

Autoreferat

dr n med. Kamila Duś-Szachniewicz



Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Lekarski

Katedra Patologii Klinicznej i Doświadczalnej

Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej

Wrocław 2022

Autoreferat

- 1. Imię i nazwisko:** Kamila Duś-Szachniewicz
- 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

2016- dyplom doktora nauk medycznych, z wyróżnieniem- cum laude. Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; promotor Prof. dr hab. Piotr Ziółkowski. Temat pracy doktorskiej: Analiza proteomu gruczolaka i gruczolakoraka jelita grubego metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem archiwalnych tkanek zatopionych w parafinie.

2009- dyplom magistra biologii, specjalność genetyka i mikrobiologia, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski; promotor Prof. dr hab. Ewa Obłąk. Temat pracy magisterskiej: Wrażliwość drożdży piekarniczych *Sacharomyces cerevisiae* na aminoestry i związki lizosomotropowe.

2007- dyplom licencjata biologii z chemią, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski; promotor Prof. dr hab. Ewa Obłąk.

- 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

Od X.2016r. do chwili obecnej- adiunkt w Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Katedry Patologii Klinicznej i Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Udokumentowana przerwa w aktywności naukowej na urlopie zdrowotnym (16.09.2018-7.03.2019) oraz urlopie macierzyńskim i rodzicielskim (22.03.2012-22.08.2012 i 8.03.2019-6.03.2020).

- 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z**

uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

Rozprawę habilitacyjną stanowi cykl pięciu powiązanych tematycznie publikacji naukowych. Publikacje powstały w latach 2018-2022, wszystkie z nich to prace oryginalne. Rozprawa przedstawiana jest jako osiągnięcie naukowe pt. **Wykorzystanie szczypiec optycznych do oceny wpływu wybranych czynników mikrośrodowiska oraz leków przeciwnowotworowych na adhezję chłoniaków nie-Hodgkina.**

4.1 Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Duś-Szachniewicz K**, Drobczyński S, Ziółkowski P, Kołodziej P, Walaszek KM, Korzeniewska AK, Agrawal A, Kupczyk P, Woźniak M. Physiological hypoxia (physioxia) impairs the early adhesion of single lymphoma cell to marrow stromal cell and extracellular matrix. Optical tweezers study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018 Jun 26;19(7):1880.

IF: 4.183

Pkt. MEiN: 30.00

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, stworzeniu koncepcji oraz zapewnieniu integralności całego projektu, opracowaniu metody pomiarowej, przeprowadzeniu badań, analizie merytorycznej i interpretacji wyników, analizie statystycznej, opracowaniu graficznym wyników, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu poprawek po recenzji. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

2. **Duś-Szachniewicz K**, Drobczyński S, Woźniak M, Zduniak K, Ostasiewicz K, Ziółkowski P, Korzeniewska AK, Agrawal AK, Kołodziej P, Walaszek K, Bystydziński Z, Rymkiewicz G. Differentiation of single lymphoma primary cells and normal B-cells based on their adhesion to mesenchymal stromal cells in optical tweezers. *Scientific Reports*. 2019 Jul 8;9(1):9885.

IF: 3.998

Pkt. MEiN: 140.00

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, stworzeniu koncepcji oraz zapewnieniu integralności całego projektu, przeprowadzeniu badań, analizie merytorycznej i interpretacji wyników, analizie statystycznej, opracowaniu graficznym wyników, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu poprawek po recenzji. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

3. **Duś-Szachniewicz K**, Rymkiewicz G, Agrawal AK, Kołodziej P, Wiśniewski JR. Large-scale proteomic analysis of follicular lymphoma reveals extensive remodeling of cell adhesion pathway and identifies hub proteins related to the lymphomagenesis. *Cancers*. 2021 Feb 5;13(4):630.
IF: 6.575
Pkt. MEiN: 140.00

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, stworzeniu koncepcji oraz zapewnieniu integralności całego projektu, przygotowaniu próbek do analizy proteomicznej, analizie biostatystycznej i interpretacji wyników, opracowaniu graficznym wyników, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 90%.

4. **Duś-Szachniewicz K**, Gdesz-Birula K, Rymkiewicz G. Development and Characterization of 3D hybrid spheroids for the investigation of the crosstalk between B-cell non-Hodgkin lymphomas and mesenchymal stromal cells. *OncoTargets and Therapy*. 2022 Jun 17;15:683-697.
IF: 4.345
Pkt. MEiN: 70.00

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, stworzeniu koncepcji oraz zapewnieniu integralności całego projektu, opracowaniu metody tworzenia steroidów mieszanych, analizie merytorycznej i interpretacji wyników, analizie statystycznej, opracowaniu graficznym wyników, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 90%.

5. **Duś-Szachniewicz K**, Gdesz-Birula K, Nowosielska E, Ziółkowski P, Drobczyński S. Formation of lymphoma hybrid spheroids and drug testing in real time with the use of fluorescence optical tweezers. *Cells*. 2022;11(13):2113.

IF: 7.666

Pkt. MEiN: 140.00

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: pozyskaniu funduszy na badania, stworzeniu koncepcji oraz zapewnieniu integralności całego projektu, opracowaniu metody tworzenia steroidów w szczypcach optycznych, analizie merytorycznej i interpretacji wyników, analizie statystycznej, opracowaniu graficznym wyników, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział w realizacji pracy szacuję na 90%.

Łączna punktacja pięciu prac oryginalnych stanowiących podstawę osiągnięcia wynosi 520 punktów MNiSW, a sumaryczny współczynnik Impact Factor: 26,767. We wszystkich pracach jestem pierwszym oraz korespondencyjnym autorem.

4.2 Wprowadzenie do omawianych prac.

Chłoniaki nie-Hodgkina (ang. non-Hodgkin lymphoma, NHL) są najczęstszymi nowotworami limfoproliferacyjnymi w krajach zachodnich, stanowiąc szósty nowotwór pod względem częstości występowania oraz śmiertelności u osób dorosłych [1]. NHL należą do chorób układu krwiotwórczego i ich przeważająca większość powstaje na skutek nieprawidłowej proliferacji limfocytów B (85-90%), rzadziej limfocytów T (10-15%) oraz komórek NK (<1.5%) [2,3]. Chłoniaki nie-Hodgkina stanowią niezwykle heterogenną grupę nowotworów układu chłonnego pod względem epidemiologicznym oraz klinicznym. W ostatnich latach zapadalność na NHL wzrasta, a szczyt występuje pomiędzy 20-30 oraz między 60-70 rokiem życia [4].

Nieodłączną cechą nowotworów złośliwych jest zdolność do rozsiewu komórek nowotworowych z ogniska pierwotnego. Uogólniony proces nowotworowy poprzedza szereg zmian zachodzących na poziomie pojedynczej komórki, takich jak zmiany w adhezji, ruchliwości i migracji komórek nowotworowych. Oddziaływania typu komórka-komórka stanowią jeden z podstawowych determinantów migracji komórek inwazyjnych. Bezpośrednie

kontakty z innymi komórkami mogą zwiększać aktywność ruchową komórek nowotworowych oraz wpływać na ich zdolność do efektywnego przemieszczania się [5].

W literaturze naukowej szeroko udokumentowany został wpływ mikrośrodowiska nowotworu na właściwości adhezyjne i migracyjne patologicznych komórek, jednakże w odniesieniu do chłoniaków nie-Hodgkina procesy te są bardzo słabo poznane. Tymczasem zajęcie szpiku kostnego przez komórki chłoniaka zaobserwować można aż u 25% pacjentów z chłoniakami o wysokim stopniu złośliwości (ang. high grade B-cell lymphoma, HGBCL) [6,7]. Wiążą się one przeważnie ze złym rokowaniem, częściowo ze względu na protekcyjne interakcje komórek chłoniaka z komórkami zrębu szpiku kostnego (ang. mesenchymal stromal cells, MSC) [8-10]. Komórki stromalne są istotnym elementem mikrośrodowiska szpiku kostnego, które wpływa na rozwój i przeżycie chłoniaków nie-Hodgkina. Aktualne dane sugerują, że MSC mogą zarówno promować, jak i hamować wzrost nowotworów, z przewagą działania protekcyjnego. Istnieją liczne dowody na to, że MSC wspierają wzrost chłoniaka poprzez m.in. promowanie angiogenezy [11,12] czy też indukcję szlaków sygnałowych związanych z proliferacją, takich jak PI3K, Wnt i AKT [13]. Ponadto skomplikowana biologia molekularna komórek stromalnych i ich odpowiednio złożona dynamika pozostają niezbadane. Kilka najnowszych doniesień wskazuje, że w rozwoju lekooporności kluczową rolę odgrywa bezpośredni kontakt komórek nowotworowych z komórkami zrębu szpiku kostnego [14,15], dlatego rozumienie roli MSCs w mikrośrodowisku chłoniaków uznano za jedno z największych wyzwań w hematologii

Metody stosowane dotychczas w badaniu adhezji komórkowej można zakwalifikować do dwóch kategorii. Pierwsza z nich obejmuje klasyczne techniki opierające się na wiązaniu komórek z unieruchomionymi ligandami lub z pojedynczymi warstwami komórek w warunkach statycznych [16]. Metody te wymagają dużej ilości materiału do analiz, w związku z czym ich wyniki przedstawiają jedynie uśrednione wartości oddziaływań zachodzących w grupie komórek. Metody z drugiej kategorii oparte są z kolei na bezpośrednim pomiarze sił adhezji z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych, mikropipety, szczypiec optycznych lub tzw. nanowidelców (ang. nanoforks) [17]. Wyniki uzyskane dzięki powyższym zaawansowanym technikom znacząco uzupełniły stan wiedzy na temat adhezji komórkowej. Jednakże przez wzgląd na złożoność tego procesu, związek pomiędzy siłą adhezji a zachowaniem komórki pozostaje nieodkryty.

W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie tematyką szczypiec optycznych w zakresie precyzyjnego badania właściwości adhezyjnych komórek. Szczypce optyczne to

stosunkowo nowe narzędzie badawcze. Pierwsze dostępne modele pojawiły się pod koniec lat 90-tych XX wieku [18], z kolei komercyjne modele holograficznej pęsety optycznej powstały około 2010 roku. Warto wspomnieć, że Nagroda Nobla z Fizyki w 2018 roku została przyznana amerykańskiemu fizykowi Arturowi Ashkinowi właśnie za wynalezienie szczypiec optycznych. Owo odkrycie zapoczątkowało nową erę badań biologicznych, ponieważ możliwe stało się bezdotykowe chwytanie i przemieszczanie w preparacie mikroskopijnych obiektów (od 10 nm do kilkudziesięciu μm), takich jak cząsteczki, organella komórkowe bądź całe komórki [18]. W układzie szczypiec optycznych manipulacja nano- i mikroobiettami realizowana jest przy pomocy zogniskowanej wiązki światła laserowego o długości fali z zakresu podczerwieni lub światła widzialnego [19]. W odróżnieniu od innych metod manipulacji obiektami biologicznymi, szczypce optyczne są narzędziem nieinwazyjnym, w którym siły przykładane do badanych próbek są precyzyjnie kontrolowane [20]. Dzięki temu maleje ryzyko przypadkowego uszkodzenia delikatnych struktur biologicznych. Z kolei brak elementów mechanicznych wprowadzanych do próbki nie narusza jej integralności oraz upraszcza procedurę przygotowania pomiaru. Dodatkowo, jako jedno z nielicznych urządzeń, szczypce optyczne pozwalają na pomiar dynamiki procesów biologicznych zachodzących w czasie rzeczywistym [21]. Preparat może być umieszczony na tradycyjnym szkiełku mikroskopowym lub w naczyniach do hodowli komórkowej ze szklanym dnem.

