest hodowla hADSC, w pożywkach nie zawierających antygenów pochodzenia zwierzęcego, pozwalająca na uzyskanie dużej liczby komórek do bezpiecznego zastosowania klinicznego.
4. Technika obrazowania metodą rezonansu magnetycznego pozwala na skuteczną ocenę postępów terapii komórkowej uszkodzonego na skutek niedokrwienia mięśnia z wykorzystaniem hADSC.

W perspektywicznych zamierzeniach naszego zespołu dążymy do wykorzystania hADSC w badaniach klinicznych. Wymaga to jednak znalezienia odpowiedzi na kilka istotnych pytań. Na kilka z nich udało nam się już odpowiedzieć, co przedstawiłem powyżej, ale na kilka, szukamy ciągle odpowiedzi. Pytania te brzmią następująco: Jaką drogę podania hADSC wybrać? Czy ma to być podanie miejscowe czy też systemowe? Jednorazowe czy wielokrotne? Aktualnie jesteśmy na końcowym etapie badań, które dadzą nam odpowiedź na te pytania. Wydaje się zatem, że już niedługo będziemy dysponowali odpowiednią wiedzą oraz warsztatem pozwalającym nam na rozpoczęcie badań klinicznych.

Literatura

1. Friedenstein, A.J., et al. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. 16(3): p. 381-90.
2. Caplan, A.I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*, 2017. 6(6): p. 1445-1451.
3. Horwitz E.M., et al. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7: 393-395.
4. Dominici, M., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
5. Li, W., et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.*, 2012. 19, pp. 1505-1513.
6. Bernardo, M.E. and W.E. Fibbe, Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 2013. 13(4): p. 392-402.
7. Mao, F., et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in inflammatory bowel disease and associated colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*., 2017. 2, pp. 91-97.
8. Duffy, M., et al. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.*, 2011. 2, p. 34.
9. Lee, D., & Song, S. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Cell Immunol.*, 2017. pp. S0008-8749. doi:doi: 10.1016/j.cellimm.2017.08.009.
10. Spaggiari, G., & Moretta, L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunol Cell Biol.*, 2013. 91, pp. 27-31.
11. Nauta, A., et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 2006. 177, pp. 2080-2087.
12. Zheng, G., et al. Mesenchymal Stromal Cells Affect Disease Outcomes via Macrophage Polarization. *Stem Cells Int*. 2015; 2015: 989473.
13. Eggenhofer, E. and M.J. Hoogduijn. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res*, 2012. 1(1): p. 12.
14. Shapouri-Moghaddam, A., et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 2018. 233(9): p. 6425-6440.
15. Yao, Y., X.H. Xu, and L. Jin. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 792.
16. Pilny, E., et al. Human ADSC xenograft through IL-6 secretion activates M2 macrophages responsible for the repair of damaged muscle tissue. *Stem Cell Res Ther*, 2019. 10(1): p. 93.
17. Agrawal, H., et al. Human adipose-derived stromal/stem cells demonstrate short-lived persistence after implantation in both an immunocompetent and an immunocompromised murine model. *Stem Cell Res Ther*, 2014. 5(6): p. 142.
18. Bruno, S., et al. The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett*. 2015; 168: 154-158.
19. Wang, Y., et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014; 15: 1009-1016.

20. Ranganath, S.H., et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, 2012; 10: 244–258.
21. Gnecci, M., et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*, 2006; 20: 661–669.
22. Tang, J., et al. Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 alpha improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. *Mol Cells*, 2010; 29: 9–19.
23. Mirosou, M., et al. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 50: 280–289.
24. Frese, L., et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. *Transfus Med Hemother*, 2016. 43(4): p. 268-274.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Od roku 2015 do roku 2017 brałem udział w organizacji, a następnie kierowałem Bankiem Tkanek i Komórek w Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej i Izolowanych Tkanek i Narządów Śląskiego Parku Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia w Zabrze. Pozwoliło mi to na zdobycie wiedzy oraz doświadczenia niezbędnego do pracy w laboratorium typu „Clean room”. Zajmowałem się również działalnością dydaktyczną. W latach 2014 - 2018 w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Politechniki Śląskiej w Gliwicach prowadziłem wykłady oraz byłem odpowiedzialny za prowadzenie przedmiotu pt. „Metody badania aktywności biologicznej substancji”. Byłem wykładowcą w ramach szkoleń i kursów CMKP prowadzonych przez NIO. Opiekowałem się studentami w ramach wolontariatów, praktyk i staży studenckich. Byłem opiekunem 6 prac magisterskich, współpromotorem trzech prac licencjackich oraz jednej magisterskiej. Jestem współpromotorem rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Pilny pt.: „Właściwości proangiogenne mezenchymalnych komórek zrębu izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej (ADSC)”, której obrona odbędzie się na Politechnice Śląskiej w Gliwicach pod koniec 2020r.

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem lub biorę udział w realizacji 20 projektów grantowych, a trzema z nich kierowałem. Jestem współautorem lub autorem 35 oryginalnych prac naukowych. Jestem również współautorem i autorem 74 doniesień zjazdowych (wystąpienia ustne i plakatowe). Mój łączny *Impact Factor* z prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora wynosi - 94,307.

Plany na przyszłość

Plany badawcze.