Wykorzystanie szczypiec optycznych w przedstawionym przez habilitantkę dziele polegało na analizie bezpośrednich oddziaływań prawidłowych limfocytów B oraz komórek chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B (B-cell non-Hodgkin lymphoma, B-NHL) z elementami mikrośrodowiska, a dokładniej: tworzeniu połączeń ze stromalnymi komórkami mezenchymalnymi, a następnie próbach zrywania tych połączeń. Model taki pozwolił znacznie precyzyjniej ocenić właściwości adhezyjne komórek niż szeroko stosowane metody populacyjne.

Badania z zakresu biologii komórek nowotworowych, jak i ocena wrażliwości komórek na substancje przeciwnowotworowe przeprowadzane są w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych pozyskanych ze źródeł komercyjnych lub hodowli pierwotnych komórek pobranych bezpośrednio od pacjenta. Najpopularniejszym sposobem hodowli komórkowej wciąż pozostaje hodowla dwuwymiarowa (2D) w formie pojedynczej warstwy pokrywającej naczynie hodowlane. Jednakże komórki nowotworowe rosnące w warunkach stworzonych do uzyskania jednolitych fenotypowo hodowli nie odzwierciedlają heterogennej i złożonej budowy guza rozwijającego się w organizmie [22]. Tradycyjna

hodowla komórkowa pozbawiona jest także m.in. unaczynienia, komórek zapalnych oraz macierzy zewnątrzkomórkowej pełniących kluczową rolę w proliferacji i różnicowaniu komórek. W efekcie komórki poddane działaniu leków reagują na nie inaczej niż w sytuacji, gdy znajdują się w macierzystym organizmie. Wpływa to z kolei na trudność przełożenia wyników uzyskanych *in vitro* na ich zastosowanie w warunkach *in vivo* [23-25]. Powyższe ograniczenia zintensyfikowały badania nad opracowaniem nowych metod hodowli komórek, które bardziej przypominałyby ich fizjologiczne środowisko.

W ciągu ostatniej dekady jedną z najpopularniejszych metod stała się trójwymiarowa (3D) hodowla sferoidów czyli agregatów komórek nowotworowych [26]. Wielokomórkowe sferoidy posiadają cechy guza wzrastającego we wczesnej fazie w organizmie, w tym składają się z komórek o zróżnicowanym fenotypie [27]. Liczne badania potwierdziły, że w takim modelu ekspresja genów, białek oraz fizjologia znacznie lepiej odzwierciedla warunki *in vivo* [28-31]. Co jest szczególnie istotne, odpowiedź sferoidów i guzów występujących *in vivo* na substancje przeciwnowotworowe jest zbliżona [32-34]. Ogromne znaczenie ma także fakt występowania w sferoidzie oddziaływań komórka-komórka [35]. Ponadto komórki rosnące w formie jednej warstwy mają łatwy dostęp do tlenu, w wyniku czego powstaje jednolita fenotypowo populacja. Z kolei komórki zlokalizowane w głębi sferoidu doświadczają zjawiska hipoksji, ponieważ ciśnienie parcjalne tlenu maleje w kierunku jego centralnej części [36]. Mimo dominującej przewagi hodowli trójwymiarowych, w badaniach podstawowych nad chłoniakami nie-Hodgkina stosowane są niemal wyłącznie tradycyjne monokultury. Wynika to z faktu, że w obrębie węzła chłonnego komórki pozostają w bezpośrednim kontakcie, ale nie tworzą zwartych struktur. Komórki chłoniaków, w odróżnieniu od komórek nowotworów nabłonkowych w hodowli komórkowej rosną w zawieszinie. Liczne próby uzyskania sferoidów chłoniaków o stabilnej strukturze i regularnym kształcie jeszcze do 2017 roku były bezowocne [37]. Tymczasem opracowanie nowych przedklinicznych modeli z pewnością zintensyfikowałoby rozwój badań nad wpływem mikrośrodowiska na komórki chłoniaków nie-Hodgkina oraz badaniem nowych leków ukierunkowanych molekularnie. Użycie modeli 3D może dodatkowo wpłynąć na zmniejszenie odsetka niepowodzeń w translacji wyników badań podstawowych i ograniczyć testowanie leków na zwierzętach.

4.3 Cel pracy.

Celem badań przedstawionych jako cykl powiązanych tematycznie publikacji było:

1. opracowanie modeli komórkowych umożliwiających badanie oddziaływań między komórkami chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B oraz komórkami zrębu szpiku kostnego w szczypcach optycznych w czasie rzeczywistym,
2. różnicowanie komórek chłoniaków nie-Hodgkina na podstawie ich właściwości adhezyjnych,
3. ocena wpływu wybranych warunków mikrośrodowiska oraz leków przeciwnowotworowych na adhezję komórek chłoniaków nie-Hodgkina za pomocą szczypiec optycznych.

4.4 Omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Publikacja nr. 1

Duś-Szachniewicz K, Drobczyński S, Ziółkowski P, Kołodziej P, Walaszek KM, Korzeniewska AK, Agrawal A, Kupczyk P, Woźniak M. Physiological hypoxia (physioxia) impairs the early adhesion of single lymphoma cell to marrow stromal cell and extracellular matrix. Optical tweezers study. International Journal of Molecular Sciences. 2018 Jun 26;19(7):1880.

Pierwsza praca w cyklu publikacji przedstawia metodologię badania właściwości adhezyjnych komórek chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B w czasie rzeczywistym w układzie szczypiec optycznych. Specyfika preparatu komórkowego i nowy sposób pomiaru sił adhezji wymusiły rozbudowę istniejącego układu oraz modyfikację oprogramowania sterującego pracą całego systemu, co szczegółowo opisano w publikacji. Właściwości adhezyjne oceniane były na podstawie czasu niezbędnego do utworzenia przez pojedynczą komórkę chłoniaka stabilnej kokultury z komórką zrębu szpiku kostnego (linia HS-5). Jako stabilną kokulturę określono stan, w którym przytwierdzona uprzednio komórka chłoniaka nie pozwala się odciągnąć od komórki zrębu za pomocą pułapki optycznej generowanej laserem o mocy 100 mW na wyjściu lasera. W pracy przetestowano adhezję 479 komórek chłoniaków należących do sześciu linii B-NHL. Dodatkowo zmierzono adhezję 449 komórek chłoniaków do matryzeli. Ustalono, że komórki B-NHL wykazują heterogenne właściwości adhezyjne charakterystyczne dla danej linii komórkowej.

Obecnie zdecydowana większość badań *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórkowych przeprowadzana jest w atmosferycznych warunkach tlenowych nie

odzwierciedlających fizjologicznego stężenia tlenu w żywym organizmie. Tymczasem stężenie tlenu stanowi istotny parametr regulujący proliferację komórek, wpływając istotnie na ich wzrost [38], różnicowanie oraz przeżywalność [39]. W celu zbadania wpływu tlenu na właściwości adhezyjne komórek, hodowla komórkowa oraz pomiary w szczypcach optycznych przeprowadzone zostały w warunkach fizjologicznego stężenia tlenu w węźle chłonnym czyli tzw. fizjoksji (5% O₂).

Fizjologiczny poziom tlenu określa ciśnienie parcjalne tlenu w tkance i wynosi u człowieka od 0.5% do 12% w zależności od rodzaju tkanki [40]. Stężenie tlenu w obwodowych narządach limfatycznych oraz w szpiku kostnym wynosi od 0.6 do 4.5%, czyli istotnie mniej niż standardowo przyjmowana w laboratoriach wartość 21%, określana jako normoksja [41]. Komórki linii modelowych oraz pierwotne prawidłowe limfocyty B inkubowane były w warunkach fizjoksji odpowiednio 96 oraz 24 godziny. Przy użyciu szczypiec optycznych zmierzono czas tworzenia stabilnej kokultury, zarówno z komórkami zrębu szpiku kostnego, jak i czas przylegania komórek do matryzeli, tak aby model badawczy rekonstruował mikrośrodowisko komórek. Pomiary wykonano w zaprojektowanej do tego celu komorze stanowiącej doposażenie układu szczypiec optycznych (zgłoszenie patentowe współtworzone przez habilitantkę nr. P.424002 pn. Kompaktowa komora pomiarowa kompatybilna z układem szczypiec optycznych w warunkach kontrolowanego stężenia tlenu oraz międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2018/050069 pn. Compact measuring chamber compatible with optical tweezers system under controlled oxygen level conditions).

Ustalono, że komórki B-NHL w warunkach fizjoksji tworzą stabilne kokultury z komórkami zrębu szpiku kostnego od 1.7 do 5.1 razy wolniej niż w standardowych warunkach tlenowych. W odniesieniu do adhezji do matryzeli, jedynie w przypadku jednej linii nie zaobserwowano zmian w adhezyjności komórek, a pozostałe linie tworzyły połączenia z podłożem od 1.6 do 3.2 razy wolniej w fizjoksji. Podobnie sytuacja wyglądała w przypadku pierwotnych limfocytów B. Średni czas tworzenia stabilnej kokultury w standardowych warunkach hodowlanych wynosił 20.3 ± 10.3 s, podczas gdy komórki pierwotne inkubowane w fizjoksji tworzyły kokulturę średnio w 32.8 ± 22.8 s. Co istotne, zmiany w adhezji obserwowane w warunkach fizjoksji były odwracalne po inkubacji komórek w standardowych warunkach tlenowych. Dodatkowo wykazano większą stabilność właściwości adhezyjnych komórek w warunkach normoksji w czterech z pięciu analizowanych przypadków. Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o przydatności szczypiec optycznych do precyzyjnej oceny

właściwości adhezyjnych komórek chłoniaków oraz potwierdzają hipotezę dotyczącą wpływu stężenia tlenu na adhezję komórek modelowych oraz pierwotnych.

Publikacja nr. 2

Duś-Szachniewicz K, Drobczyński S, Woźniak M, Zduniak K, Ostasiewicz K, Ziółkowski P, Korzeniewska AK, Agrawal AK, Kołodziej P, Walaszek K, Bystydzieński Z, Rymkiewicz G. *Differentiation of single lymphoma primary cells and normal B-cells based on their adhesion to mesenchymal stromal cells in optical tweezers. Scientific Reports. 2019 Jul 8;9(1):9885.*

Głównym założeniem drugiej pracy było rozpoznanie czy istnieje możliwość rozróżniania w szczypcach optycznych komórek pierwotnych chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B na podstawie ich właściwości adhezyjnych, czyli tego, jak szybko przylegają do komórek zrębu szpiku kostnego i tworzą z nimi stabilne połączenia. Na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz doświadczenia nabytego w trakcie pozyskiwania pierwszych próbek opracowano szczegółowe procedury dotyczące pobrania, mrożenia oraz transportu materiału klinicznego, tak by zachować sterylność próbek oraz dobrą przeżywalność komórek. Procedury te zostały ujednolicone i wdrożone w każdym z ośrodków, w których uzyskiwano materiał kliniczny na drodze biopsji cienkoigłowej (Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie– Państwowy Instytut Badawczy) oraz śródoperacyjnie (Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr. 1 we Wrocławiu, Specjalistyczny Szpital im. dr Alfreda Sokołowskiego w Wałbrzychu).

Komórki pierwotne izolowane były na podstawie protokołu Manual MACS® Cell Separation, Miltenyi Biotec. Metoda ta jest jedną z najpopularniejszych manualnych technik izolacji komórek nowotworowych i stosowana jest na szeroką skalę w badaniach naukowych jak i praktyce klinicznej. Komórki pierwotne izolowano magnetycznymi kulkami powleczonymi przeciwciałami anti-CD20, anti-CD3, anti-CD5 i anti-CD10, w zależności od dostarczonego rozpoznania. Analiza cytometryczna wybranych przypadków po izolacji, uzyskane wyniki oceny przeżywalności limfocytów B po separacji oraz ich obserwacja mikroskopowa potwierdziły skuteczność wybranej metody izolacji komórek pierwotnych. Materiał kliniczny stanowiły komórki nowotworowe uzyskane od pacjentów z rozpoznaniem chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B (ang. Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL) oraz komórki kontrolne uzyskane od pacjentów ze zdiagnozowanym procesem zapalnym węzłów chłonnych, bez zaburzeń limfoproliferacyjnych. Do badań włączono także komórki izolowane od pacjentów z chłoniakiem grudkowym (ang. Follicular Lymphoma, FL), chłoniakiem z komórek

płaszczka (ang. Mantle Cell Lymphoma, MCL), chłoniakiem typu MALT (ang. Mucosa Associated Lymphoid Tissue Lymphoma, MALT), chłoniakiem Burkitta (ang. Burkitt Lymphoma, BL) oraz chłoniakiem o wysokim stopniu złośliwości z komórek B (ang. High Grade B-Cell Lymphoma, HGBCL). Nowotwory te, podobnie jak chłoniak DLBCL, charakteryzują się klonalnym rozrostem limfocytów B.

Do badania włączono komórki nowotworowe wyizolowane od 37 pacjentów z B-NHL oraz limfocyty B uzyskane z 15 kontrolnych węzłów chłonnych. Wykorzystując protokół opisany w Publikacji nr. 1 mierzono czas niezbędny do utworzenia połączeń adhezyjnych między komórkami pierwotnymi z komórkami zrębu szpiku kostnego w szczypcach optycznych.

Ustalono czas niezbędny do utworzenia połączenia z komórką zrębu dla 2187 komórek patologicznych (208.8 ± 102.3 s) oraz 1087 komórek kontrolnych (26.7 ± 16.6 s). Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że komórki chłoniaka tworzą stabilne połączenie z komórkami zrębu szpiku kostnego od 2.2 do 20.5 razy wolniej niż komórki prawidłowe. Celem oszacowania wartości odcinającej (cut-off) dla testu rozróżniającego komórki patologiczne od prawidłowych przeprowadzono analizę krzywych ROC. Dla wartości odcinającej $t > 60$ s czułość testu wyniosła 6.4% a swoistość 98.5%. Wykazano, że czas utworzenia stabilnego połączenia między komórkami patologicznymi i prawidłowymi jest istotnie różny bez względu na płeć pacjenta i jego wiek. Przy zaobserwowanych w badaniu wartościach średnich i odchyleniach standardowych czasu stabilnego połączenia komórek, minimalna liczba przetestowanych komórek powinna wynosić 15. Dla tej liczby komórek przy poziomie istotności $p = 0.001$ moc testu wyniosła $\beta = 0.92$. Tym samym wykazano, że opracowana metoda umożliwia odróżnienie komórek prawidłowych od patologicznych na podstawie czasu tworzenia kokultury z komórką zrębu.

Następnie porównano właściwości adhezyjne komórek nowotworowych w grupie chłoniaków nie-Hodgkina. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya. Zaobserwowano, że komórki chłoniaka DLBCL uzyskane z guzów o lokalizacji poza węzłowej tworzą istotnie szybciej kokulturę z komórkami zrębu niż komórki wywodzące się z lokalizacji węzłowej (155.1 ± 53.9 s vs. 231.2 ± 90.0 s). Zależność ta nie została potwierdzona dla całej populacji analizowanych przypadków. Dodatkowo komórki wysoce agresywnych chłoniaków HGBL miały znacząco obniżone właściwości adhezyjne w porównaniu z komórkami chłoniaka DLBCL oraz MCL.

Na podstawie uzyskanych wyników habilitantka opracowała zgłoszenie patentowe nr. P.423266 pn. Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego oraz międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr CT/PL/2018/000103 pn. Method for diagnosing neoplasms of lymphoid tissue).

Publikacja nr. 3

Duś-Szachniewicz K, Rymkiewicz G, Agrawal AK, Kołodziej P, Wiśniewski JR. Large-scale proteomic analysis of follicular lymphoma reveals extensive remodeling of cell adhesion pathway and identifies hub proteins related to the lymphomagenesis. Cancers. 2021 Feb 5;13(4):630.

Celem kolejnej publikacji wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej była identyfikacja panelu białek odpowiedzialnych za zaburzenia adhezji w komórkach chłoniaka technikami proteomicznymi. Do badania włączono 29 próbek klinicznych uzyskanych na drodze biopsji cienkoigłowej (Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie– Państwowy Instytut Badawczy) bądź śródoperacyjnie (Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu), w tym 15 przypadków chłoniaka grudkowego oraz 14 kontroli uzyskanych ze zmian o charakterze odczynowym. Patologiczne oraz prawidłowe limfocyty B izolowane były protokołem MACS (Miltenyi Biotec) za pomocą kulek magnetycznych powleczonych przeciwciałem anty-CD19 (CD19 Positive Isolation Kit). Skuteczność izolacji dla wybranych próbek została potwierdzona w cytometrze przepływowym.

Peptydy do analizy spektrometrycznej uzyskano według współtworzonego przez habilitantkę protokołu Multienzyme Digestion- Filter-Aided Sample Preparation (MED-FASP) [42]. Analizę proteomiczną wszystkich próbek wykonano w wiodącym w dziedzinie badań nad białkami Instytucie Biochemii Maxa Plancka w Martinsried w tandemowym spektrometrze mas Orbitrap Q Exactive (Thermo Fisher). Analiza widma mas wykonana była za pomocą algorytmów programu MaxQuant (Max Planck Institute of Biochemistry). Surowe wartości intensywności dla około 7700 białek normalizowano za pomocą programu MaxQuant. Kompletnie listy zidentyfikowanych białek dołączono jako suplement do publikacji oraz umieszczono w bazie danych Proteomics Identification Database (PRIDE) pod numerem: PXD011683.

Opracowanie statystyczne wyników wykonała habilitantka w programie Perseus (Max Planck Institute of Biochemistry) oraz wykorzystując platformy typu open source: Search Tool for the

Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING), Cytoscape oraz Metascape. Z analizy wyłączono białka, których nie zidentyfikowano w co najmniej 75% wszystkich próbek, po czym dane poddano transformacji logarytmicznej (\log_2). W rezultacie dalszą analizą objęto 6724 białka. Dane analizowano pod kątem różnic w całych proteomach między próbkami chłoniaka grudkowego a próbkami kontrolnymi oraz zmian w profilu adhezyjnym komórek nowotworowych.

Zakłada się, że białka o zmienionej ekspresji mogą być wykładnikami procesu transformacji zdrowej komórki w komórkę nowotworową. W pracy zidentyfikowano 1186 białek różniących się istotnie ekspresją, w tym 579 białek o co najmniej dwukrotnie podwyższonym stężeniu w chłoniaku grudkowym i 607 próbek o co najmniej dwukrotnie obniżonym stężeniu. Zidentyfikowano sześć białek o co najmniej 20-krotnie podwyższonej ekspresji w chłoniaku grudkowym, w tym białka NUCKS1, SLC14A1, GPALPP1, ADPRH, CD72 oraz PRDM15 oraz trzy białka o co najmniej 20-krotnie obniżonej ekspresji (ITGAV, NT5E oraz PLTP). W celu uwidocznienia różnic w ekspresji białek pomiędzy próbkami dane poddano hierarchicznemu klasterowaniu oraz opracowano wykresy typu volcano plot w programie Perseus. Następnie za pomocą programu STRING ze 1186 białek różniących się istotnie ekspresją utworzono złożoną sieć oddziaływań typu białko-białko, po czym wykorzystując trzy algorytm programu cytoHubba (Cytoscape) wytypowano 20 białek pełniących kluczową rolę w powyższej sieci. Ustalono, że sześć z nich: FN1, CTNNA1, CDH1, ITGB1, ICAM1 oraz ITGAV to białka, których zmiany w ekspresji mogły doprowadzić do słabszej adhezji komórek chłoniaka w porównaniu z komórkami kontrolnymi, którą uprzednio zaobserwowano w publikacjach nr. 1 i nr. 2. Podobnie analiza szlaków molekularnych w oparciu o bazę danych Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) wykazała, że najistotniej zmienionymi szlakami w chłoniaku grudkowym są te związane z procesem adhezji, w tym szlak oddziaływań komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (ang. ECM-receptor interactions, nr. hsa04512), szlak tworzenia fokalnych ognisk adhezji (ang. focal adhesion, nr. hsa04510) czy połączeń adherentnych (ang. adherens junction, nr. hsa04520) oraz szlak białek adhezyjnych (ang. cell adhesion molecules, nr. hsa04514).

Dodatkowo w programie Cytoscape opracowano złożoną sieć oddziaływań wszystkich 51 białek adhezyjnych zidentyfikowanych w próbkach z uwzględnieniem białek o zmienionej ekspresji w chłoniaku grudkowym. Białko ICAM1 (CD54), będące funkcjonalnie połączone z 27 innymi białkami adhezyjnymi, zostało wskazane jako kluczowe w procesach adhezji. W celach walidacyjnych wykonano analizę ekspresji wybranych białek adhezyjnych- CD9,

ICAM1 oraz CD79B metodą cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi uzyskanymi na drodze analizy proteomicznej.

Istotnie, opisano także zmiany w ekspresji białek należących do kanonicznych szlaków sygnałowych prowadzące zwykle do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych (m.in. szlaki sygnałowe kinaz mTOR i MAPK, szlak sygnałowy chemokin), jak i zmiany w kluczowym dla chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B szlaku odpowiadającym za transdukcję sygnałów z receptorów powierzchniowych (ang. B cell receptor signaling pathway, BCR). Powyższe szlaki były uprzednio szeroko opisywane w odniesieniu do chłoniaka grudkowego, jednakże przytoczona praca jako pierwsza ukazuje w sposób globalny jednocześnie zmiany w licznych szlakach komórkowych oraz zależności między nimi. Niemniej, waga uzyskanych wyników w opinii habilitantki polega głównie na wskazaniu dowodów, że zaburzenia adhezji komórkowej towarzyszą transformacji prawidłowych limfocytów B w komórki nowotworowe.

Publikacja nr. 4

Duś-Szachniewicz K, Gdesz-Birula K, Rymkiewicz G. Development and characterization of 3D hybrid spheroids for the investigation of the crosstalk between B-cell non-Hodgkin lymphomas and mesenchymal stromal cells. OncoTargets and Therapy. 2022 Jun 17;15:683-697.

W odróżnieniu od komórek nowotworowych wywodzących się z nowotworów litych, komórki chłoniaka nie tworzą sferoidów za pomocą standardowych technik hodowli trójwymiarowej (3D). Zaobserwowana w pracach 1 i 2 zdolność do tworzenia połączeń adhezyjnych między komórkami chłoniaków nie-Hodgkina a komórkami zrębu szpiku kostnego została wykorzystana do utworzenia stabilnych trójwymiarowych sferoidów mieszanych. Na potrzeby pracy opracowano protokół wydajnego pozyskiwania sferoidów. Zweryfikowano szereg metod hodowli komórek 3D, w tym metodę hodowli w tzw. kropli wiszącej, na płytkach o niskiej adhezyności typu ULAP (ang. Ultra Low Attachment Plate) oraz w żelach agarozowych, wykorzystując różne proporcje komórek chłoniaków oraz komórek zrębu szpiku kostnego. Ostatnia metoda umożliwiła formowanie się komórek w sferoidy o ściśle kontrolowanym rozmiarze oraz kształcie. Uzyskane sferoidy zostały utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie, a następnie wykonano z nich preparaty mikroskopowe za pomocą rutynowych, zautomatyzowanych technik histopatologicznych. Barwienie na obecność antygenu CD20 wykazało warstwową morfologię sferoidu mieszanego, gdzie komórki zrębu organizują się w sferyczny rdzeń, do którego przylegają warstwy komórek chłoniaka. Uzyskany

model znakomicie odzwierciedla oddziaływania komórek stromalnych na komórki chłoniaka w organizmie.