W przyszłości planuję realizować dwa kierunki badawcze. Kierunek pierwszy to kontynuacja badań nad wykorzystaniem mezenchymalnych komórek zrębu do naprawy uszkodzonych tkanek. Obecnie, jestem członkiem zespołu realizującego grant wewnętrzny pt.: „Rekonstrukcja tchawicy szczura z wykorzystaniem acellularnej allogenicznej tchawicy oraz mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego – badania wstępne” pod kierownictwem prof. Adama Maciejewskiego. Projekt ten zakłada wykorzystanie ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego do odtworzenia tchawicy

szczura. W tym celu na acellularnej tchawicy szczura zostaną namnożone meznchymalne komórki zrębu. Komórki te następnie zostaną poddane różnicowaniu w kierunku chondrocytów. Tak spreparowany fragment tchawicy, zostanie wszyty w tchawicę szczura. Sądzymy, że po pewnym czasie nastąpi całkowite zespolenie przeszczepionej tchawicy z tchawicą szczura. Wyniki uzyskane we wspomnianym projekcie będą stanowiły wyniki wstępne większego projektu, w ramach którego zaplanowane zostaną doświadczenia na dużych zwierzętach oraz wstępne badania kliniczne.

Kierunek drugi to badania nad opracowaniem przeciwnowotworowej terapii komórkowej opartej na modyfikowanych genetycznie makrofagach M1. Obecnie realizuję projekt wewnętrzny, którego jestem kierownikiem, pt.: „Wykorzystanie modyfikowanych genetycznie *ex vivo* makrofagów M1 w terapii przeciwnowotworowej”. W proponowanym przeze mnie projekcie myszom z guzami nowotworowymi zostaną podane autologiczne, zmodyfikowane genetycznie: Interleukiną 12 oraz czerwonym białkiem RFP makrofagi (makrofagi M1/IL-12+/RFP) hodowane *ex vivo*. Zmodyfikowane tak makrofagi M1/IL-12+/RFP wprowadzone do guzów pierwotnych nie tylko będą niszczyły komórki nowotworowe, ale również dzięki wydzielanej IL-12 spowodują polaryzację rezydentnych makrofagów TAM (M2) do makrofagów cytotoksycznych M1. Makrofagi TAM (M2) to komórki biorące udział w progresji nowotworu. Ich zablokowanie lub deplecja powoduje zahamowanie wzrostu nowotworów. Dodatkowo wydzielana do mikrośrodowiska guza Interleukina 12 będzie aktywować pozostałe komórki układu immunologicznego, takie jak limfocyty B i T oraz komórki NK. W celu rozróżnienia wprowadzonych makrofagów M1/IL-12+/RFP od makrofagów rezydentnych TAM (M2) oraz napływowych pochodzenia szpikowego opracowany zostanie model myszy „chimery” z zielonym szpikiem BM/GFP+ (GFP - green fluorescent protein). W tym celu, u myszy szczepu C57BL/6NCrl zostanie zniszczony szpik kostny (jednorazowe napromienienie myszy dawką 10 Gy na całe ciało), a następnie do żyły ogonowej zostanie podany odpowiednio przygotowany szpik kostny pobrany od myszy transgenicznej - GFP (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J). W realizacji mojego projektu wykorzystuję doświadczenie oraz wiedzę, jaką zdobyłem dzięki współpracy z kolegami z Oddziału Hematoonkologii ze Szpitala Uniwersyteckiego w Ostrawie. Wspólnie prowadzimy badania nad przeciwnowotworową terapią komórkową wykorzystującą ludzkie komórki NK.

Plany modernizacji infrastruktury badawczej.

Zostałem osobą odpowiedzialną za realizację projektu (tytuł roboczy) pt.: „Utworzenie Śląskiego Centrum Przedklinicznych Badań Onkologicznych”. Projekt zakłada zaprojektowanie, wybudowanie oraz wyposażenie ośrodka, którego celem będzie prowadzenie szkoleń, badań podstawowych oraz badań przedklinicznych z dziedziny onkologii. W ramach projektu powstanie budynek, w którym zostaną zlokalizowane następujące pracownie: pracownia doświadczalnej radioterapii zwierząt, na wyposażeniu której będzie przyspieszacz liniowy firmy Varian, pracownia PET dla zwierząt, zwierzętarnia (nowa zwierzętarnia zastąpi obecną) oraz pracownia hodowli komórkowej. Przy pracach z projektem nieocenione okazało się doświadczenie, jakie zdobyłem w trakcie mojej działalności w Śląskim Parku Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia w Zabrze.

Podsumowanie

Od początku moja działalność naukowa związana jest z Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowym Instytutem Badawczym Oddział w Gliwicach, wcześniej z Centrum Onkologii – Instytutem im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach. Miałem szczęście trafić i następnie pracować w grupie Śp. Pana Prof. Stanisława Szali. To on ukształtował we mnie badacza i wszystkiego mnie nauczył. Codziennie czerpałem od niego nie tylko wiedzę zawodową ale również życiową. Niestety w roku 2018 odszedł.

Mam zamiar dalej prowadzić swoją działalność naukową w NIO w Gliwicach. Moje badania będą się koncentrowały na poszukiwaniu nowych terapii przeciwnowotworowych, badaniu mikrośrodowiska nowotworowego oraz wykorzystywaniu mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego do naprawy uszkodzonych tkanek.

Dorobek naukowy wg. danych bibliometrycznych.

Jestem autorem lub współautorem **40 publikacji** oraz **88 doniesień zjazdowych** (doniesienia ustne i plakatowe). **Sumaryczny Impact Factor** moich prac z dnia 30.09.2020 wynosi **101,712**. **Liczba cytowań bez autocytowań** według bazy Web of Science (WoS) z dnia 30.09.2020 wynosi **507** przy **całkowitej liczbie cytowań** wynoszącej **545** a według bazy Scopus: **573** (bez autocytowań **490**). **Indeks Hirscha** według bazy Web of Science (WoS) z dnia 30.09.2020 wynosi **13** (**14** wg. bazy Scopus).

Tomasz Cichoci