W publikacji przedstawione zostały cechy sferoidów chłoniaka, w tym dynamika wzrostu, która była odmienna dla chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (linia Ri-1) oraz chłoniaka Burkitta (linia Raji). W przypadku obu linii zaobserwowano, że agregacja komórek chłoniaka w trójwymiarowe agregaty była znacząco szybsza w przypadku hodowli mieszanej z komórkami zrębu szpiku kostnego. Podobnie przeżywalność sferoidów mieszanych po 14 dniach inkubacji była istotnie wyższa w przypadku ko-kultury z komórkami zrębu, co sugeruje ich protekcyjny wpływ na komórki chłoniaka.

Następnie wykazano wpływ komórek zrębu szpiku kostnego na odpowiedź sferoidów chłoniaka na leczenie doksorubicyną (DOX) oraz ibrutynibem (IBR). W pierwszym etapie ustalono wartości dawki IC50 (dawka substancji powodująca 50% maksymalnej inhibicji, ang. inhibitory concentration) w trójwymiarowych monokulturach i hodowlach mieszanych, następnie dobrano eksperymentalne stężenia DOX i IBR w zakresie odpowiadającym stężeniom klinicznym. W przypadku DOX nie zaobserwowano różnic między wpływem leku na sferoidy utworzone z samych komórek chłoniaka a sferoidy mieszane. Z kolei sferoidy mieszane wykazały istotnie mniejszą wrażliwość na IBR. Wynik ten zdaje się potwierdzać ochronną rolę wywieraną przez komórki stromalne na komórki chłoniaka, prawdopodobnie jako efekt bezpośrednich oddziaływań typu komórka-komórka. Istotnie, zaobserwowane różnice w odpowiedzi na dwa badane leki potwierdzają przydatność opracowanego modelu do oceny efektywności terapii przeciwnowotworowych *in vitro*.

Publikacja nr.5

Duś-Szachniewicz K, Gdesz-Birula K, Nowosielska E, Ziółkowski P, Drobczyński S. *Formation of lymphoma hybrid spheroids and drug testing in real time with the use of fluorescence optical tweezers. Cells. 2022;11(13):2113.*

W ostatniej pracy z cyklu habilitacyjnego zdolność do tworzenia połączeń adhezyjnych między komórkami chłoniaków nie-Hodgkina a komórkami zrębu szpiku kostnego została wykorzystana do utworzenia trójwymiarowego sferoidu mieszanego za pomocą szczypiec optycznych. Model stworzony *de novo* odzwierciedla swobodne formowanie się mieszanych sferoidów chłoniaka i komórek zrębu szpiku kostnego w żelu hydroagarożowym, gdzie rdzeń sferoidu stanowi masa komórek zrębu, do którego warstwowo przywierają komórki chłoniaka,

zgodnie z wynikami przedstawionymi w publikacji nr. 4. Przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń wymusiło uprzednią modyfikację układu szczypiec optycznych. Wykonanie trójwymiarowej struktury sferoidu wymagało kontroli położenia pułapki optycznej w objętości próbki mikroskopowej. Pozycjonowanie pułapki optycznej w płaszczyźnie preparatu uzyskano za pomocą galwano-skanerów. Zmiana pozycji wzdłuż propagacji wiązki laserowej możliwa była za pomocą pionowego ruchu stolika mikroskopowego. Stałe położenie pułapki optycznej względem obiektywu mikroskopowego koreluje z ostrym obrazowaniem danej płaszczyzny próbki mikroskopowej. Operator zmieniając płaszczyznę obrazowania w mikroskopie, przemieszczał równocześnie położenie pułapki optycznej w głąb preparatu. Dzięki temu uzyskano pełną kontrolę nad pozycjonowaniem chwytanych komórek i budową trójwymiarowej struktury sferoidu.

W pierwszym etapie prac uzyskano sferoidy z komórek zrębu szpiku kostnego (linia HS-5) z wykorzystaniem żeli hydroagarożowych. W celu uzyskania sferoidu mieszanego, komórki chłoniaka były kolejno pułapkowane i przemieszczane za pomocą wiązki lasera do powierzchni sferoidu szpiku kostnego, z którym pozostały w kontakcie do utworzenia stabilnego połączenia. Kolejne komórki chłoniaka były przyłączane do sferoidu aż do pokrycia jego powierzchni dwoma warstwami komórek. Manipulacje przeprowadzono na liniach Ri-1 (DLBCL) oraz Raji (BL) reprezentujących chłoniaki o wysokim stopniu złośliwości. Sposób przeprowadzenia eksperymentu został przedstawiony na wizualizacjach dołączonych jako suplement do publikacji nr.5. Sposób pomiaru czasu potrzebnego na przyłączenie pojedynczej komórki chłoniaka został opisany w publikacji nr.1. Komórki chłoniaka wykazały wysokie powinowactwo do sferoidu stromalnego tworząc połączenia adhezyjne przeciętnie między 10 a 20 sekundą od zainicjowania kontaktu dla obu linii komórkowych. Żywotność sferoidu po zakończonej manipulacji potwierdzona została metodą barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD na podstawie ciągłości błon cytoplazmatycznych. Co istotne, sferoidy utworzone w szczypcach optycznych zachowały trójwymiarową strukturę oraz żywotność przez kolejne 24 godziny.

W omawianej pracy zbadano również wpływ leków przeciwnowotworowych: doksorubicyny (DOX), ibrutynibu (IBR) oraz pleryksaforu (AMD3100) na adhezję komórek chłoniaka do sferoidu szpiku kostnego. W tym celu komórki Ri-1 i Raji inkubowano przez 48 godzin z AMD3100, DOX, IBR lub z kombinacją dwóch leków AMD3100/DOX oraz AMD3100/IBR. Jak oceniono za pomocą szczypiec optycznych, traktowanie komórek pojedynczymi lekami nie wpłynęło na adhezję komórek chłoniaków. Z kolei obie linie

komórkowe traktowane lekami złożonymi miały istotnie zmniejszoną adhezję do sferoidu utworzonego z komórek zrębu szpiku kostnego, przy czym wpływ leczenia skojarzonego na adhezję był najlepszy w przypadku inkubacji komórek linii Raji z AMD3100/IBR. Synergistyczny wpływ wybranych leków na właściwości adhezyjne komórek nowotworowych został szeroko udokumentowany w literaturze [43-45], jednakże dopiero zastosowanie technologii szczypiec optycznych umożliwiło ocenę tego efektu z niespotykaną dotychczas dokładnością.

4.5 Wnioski z cyklu prac.

1. Szczypce optyczne umożliwiają zarówno precyzyjne badanie właściwości adhezyjnych chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B w czasie rzeczywistym, jak i zmian w adhezji spowodowanych warunkami mikrośrodowiska oraz wpływem terapii przeciwnowotworowych.
2. Linie komórkowe chłoniaków Hodgkina z komórki B wykazują heterogenne właściwości adhezyjne charakterystyczne dla danej linii komórkowej.
3. Poziom stężenia tlenu wpływa na adhezję komórek chłoniaków nie-Hodgkina.
4. Możliwe jest odróżnienie prawidłowych limfocytów B od pierwotnych komórek chłoniaków na podstawie pomiarów adhezji w szczypcach optycznych.
5. Proteom komórek chłoniaka grudkowego istotnie różni się pod względem ekspresji białek adhezyjnych od proteomu prawidłowych limfocytów B.
5. Komórki stromalne szpiku kostnego w kokulturze 3D z komórami chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B zwiększają ich właściwości adhezyjne umożliwiając agregację w sferoidy w żelach agarozowych.
6. Wykazano przydatność szczypiec optycznych do utworzenia *de novo* stabilnego sferoidu komórkowego. Takie podejście stwarza możliwość śledzenia początkowych etapów organizacji wielokomórkowych struktur 3D oraz formowania się połączeń adhezyjnych między komórkami.
7. Model ko-kultury chłoniaka utworzony *de novo* za pomocą szczypiec optycznych pozwala badać wpływ substancji przeciwnowotworowych na adhezję komórek chłoniaka nie-Hodgkina z komórek B z niespotykaną dotychczas dokładnością.

4.6 Bibliografia.

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–2390.
2. Swerdlow SH, Jaffe ES, Brousset P, Chan JK, de Leval L, Gaulard P, Harris NL, Pileri S, Weiss LM; International Lymphoma Study Group. Cytotoxic T-cell and NK-cell lymphomas: current questions and controversies. *Am J Surg Pathol*. 2014 Oct;38(10):e60–71.
3. William BM, Armitage JO. International analysis of the frequency and outcomes of NK/T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2013 Mar;26(1):23–32.
4. Sapkota S, Shaikh H. Non-Hodgkin Lymphoma. 2022 May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32644754.
5. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, Kolahian S, Javaheri T, Zare P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020 Apr 7;18(1):59.
6. Conlan MG, Bast M, Armitage JO, Weisenburger DD. Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 1990 Jul;8(7):1163–1172.
7. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2021 Mar 4;384(9):842–858.
8. Mourcin F, Pangault C, Amin-Ali R, Amé-Thomas P, Tarte K. Stromal cell contribution to human follicular lymphoma pathogenesis. *Front Immunol*. 2012 Sep 5;3:280.
9. Blonska M, Agarwal NK, Vega F. Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Semin Cancer Biol*. 2015 Oct;34:3–13.
10. Lwin T, Hazlehurst LA, Li Z, Dessureault S, Sotomayor E, Moscinski LC, Dalton WS, Tao J. Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF-kappaB (RelB/p52) in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia*. 2007 Jul;21(7):1521–1531.
11. Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard JP. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2009 Mar;20(3):413–424.
12. Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y. Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Mol Med*. 2011;17(7-8):579–587.
13. Grainger S, Traver D, Willert K. Wnt Signaling in Hematological Malignancies. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018 Jan;153:321–341.
14. Kumar A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Adhesion to stromal cells mediates imatinib resistance in chronic myeloid leukemia through ERK and BMP signaling pathways. *Sci Rep*. 2017 Aug 25;7(1):9535.
15. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KJ. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jun;15(6):366–381.

16. Weitz-Schmidt G, Chreng S. Cell adhesion assays. *Methods Mol Biol.* 2012;757:15–30.
17. Park S, Kim J, Yoon SH. A Review on Quantitative Measurement of Cell Adhesion Strength. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016 May;16(5):4256–4273.
18. McGloin D. Optical tweezers: 20 years on. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2006 Dec 15;364(1849):3521–3537.
19. Kuo SC, Sheetz MP. Optical tweezers in cell biology. *Trends Cell Biol.* 1992 Apr;2(4):116–118.
20. Hörner F, Meissner R, Polali S, Pfeiffer J, Betz T, Denz C, Raz E. Holographic optical tweezers-based in vivo manipulations in zebrafish embryos. *J Biophotonics.* 2017 Nov;10(11):1492–1501.
21. Mohanty S, Mohanty K, Gupta P. Dynamics of Interaction of RBC with optical tweezers. *Opt Express.* 2005 Jun 13;13(12):4745–4751.
22. Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T. 3D versus 2D cell culture implications for electron microscopy. *Methods Cell Biol.* 2010;96:649–670.
23. Zips D, Thames HD, Baumann M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. *In Vivo.* 2005 Jan-Feb;19(1):1–7.
24. Menshykau D. Emerging technologies for prediction of drug candidate efficacy in the preclinical pipeline. *Drug Discov Today.* 2017 Nov;22(11):1598–1603.
25. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2013 Mar;18(5-6):240–249.
26. Benien P, Swami A. 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncol.* 2014 May;10(7):1311–1327.
27. Gheytanchi E, Naseri M, Karimi-Busheri F, Atyabi F, Mirsharif ES, Bozorgmehr M, Ghods R, Madjd Z. Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2021 Apr 13;21(1):204.
28. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 2020 Mar 6;7:33.
29. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget.* 2016 Jul 19;7(29):45745–45756.
30. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018 Jun;14(4):910–919.
31. Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer.* 2021 Mar;7(3):249–264.
32. Nunes AS, Barros AS, Costa EC, Moreira AF, Correia IJ. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng.* 2019 Jan;116(1):206–226.
33. Jeppesen M, Hagel G, Glenthøj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H, Thastrup O, Jørgensen LN, Thastrup J. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS One.* 2017 Sep 6;12(9):e0183074.

34. Di Liello R, Ciaramella V, Barra G, Venditti M, Della Corte CM, Papaccio F, Sparano F, Viscardi G, Iacovino ML, Minucci S, Fasano M, Ciardiello F, Morgillo F. Ex vivo lung cancer spheroids resemble treatment response of a patient with NSCLC to chemotherapy and immunotherapy: case report and translational study. *ESMO Open*. 2019 Aug 19;4(4):e000536.
35. Djordjevic B, Lange CS. Cell-cell interactions in spheroids maintained in suspension. *Acta Oncol*. 2006;45(4):412–420.
36. Grimes DR, Currell FJ. Oxygen diffusion in ellipsoidal tumour spheroids. *J R Soc Interface*. 2018 Aug;15(145):20180256.
37. Mannino RG, Santiago-Miranda AN, Pradhan P, Qiu Y, Mejias JC, Neelapu SS, Roy K, Lam WA. 3D microvascular model recapitulates the diffuse large B-cell lymphoma tumor microenvironment in vitro. *Lab Chip*. 2017 Jan 31;17(3):407–414.
38. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ*. 2012 May ;19(5):743–755.
39. Chen C, Tang Q, Zhang Y, Yu M, Jing W, Tian W. Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Res Ther*. 2018 May 24;9(1):148.
40. Matolay O, Méhes G. Sustain, Adapt, and Overcome-Hypoxia Associated Changes in the Progression of Lymphatic Neoplasia. *Front Oncol*. 2019 Nov 21;9:1277.
41. Mattei G, Giusti S, Ahluwalia A. Design Criteria for Generating Physiologically Relevant In Vitro Models in Bioreactors. *Processes* 2014, 2:548–569.
42. Wiśniewski JR, Duś K, Mann M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. *Proteomics Clin Appl*. 2013 Apr;7(3-4):225–233.
43. Roboz GJ, Ritchie EK, Dault Y, Lam L, Marshall DC, Cruz NM, Hsu HC, Hassane DC, Christos PJ, Ippoliti C, Scandura JM, Guzman ML. Phase I trial of plerixafor combined with decitabine in newly diagnosed older patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018 Aug;103(8):1308–1316.
44. Herman SE, Mustafa RZ, Jones J, Wong DH, Farooqui M, Wiestner A. Treatment with Ibrutinib Inhibits BTK- and VLA-4-Dependent Adhesion of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vivo. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 15;21(20):4642–4651.
45. Canals D, Salamone S, Santacreu BJ, Aguilar D, Hernandez-Corbacho MJ, Ostermeyer-Fay AG, Greene M, Nemeth E, Haley JD, Obeid LM, Hannun YA. The doxorubicin-induced cell motility network is under the control of the ceramide-activated protein phosphatase 1 alpha. *FASEB J*. 2021 Mar; 35(3):e21396.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1 Instytut Biochemii Maxa Plancka. Martinsried, Niemcy. W okresie od I.V.2011 r do 28.II.2012 odbyłam staż naukowy w Instytucie Biochemii Maxa Plancka w Martinsried pod kierownictwem prof. Jacka Wiśniewskiego oraz Prof. Matthiasa Manna, kierownika Departamentu Proteomiki. Współpraca z Prof. Jackiem Wiśniewskim zaowocowała opublikowaniem pięciu prac z zakresu proteomiki klinicznej oraz identyfikacji i walidacji biomarkerów raka jelita grubego (lata 2012-2016). W styczniu 2018r. odbyłam kolejną tygodniową wizytę studyjną w Departamencie Proteomiki, następstwem której było opublikowanie dwóch prac obejmujących tematykę identyfikację proteomu chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B (2021r).

5.2 Instytut Optyki, Politechnika Wrocławska. Od IX.2012r. współpracuję z dr hab. Sławomirem Drobczyńskim z Instytutu Optyki Politechniki Wrocławskiej w zakresie badania właściwości biomechanicznych komórek nowotworowych z wykorzystaniem szczypiec optycznych. Układ szczypiec optycznych został zaprojektowany i skonstruowany na Politechnice Wrocławskiej, z kolei w wyniku wspólnie realizowanych projektów badawczych wypracowane zostały rozwiązania dostosowujące go do potrzeb badań oddziaływań między komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem. Efektem wykonanych prac było uzyskanie patentu nr. 237087 pt. Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego (Metoda różnicowania prawidłowych limfocytów B i komórek chłoniaków nie-Hodgkina komórki B w szczypcach optycznych) oraz przygotowanie trzech zgłoszeń patentowych. W ramach współpracy z Instytutem Optyki powstało sześć oryginalnych publikacji pełnotekstowych oraz jedna monografia.

5.3 Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie- Państwowy Instytut Badawczy- współpraca od 2017r. z dr hab. Grzegorzem Rymkiewiczem w zakresie badania adhezji chłoniaków nie-Hodgkina, tworzenia modeli 3D chłoniaków z komórek pierwotnych oraz cystometrii przepływowej chłoniaków. W ramach współpracy powstały cztery oryginalne publikacje naukowe.

5.4 Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu- w zakresie oceny wpływu hipertermii na komórki nowotworowe (prof. dr hab. Artur Bednarkiewicz). Efektem współpracy była publikacja: Drobczyński S, Prorok K, Tamarov K, Duś-Szachniewicz K, Vesa-Pekka L, Bednarkiewicz A. Toward Controlled Photothermal Treatment of Single Cell: Optically Induced Heating and Remote Temperature Monitoring In Vitro through Double Wavelength Optical Tweezers. ACS Photonics 2017, 4, 8, 1993–2002.

5.5 Zakład Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski- w zakresie analizy danych proteomicznych (Prof. dr hab. Dariusz Rakus). W ramach współpracy powstała publikacja: Wiśniewski JR, Duś-Szachniewicz K, Ostasiewicz P, Ziółkowski P, Rakus D, Mann M. Absolute Proteome Analysis of Colorectal Mucosa, Adenoma, and Cancer Reveals Drastic Changes in Fatty Acid Metabolism and Plasma Membrane Transporters. J Proteome Res. 2015 Sep 4;14(9):4005-4018. Dodatkowo w ramach grantu nr. UMO-2020/37/B/NZ4/00808 Narodowego Centrum Nauki pod kierownictwem Prof. Dariusza Rakusa wykonałam analizę proteomiczną do publikacji z zakresu neurobiologii: Krzystyniak A, Pytyś A, Gostomska-Pampuch K, Pudęko- Malik N, Wiśniewski J.Ł, Młynarz P, Miazek A, Wójtowicz T, Włodarczyk J, Duś-Szachniewicz K, Gizak A, Wiśniewski J.R, Rakus D, Drulis-Fajdasz D. Glycogen phosphorylase inhibition improves cognitive function of aged mice. Praca znajduje się aktualnie w recenzji.

5.6 Klinika Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu- w zakresie pozyskiwania materiału klinicznego († prof. dr hab. Anil Kumar Agrawal).

5.7 Katedra Biochemii Lekarskiej, I Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa oraz Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu - w zakresie identyfikacji i walidacji biomarkerów nowotworowych.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Dydaktyka.

od 1.X.2022-obecnie- prowadzenie wykładów z patomorfologii dla studentów kierunku lekarskiego english division.

od 1.X.2022- obecnie- objęcie funkcji adiunkta dydaktycznego w Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej,

2017-obecnie- objęcie etatu adiunkta, prowadzenie ćwiczeń nieklinicznych z patomorfologii dla studentów kierunku lekarskiego w języku polskim i angielskim (english division),

2016-2017- objęcie etatu asystenta, prowadzenie ćwiczeń nieklinicznych z patomorfologii dla studentów kierunku lekarskiego w języku polskim i angielskim (english division),

2013-2015- prowadzenie dydaktyki w ramach studiów doktoranckich, 80h/rok (ćwiczenia niekliniczne dla studentów kierunku lekarskiego z biochemii, mikrobiologii oraz patomorfologii).

6.2 Promocja nauki.

VII.2017- opiekun miesięcznych praktyk letnich dla obcokrajowców w ramach programu Erasmus+,

2017-2018- organizacja lekcji przedsiębiorczości w Katedrze Patomorfologii dla uczniów klas licealnych z LO w Kluczborku (21.III.2017 oraz 21.III.2018),

9. III.2018- organizacja Dni Otwartych w Katedrze Patomorfologii dla kandydatów na studia medyczne,

6.IV.2022- organizacja zajęć praktycznych dla maturzystów z VII Liceum Ogólnokształcącego we Wrocławiu objętych patronatem Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

6.3 Opieka naukowa.

od X.2020- obecnie- promotor pomocniczy przewodu doktorskiego mgr. Katarzyny Gdesz-Biruli pt. Opracowanie modeli 3D nowotworów hematologicznych do analiz w szczypcach optycznych. Praca wykonywana w ramach umowy stypendialnej w granie pt. Opracowanie multifunkcjonalnych szczypiec optycznych i mikrorobotów do badania wpływu zlokalizowanej hipertermii na komórki i sferoidy nowotworowe uzyskane z hodowli pierwotnych (UMO-2017/27/B/ST7/01255) pod kierownictwem habilitantki.

I.2016-XII.2017- opiekun merytoryczny pracy doktorskiej mgr inż. Kingi Walaszek. Praca wykonywana w ramach umowy stypendialnej w granie pt. Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków (LIDER/016/275/L-5/13/NCBR/2014) pod kierownictwem habilitantki.

VI.2015-VI.2016- opiekun merytoryczny pracy magisterskiej mgr. inż. Magdaleny Hermaszewskiej, pt. Uzyskanie ko-kultury komórek pierwotnych chłoniaka rozlanego z dużych komórek B i komórek stromalnych zrębu szpiku kostnego na potrzeby badania adhezji w szczypcach optycznych, opiekun merytoryczny. Praca wykonywana w ramach umowy stypendialnej w granie pt. Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w

celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków (LIDER/016/275/L-5/13/NCBR/2014) pod kierownictwem habilitantki.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1 Staże naukowe.

Lp.	Jednostka naukowa	Czas pobytu	Cel stażu
1.	Instytut Biochemii Maxa Plancka, Martinsried, Niemcy	8-12.I.2018	Analiza proteomiczna próbek klinicznych chłoniaków nie-Hodgkina z komórki B.
2.	Laboratorium Terapii Genowej Nowotworów, Narodowe Centrum Onkologii, Singapur	10-12.I.2017	Wizyta studyjna, zapoznanie się ze środowiskiem naukowym, wygłoszenie wykładu planarnego.
3.	Uniwersytet Alberta, Edmonton, Canada	25.X-7.XI.2015	Szkolenie Transformation.doc. z zakresu przedsiębiorczości i umiejętności miękkich realizowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.
4.	Instytut Biochemii Maxa Plancka, Martinsried, Niemcy	V.2011-II.2012	Staż naukowy w ramach stypendium doktorskiego, realizacja grantu HEALTH-F4-2008-201648, przygotowanie rozprawy doktorskiej.
5.	Instytut Badawczy Rizzoli, Bolonia, Włochy	IX.2009- II.2010	Realizacja programu Erasmus Internship w zakresie podstaw hodowli komórkowej oraz technik biologii molekularnej.

7.2 Przynależność do towarzystw naukowych.

Członek Polskiego Towarzystwa Patologów, European Society for Photobiology, Alumni Association of Max Planck Institute of Biochemistry.

a. Dane bibliometryczne.

Mój całociowy dorobek w ujęciu bibliometrycznym na dzień 1.XII.2022 kształtuje się następująco:

Liczba publikacji oryginalnych: 24

Liczba publikacji poglądowych:1

Liczba monografii naukowych:2

Sumaryczny Impact Factor: 90,666

Punktacja MNiSW: 1267,00

Liczba cytowań wg. Web of Science: 477 (bez autocytowań): 449

Indeks Hirscha: 9

Liczba patentów i zgłoszeń patentowych: 4

Przed uzyskaniem stopnia doktora opublikowałam 13 prac o łącznym współczynniku IF 37,975, po uzyskaniu stopnia doktora opublikowałam 11 prac o łącznym IF 52,691.

W 12 publikacjach jestem pierwszym bądź ostatnim autorem, w 5 publikacjach jestem drugim autorem. Szczegółowa analiza bibliometryczna została przedstawiona w załączniku nr. 7

b. Obszary badawcze. Pozostały dorobek publikacyjny z wyłączeniem dzieła.

Prowadzone przeze mnie badania mają charakter interdyscyplinarny, obejmują zagadnienia z zakresu biologii molekularnej, proteomiki, inżynierii optycznej, histopatologii oraz genetyki. Główne obszary badawcze to:

1. Zastosowanie szczypiec optycznych w biologii i medycynie.

Obszar realizowany od 2012 roku we współpracy z dr hab. Sławomirem Drobczyńskim (Politechnika Wrocławska) w ramach kierowanych przeze mnie grantów LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (LIDER/016/275/L-5/13/NCBR/2014) oraz OPUS Narodowego Centrum Nauki (UMO-2017/27/B/ST7/01255). Efektem badań było opracowanie metody identyfikacji patologicznych limfocytów B oraz komory pomiarowej będącej doposażeniem układu szczypiec optycznych. Wynalazki zostały zgłoszone do ochrony patentowej (nr. P.423266, PCT/PL2018/000103, P.424002, PCT/PL2018/050069), a także zostały nagrodzone medalami w trakcie 70 Międzynarodowej Wystawy Wynalazków IENA w Norymberdze (złoty medal), oraz 12 Międzynarodowej Warszawskiej Wystawie Wynalazków IWIS w Warszawie (srebrny medal). Moja praca w powyższym obszarze została nagrodzona Polską Nagrodą Inteligentnego Rozwoju w kategorii „Innowacyjny młody lider nauki” pod patronatem Prezes Urzędu Patentowego RP, dr Alicji Adamczak. W ramach współpracy powstały następujące publikacje:

Lp.	Tytuł, autorzy, źródło	IF	PK
1.	Spectral analysis by a video camera in a holographic optical tweezers setup. SŁAWOMIR DROBCZYŃSKI, KAMILA DUS-SZACHNIEWICZ, KRZYSZTOF SYMONOWICZ, DARIA GŁOGOCKA. Opt.Appl. 2013 Vol.43 no.4 s.739-746, ryc., bibliogr. 11 poz., summ. DOI: 10.5277/oa130410	0,643	15,00

2.	Real-time force measurement in double wavelength optical tweezers. SŁAWOMIR DROBCZYŃSKI, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ. J.Opt.Soc.Am.B-Opt.Phys. 2017 Vol.34 no.1 s.38-43, ryc., bibliogr. 19 poz., summ. DOI: 10.1364/JOSAB.34.000038	2,048	35,00
3.	Toward controlled photothermal treatment of single cell: optically induced heating and remote temperature monitoring in vitro through double wavelength optical tweezers. SŁAWOMIR DROBCZYŃSKI, KATARZYNA PROROK, KONSTANTIN TAMAROV, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, VESA-PEKKA LEHTO, ARTUR BEDNARKIEWICZ. ACS Photonics 2017 Vol.4 no.8 s.1993-2002, ryc., bibliogr. 86 poz., summ. DOI: 10.1021/acsp Photonics.7b00375	6,880	40,00
4.	Double wavelength multifunctional optical tweezers. SŁAWOMIR DROBCZYŃSKI, ALEKSANDRA KORZENIEWSKA, WERONIKA LAMPERSKA, PIOTR WASYLCHYK, DOMINIK DRABIK, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ. W: 21st Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics. Lednice, Czech Republic, 3-7 September 2018 Bellingham, Washington 2018, Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, art.109760C [5 s.], bibliogr. 11 poz.	-----	20,00

2. Analiza proteomiczna wybranych nowotworów człowieka.

Celem badań wykonanych w ramach przewodu doktorskiego była analiza proteomu gruczolaka i gruczolakoraka jelita grubego z archiwalnych tkanek utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie. Badania przeprowadziłam w Departamencie Proteomiki Instytutu Biochemii Maxa Plancka w Martinsried, będącym światowym liderem w zakresie zastosowań proteomiki w biomedycynie. 10- miesięczny staż naukowy odbyłam w ramach 7 Programu Ramowego Wspólnoty Europejskiej pt. Proteomics specifications in space and time (HEALTH-F4-2008-201648). Aby analiza porównawcza archiwalnego materiału pochodzącego od osób chorych i zdrowych niesła istotne informacje kliniczne, niezbędne było pokonanie kilku barier. Istotnym aspektem analizy proteomu tkanek, który uprzednio zaburzał wyniki badań była duża heterogenność guzów. Archiwalne tkanki w postaci bloczków parafinowych poddałam mikrodysekcji laserowej, otrzymując w efekcie jednorodne próbki zawierające ściśle określoną ilość materiału do dalszych analiz.

Dzięki zastosowaniu nowatorskich protokołów przygotowania próbek oraz najnowszej generacji spektrometrów masowych QExactive, analiza porównawcza profili białkowych archiwalnych tkanek gruczolaka, gruczolakoraka i przerzutu do węzłów chłonnych została wykonana z niespotykaną wcześniej efektywnością na poziomie 10 000 białek. Przyczyniło się to do lepszego poznania biologii tego nowotworu. Efektem badań była również walidacja metody MED-FASP na materiale archiwalnym. Zastosowanie dwóch enzymów do proteolitycznego trawienia próbek, możliwa stała się ilościowa analiza niespełna kompletnego

proteomu (ok. 99%) badanej tkanki, w tym archiwalnych tkanek utrwalonych w parafinie, pozwalając na prowadzenie analiz porównywalnych z analizami genomicznymi. Metoda ta stanowi obecnie state-of-the-art w dziedzinie proteomiki klinicznej. Opisane powyżej prace stały się podstawą rozprawy doktorskiej pt. Analiza proteomu gruczolaka i gruczolakoraka jelita grubego metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem archiwalnych tkanek zatopionych w parafinie. W ramach współpracy powstały następujące publikacje:

Lp.	Tytuł, autorzy, źródło	IF	PK
1.	Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma. JACEK R. WIŚNIEWSKI, PAWEŁ OSTASIEWICZ, KAMILA DUŚ, DOROTA F. ZIELIŃSKA, FLORIAN GNAD, MATTHIAS MANN. Mol.Syst.Biol. 2012 Vol.8 art. no.611 [15 s.], ryc., tab., bibliogr. 63 poz., summ.	11,340	45,00
2.	Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. JACEK R. WIŚNIEWSKI, KAMILA DUŚ, MATTHIAS MANN. Proteom.Clin.Appl. 2013 Vol.7 no.3-4 s.225-233, ryc., bibliogr. 43 poz., summ. DOI: 10.1002/prca.201200046	2,683	20,00
3.	Absolute proteome analysis of colorectal mucosa, adenoma, and cancer reveals drastic changes in fatty acid metabolism and plasma membrane transporters. JACEK R. WIŚNIEWSKI, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PAWEŁ OSTASIEWICZ, PIOTR ZIÓŁKOWSKI, DARIUSZ RAKUS, MATTHIAS MANN. J.Proteome Res. 2015 Vol.14 no.9 s.4005-4018, ryc., bibliogr. 77 poz., summ. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00523	4,173	40,00
4.	Proteomic-based analysis of hypoxia- and physioxia-responsive proteins and pathways in diffuse large B-cell lymphoma. KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, KATARZYNA GDESZ-BIRULA, KRZYSZTOF ZDUNIAK, JACEK R. WIŚNIEWSKI. Cells 2021 Vol.10 no.8 art.2025 [26 s.], ryc., tab., bibliogr. 93 poz., summ. DOI: 10.3390/cells10082025	7,666	140,00
5.	Zastosowanie hodowli komórkowych, płynów ustrojowych i tkanek w onkoproteomice (The application of cell cultures, body fluids and tissues in oncoproteomics). KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PAWEŁ OSTASIEWICZ, MARTA WOŹNIAK, ANDRZEJ GAMIAN. Post.Hig.Med.Dośw. 2014 Vol.68 s.1312-1324, tab., bibliogr. 103 poz., streszcz., summ. DOI: 10.5604/17322693.1129117	0,573	15,00

3. Terapia fotodynamiczna w leczeniu wybranych nowotworów złośliwych człowieka.

Kolejny temat badawczy realizowany przeze mnie w Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu to zastosowanie terapii fotodynamicznej (PDT) w leczeniu nowotworów złośliwych człowieka. Obecnie terapia fotodynamiczna cieszy się dużym zainteresowaniem jako alternatywny sposób leczenia chorób, w szczególności nowotworowych. Jest to metoda mało inwazyjna, a ze względu na miejscowe

podanie fotouczulacza jest możliwa do zastosowania u chorych, u których wykluczone są zabiegi chirurgiczne, chemioterapeutycznie i radiologiczne.

Celem badań, które prowadzę od 2011 r. jest analiza właściwości różnych fotouczulaczy oraz ocena skuteczności terapii fotodynamicznej w indukowaniu apoptotycznej śmierci komórek raka jelita grubego i raka piersi, co w przyszłości pozwoli zakwalifikować terapię fotodynamiczną jako jedną z metod leczenia tych nowotworów. Badania nad wpływem PDT na białka regulatorowe prowadzone są na liniach komórkowych oraz preparatach klinicznych. Jako fotosensybilizatora używane są zarówno znane powszechnie prekursorzy protoporfiryny IX – kwasu 5-amino lewulinowego oraz ich estry, jak i nowosyntetyzowane związki. W ramach współpracy powstały następujące publikacje:

Lp.	Tytuł, autorzy, źródło	IF	PK
1.	Vacata- and divacataporphyrin: new photosensitizers for application in photodynamic therapy - an in vitro study. MAGDALENA KLYTA, PAWEŁ OSTASIEWICZ, KAMIL JURCZYSZYN, KAMILA DUŚ, LECHOSŁAW LATOS-GRAŻYŃSKI, EWA PACHOLSKA-DUDZIAK, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Lasers Surg.Med.</i> 2011 Vol.43 no.7 s.607-613, ryc., bibliogr. 27 poz., summ. DOI: 10.1002/lsm.21086	2,748	32,00
2.	Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells. KATARZYNA HOTOWY, MARTA WOŹNIAK, KAMILA DUŚ, ELŻBIETA CZAPIŃSKA, BEATA OSIECKA, MAŁGORZATA KRZYTEK-KORPACKA, ANDRZEJ BRONOWICZ, JACEK WIŚNIEWSKI, ANDRZEJ GAMIAN, GRZEGORZ TERLECKI, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Photodiagn.Photodyn.Ther.</i> 2013 Vol.10 no.4 s.518-525, ryc., bibliogr. 45 poz., summ. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2013.03.009	2,524	20,00
3.	Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy. MARTA WOŹNIAK, KATARZYNA HOTOWY, ELŻBIETA CZAPIŃSKA, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, IZABELA SZCZUKA, ELŻBIETA GAMIAN, ANDRZEJ GAMIAN, GRZEGORZ TERLECKI, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Photodiagn.Photodyn.Ther.</i> 2014 Vol.11 no.1 s.27-33, ryc., tab., bibliogr. 22 poz., summ. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2013.11.002	2,014	25,00
4.	Insulin-like growth factor-2 is induced following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in SW620 human colon cancer cell line. MARTA WOŹNIAK, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Int.J.Mol.Sci.</i> 2015 Vol.16 no.10 s.23615-23629, ryc., tab., bibliogr. 26 poz., summ. DOI: 10.3390/ijms161023615	3,257	30,00
5.	The assessment of the combined treatment of 5-ALA mediated photodynamic therapy and thalidomide on 4T1 breast carcinoma and 2H11 endothelial cell line. KRZYSZTOF ZDUNIAK, KATARZYNA GDESZ-BIRULA, MARTA WOŹNIAK, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Molecules</i> 2020 Vol.25 no.21 art.5184 [10 s.], ryc., bibliogr. 25 poz., summ. DOI: 10.3390/molecules25215184	4,412	140,00

4. Identyfikacja i ocena przydatności biomarkerów nowotworowych.

Ostatni obszar badawczy stanowi fazę walidacyjną wymienionych powyżej aktywności naukowych. Za pomocą metod immunohistochemicznych oraz genetycznych zweryfikowałam potencjalną przydatność wybranych markerów raka jelita grubego, piersi oraz jamy ustnej do celów klinicznych. W przeważającej większości badania te zostały wykonane w ramach współpracy wewnątrzzuczelnej.

Lp.	Tytuł, autorzy, źródło	IF	PK
1.	Immunohistochemical and Western blot analysis of two protein tyrosine phosphatase receptors, R and Z1, in colorectal carcinoma, colon adenoma and normal colon tissues. MARTA WOŹNIAK, ELŻBIETA GAMIAN, IZABELA ŁACZMAŃSKA, MARIA M. SĄSIADK, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Histol.Histopathol.</i> 2014 Vol.29 no.5 s.635-639, ryc., tab., bibliogr. 16 poz., summ. DOI: 10.14670/HH-29.10.635	2,096	25,00
2.	Immunohistochemical study of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 in invasive breast carcinoma of no special type. KRZYSZTOF SYMONOWICZ, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, MARTA WOŹNIAK, MAREK MURAWSKI, PAWEŁ KOŁODZIEJ, BEATA OSIECKA, KAMIL JURCZYSZYN, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Exp.Ther.Med.</i> 2014 Vol.8 no.4 s.1039-1046, ryc., tab., bibliogr. 28 poz., summ. DOI: 10.3892/etm.2014.1847	1,269	15,00
3.	Pattern of melanotransferrin expression in human colorectal tissues: an immunohistochemical study on potential clinical application. KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PAWEŁ OSTASIEWICZ, MARTA WOŹNIAK, PAWEŁ KOŁODZIEJ, JACEK R. WIŚNIEWSKI, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Anticancer Res.</i> 2015 Vol.35 no.12 s.6551-6561, ryc., tab., bibliogr. 56 poz., summ	1,895	20,00
4.	Protein tyrosine phosphatase receptor R and Z1 expression as independent prognostic indicators in oral squamous cell carcinoma. KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, MARTA WOŹNIAK, KAMIL NELKE, ELŻBIETA GAMIAN, HANNA GERBER, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Head Neck</i> 2015 Vol.37 no.12 s.1816-1822, ryc., tab., bibliogr. 26 poz., summ. DOI: 10.1002/hed.23835.	2,760	40,00
5.	Quantitative analysis of gene expression in fixed colorectal carcinoma samples as a method for biomarker validation. BEATA OSTASIEWICZ, PAWEŁ OSTASIEWICZ, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, KATARZYNA OSTASIEWICZ, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Mol.Med.Rep.</i> 2016 Vol.13 no.6 s.5084-5092, ryc., tab., bibliogr. 51 poz., summ. DOI: 10.3892/mmr.2016.5200	1,692	20,00
6.	Significance of matrix metalloproteinase 9 expression as supporting marker to cytokeratin 19 mRNA in sentinel lymph nodes in breast cancer patients. MAREK MURAWSKI, MARTA WOŹNIAK, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, PAWEŁ KOŁODZIEJ, MARTA RZESZUTKO, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>Int.J.Mol.Sci.</i> 2016 Vol.17 no.4 art.571 [13 s.], ryc., tab., bibliogr. 36 poz., summ. DOI: 10.3390/ijms17040571	3,226	30,00
7.	The percentage of stained cells is a more reliable parameter in immunohistochemical analysis than scoring the intensity of staining: expression of 9 molecular markers in progression and liver metastases of colorectal cancer. ANIL KUMAR AGRAWAL, SIDDARTH AGRAWAL,	-----	1,00

	MATEUSZ ŁUC, MARTA WOŹNIAK, DOROTA SNOPKOWSKA-WIADERNA, KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ, TOMASZ SAWICKI, PIOTR ZIÓŁKOWSKI. <i>J.Cancer Ther.</i> 2017 Vol.8 no.6 s.527-545, ryc., tab., bibliogr. 20 poz., summ.		
8.	Zastosowanie technologii mikrodysekcji laserowej w identyfikacji biomarkerów chorób nowotworowych (The application of laser microdissection technology to cancer biomarkers research). KAMILA DUŚ-SZACHNIEWICZ. Od biotechnologii do ochrony środowiska. T.2 : praca zbiorowa. Zielona Góra 2014, Koło Naukowe Biologów Uniwersytetu Zielonogórskiego, s.153-166, ryc., bibliogr. 25 poz., summ, 978-83-7842-117-7.	-----	4,00

c. Kierowanie projektami badawczymi finansowanymi ze źródeł zewnętrznych.

1. Tytuł: Opracowanie multifunkcjonalnych szczypiec optycznych i mikrorobotów do badania wpływu zlokalizowanej hipertermii na komórki i sferoidy nowotworowe uzyskane z hodowli pierwotnych.

Numer projektu: UMO-2017/27/B/ST7/01255

Instytucja finansująca: OPUS 14, Narodowe Centrum Nauki

Kwota całkowita: 1 445 160 zł

Kwota dla Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu: 490 920 zł

Okres kierowania projektem: od 27.VII.2018 do 26.VII.2022

Opis wykonywanych zadań: Kierownik z ramienia partnera konsorcjum.

Streszczenie: We współczesnej onkologii hipertermia definiowana jest jako kontrolowana technika nagrzewania zmian nowotworowych. Za pomocą nadzorowanego przegrzania tkanki nowotworowe są selektywnie niszczone w związku z ich zwiększoną wrażliwością na podwyższoną temperaturę w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Leczenie ogólnoustrojowe jest jednak obciążające dla pacjentów poddawanych zazwyczaj jednocześnie chemio- lub radioterapii. Ponadto w trakcie zabiegów hipertermii ze względów technicznych nie jest możliwe utrzymanie jednakowej dopuszczalnej temperatury we wszystkich punktach nagrzewanego obszaru, co może skutkować niepożądaną degradacją okolicznych tkanek. Alternatywą dla hipertermii ogólnoustrojowej jest eksperymentalne leczenie zlokalizowane, podczas którego do organizmu pacjenta wprowadzane są biofunkcjonalizowane nano- i mikromateriały wykazujące efektywne przegrzewanie w miejscu ich akumulacji. Stosowanie tej metody rodzi jednakże kolejne pytania, m.in. jak kontrolować proces hipertermii by uniknąć przypadkowego zniszczenia zdrowych komórek, w jakim stopniu i z jakich powodów komórki nowotworowe są podatne na HT w porównaniu do komórek zdrowych oraz czy wszystkie

nowotwory reagują na hipertermię w jednakowym stopniu. Na te, i wiele tożsamyh zagadnień próbowali odpowiedzieć autorzy projektu. W tym celu stworzono mikrorozmiarowe materiały – tzw. mikroroboty kontrolowane wiązką laserową. Narzędzia te pozwoliły za pomocą światła generować ciepło, mierzyć temperaturę oraz kwasowość, a także śledzić proces programowanej śmierci komórki w czasie rzeczywistym w modelu guza *in vitro*. Dodatkowo autorzy rozbudowali unikalne narzędzie: szczypce optyczne, które pozwoliły wybiórczo chwycić mikrorozmiarowe obiekty, w tym komórki, wielokomórkowe sferoidy oraz mikroroboty. Za pomocą nowo opracowanych materiałów i metod, w czasie rzeczywistym badano wpływ zlokalizowanej stymulacji cieplnej na komórki prawidłowe oraz patologiczne w układach pojedyncza komórka oraz wielokomórkowa hodowla sferoidów w modelu raka jelita grubego oraz chłoniaków nie-Hodgkina.

2. Tytuł: Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków.

Numer projektu: LIDER/016/275/L-5/13/NCBR/2014

Instytucja finansująca: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, LIDER16

Kwota: 1 199 996 zł

Okres kierowania projektem: od 1.I.2015 do 31.III.2018

Streszczenie: Projekt pn. „Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków” realizowany był w okresie 1.01.2015-31.03.2018 w Katedrze Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Głównym założeniem prowadzonych badań było rozpoznanie czy istnieje możliwość rozróżniania komórek chłoniaków pobranych od pacjentów na drodze biopsji cienkoigłowej na podstawie ich właściwości adhezyjnych, czyli tego, jak chętnie przylegają do sąsiadujących komórek i tworzą z nimi stabilne połączenia.

Projekt o interdyscyplinarnym charakterze realizowany był we ścisłej współpracy z polskimi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi, w tym Politechniką Wrocławską, Narodowym Instytutem Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie- Państwowym Instytutem Badawczym w Warszawie, oraz Instytutem Biochemii Maxa-Plancka w Martinsried. W badaniach wykorzystany został skonstruowany na Politechnice Wrocławskiej układ holograficznych szczypiec optycznych, który dostosowano do potrzeb projektu. Efektem wykonanych prac było uzyskanie dwóch patentów (patent nr 228298 pn. Układ i sposób do holograficznego obrazowania metodą mikroskopii fluorescencyjnej z wygaszaniem przez emisję wymuszoną

oraz patent nr 228233 pn. Sposób i układ do holograficznego obrazowania metodą mikroskopii fluorescencyjnej z wygaszaniem przez emisję wymuszoną) oraz opublikowanie wyników badań w wiodących czasopismach optycznych: 1. Drobczyński S. et al.: Toward controlled photothermal treatment of single cell: optically induced heating and remote temperature monitoring in vitro through double wavelength optical tweezers. ACS Photonics 2017 Vol.4 no.8; s.1993-2002, IF: 6.880, Pkt. MNiSW/KBN: 40.000; 2. Drobczyński S and Duś-Szachniewicz K.: Real-time force measurement in double wavelength optical tweezers, J.Opt.Soc.Am.B-Opt.Phys. 2017 Vol.34 no.1; s.38-43, IF: 2.048, Pkt. MNiSW/KBN: 35.000. Kolejną kwestią związaną z realizacją projektu było zapewnienie fizjologicznych warunków tlenowych w trakcie inkubacji komórek oraz manipulacji w szczypcach optycznych, co stało się możliwe dzięki zaprojektowaniu oraz wykonaniu innowacyjnej komory pomiarowej (zgłoszenie patentowe nr. P.424002 pn. Kompaktowa komora pomiarowa kompatybilna z układem szczypiec optycznych w warunkach kontrolowanego stężenia tlenu oraz międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr PCT/PL2018/050069 pn. Compact measuring chamber compatible with optical tweezers system under controlled oxygen level conditions). Wyniki badań przeprowadzonych na panelu linii nowotworowych pokazują ogromny wpływ stężenia tlenu na właściwości adhezyjne komórek (Duś-Szachniewicz K et al. Physiological hypoxia (physioxia) impairs the early adhesion of single lymphoma cell to marrow stromal cell and extracellular matrix. Optical tweezers study. Int.J.Mol.Sci. 2018 Vol.19 no.7; art.1880 [23s.], IF:4.183, Pkt.MNiSW/KBN:30.000).

Dodatkowo, doświadczenie uzyskane w pracy nad właściwościami adhezyjnymi linii komórkowych, znalazło przełożenie w badaniach klinicznych. Wykazano, że opracowana metoda umożliwia odróżnienie komórek prawidłowych od patologicznych na podstawie czasu tworzenia kokultury z komórką zrębu. (zgłoszenie patentowe nr. P.423266 pn. Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego oraz międzynarodowe zgłoszenie patentowe nr CT/PL/2018/000103 pn. Method for diagnosing neoplasms of lymphoid tissue). Uzyskane wyniki zebrano w formie publikacji: Duś-Szachniewicz K et al., Differentiation of single lymphoma primary cells and normal B-cells based on their adhesion to mesenchymal stromal cells in optical tweezers. Sci.Rep. 2019 Vol.9; art.9885 [13 s.], IF: 4.011, Pkt. MNiSW/KBN: 140.000.

Realizacja projektu została nagrodzona w marcu 2018r. Polską Nagrodą Inteligentnego Rozwoju pod patronatem Urzędu Patentowego RP w kategorii Innowacyjny Młody Lider Nauki. Wynalazek został także doceniony w 2018r. na Międzynarodowych Targach Wynalazków w Norymberdze oraz Warszawie zdobywając odpowiednio złoty oraz srebrny

medal. Łączny Impact Factor opublikowanych prac wyniósł: 17,122, wyniki przeprowadzonych badań zostały zaprezentowane na licznych krajowych oraz międzynarodowych konferencjach naukowych, w tym w Singapurze oraz USA.

3. Stypendium „Grant Plus” Urzędu Marszałkowskiego Województwa Dolnośląskiego dla doktorantów, których badania przyczyniają się do transferu i rozwoju technologii.

Nazwa projektu: Analiza proteomu gruczolaka i gruczolakoraka jelita grubego metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem archiwalnych tkanek zatopionych w parafinie.

Instytucja finansująca: Program Operacyjny Kapitał Ludzki, Priorytet VIII, działanie 8.2.

Kwota całkowita: 50 000 zł

Okres kierowania projektem: 01.X.2013-20.IX.2014

Opis wykonywanych zadań: Kierownik projektu

d. Uczestnictwo w projektach badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych.

Lp.	Tytuł	Numer	Instytucja finansująca	Okres trwania projektu	Funkcja
1.	Identyfikacja biomarkerów raka jelita grubego przy użyciu technik spektroskopii masowej.	NR2011/01/B/NZ5/04 253.	Narodowe Centrum Nauki	2011-2014	Główny wykonawca
2.	Pęseta optyczna w zastosowaniach biomedycznych.	NR13-0023-10/2010	Narodowe Centrum Nauki	2010-2013	Wykonawca
3.	Zastosowanie niskomocowych laserów półprzewodnikowych do generacji holograficznych pułapek optycznych.	N N518 498839	Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego	2010-2013	Wykonawca
4.	Rola wybranych białek regulatorowych w odpowiedzi komórek nowotworowych na terapię fotodynamiczną.	NR N N401 196539	Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego	2010-2013	Wykonawca
5.	Proteomics specifications in space and time.	HEALTH-F4-2008-201648.	Prospect, 7 Program Ramowy Wspólnoty Europejskiej	2008-2013	stypendysta doktorant

e. Zgłoszenia patentowe i uzyskane patenty.

Lp.	Tytuł	Nr. zgłoszenia	Data zgłoszenia	Nr. patentu	Data przyznania ochrony
1.	Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego (Metoda różnicowania prawidłowych limfocytów B i komórek chłoniaków nieziarniczych z komórek B w szczypcach optycznych).	P.423266	2.XI.2017	237087	22.X.2020
2.	Method for diagnosing neoplasms of lymphoid tissue.	PCT/PL2018 /000103	25.X.2018		
3.	Kompaktowa komora pomiarowa kompatybilna z układem szczypiec optycznych w warunkach kontrolowanego stężenia tlenu.	P.424002	21.XII.2017		
4.	Compact measuring chamber compatible with optical tweezers system under controlled oxygen level conditions.	PCT/PL2018 /050069	3.I.2020		

Ad.1. Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego (Metoda różnicowania prawidłowych limfocytów B i komórek chłoniaków nieziarniczych z komórek B w szczypcach optycznych).

Twórcy: **Kamila Duś-Szachniewicz (40%)**, Marta Woźniak (30%), Krzysztof Zduniak (10%), Kinga Walaszek (10%), Sławomir Drobczyński (10%).

Opis: Opracowana metoda umożliwia wysoce skuteczne rozróżnianie komórek prawidłowych od komórek patologicznych na podstawie czasu niezbędnego do utworzenia stabilnej kokultury pomiędzy fibroblastami zrębu szpiku kostnego a limfocytami B w szczypcach optycznych. Zastrzegana metoda może znaleźć zastosowanie jako nowatorska procedura diagnostyczna u pacjentów z podejrzeniem choroby rozrostowej układu chłonnego. Istotny aspekt stanowi fakt, że materiał do nowo opracowanej diagnostyki w szczypcach optycznych pobierany jest ambulatoryjnie na drodze mało inwazyjnej biopsji cienkoigłowej. Pozwala to wyeliminować

dyskomfort związany z hospitalizacją oraz uniknąć ewentualnych powikłań pooperacyjnych. Do wykonania zaproponowanej procedury diagnostycznej niezbędny jest komercyjny układ szczypiec optycznych. Projekt wynalazczy pt. "Sposób diagnozowania nowotworów układu chłonnego (zgłoszenie nr. P.423266 z dnia 25.X.2017) /"Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków" został wybrany przez organizatorów wydarzenia IMPACT'2018 do prezentacji w przestrzeni IMPACT LINK, 13-14.06.2018, Kraków.

Ad. 2. Kompaktowa komora pomiarowa kompatybilna z układem szczypiec optycznych w warunkach kontrolowanego stężenia tlenu.

Twórcy: Marcin Bacia (45%), **Kamila Duś-Szachniewicz (35%)**, Marta Woźniak (20%)

Opis: Zgodnie z wynalazkiem, układ szczypiec optycznych do pomiarów fizycznych właściwości komórek w ściśle określonej atmosferze pozwala na przeprowadzanie manipulacji optycznych w warunkach tlenowych podobnych, do tych, w jakich funkcjonują komórki w żywym organizmie (tzw. warunki fizjoksji). Zastrzegane rozwiązanie pozwala na odizolowanie stanowiska pomiarowego od atmosfery zewnętrznej i usunięcie tlenu, poprzez wypchnięcie go przez neutralny gaz (azot). Zgodnie z wynalazkiem, opracowano hermetyczną komorę do manipulacji na żywych komórkach w szczypcach optycznych, która stanowi nowy, dodatkowy element układu holograficznych szczypiec optycznych. Komora służy do oceny właściwości biomechanicznych komórek, w tym elastyczności, sprężystości oraz właściwości adhezyjnych w warunkach stałej kontroli stężenia tlenu. Umieszczona jest między dwoma elementami układu szczypiec optycznych: bezpośrednio sąsiaduje z obiektywem od dołu i z układem oświetlacza od góry. Komora według wynalazku jest szczelna i kompatybilna z układem szczypiec optycznych. Niewielkie rozmiary komory pozwalają na zachowanie szczelności komory i utrzymanie zadanej atmosfery gazowej, a także zapewniają jej mobilność. Zaprojektowany moduł utrzymuje zadany skład atmosfery poprzez ciągle dostarczanie gazów w ustalonych proporcjach. Czyni to komorę pomiarową układem przepływowym. Aby uzyskać warunki hipoksji, mieszane są w odpowiednich proporcjach dwa składniki: powietrze atmosferyczne na bieżąco pobierane z otoczenia (zawartość tlenu ok. 21%) oraz azot dostarczany z butli wysokociśnieniowej.

f. Otrzymane stypendia.

2010-2014- Stypendium Naukowe dla Najlepszych doktorantów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2012-2014- Stypendium projakościowe dla doktorantów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

2014- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów za wybitne osiągnięcia na rok akademicki 2014/2015.

g. Otrzymane nagrody i wyróżnienia.

XI.2022- Nagroda Indywidualna I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za publikację: Duś-Szachniewicz K et al. Large-Scale Proteomic Analysis of Follicular Lymphoma Reveals Extensive Remodeling of Cell Adhesion Pathway and Identifies Hub Proteins Related to the Lymphomagenesis. Cancers (Basel). 2021 Feb 5;13(4):630.

XII.2020- Nagroda Specjalna Indywidualna Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu za cykl publikacji umieszczony w bazie Journal Citation Reports.

X.2018- Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju w kategorii „Innowacyjny młody lider nauki” za projekt „Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków”. Nagroda pod patronatem Prezes Urzędu Patentowego RP, dr Alicji Adamczak.

2018- Nominacja do tytułu „Symbol 2018” Monitora Biznesu za projekt pn. "Wykorzystanie innowacyjnej technologii szczypiec optycznych w celu opracowania mało inwazyjnej terapii celowanej chłoniaków”.

III.2018- Złoty medal za wynalazek „An optical tweezers based assay to precisely differentiate B-cell lymphoma cell from normal B-cell”. 70 Międzynarodowa Wystawa Wynalazków IENA, Norymberga, Niemcy. Organizator: AFAG Messen und Austellungen GmbH.

X.2018- Srebrny medal za wynalazek „An optical tweezers based assay to precisely differentiate B-cell lymphoma cell from normal B-cell”. 12 Międzynarodowa Warszawska Wystawa Wynalazków IWIS, Warszawa. Organizator: Stowarzyszenie Polskich Wynalazców i Racjonalizatorów, Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej.

I.2017- Nagroda za najlepsze wystąpienie ustne. The ICTMC 2017: 19th International Conference on Traditional Medicine and Cancer, Singapur

Kamila Duś-Szachniewicz