

Zakład Immunologii
Katedra Immunologii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

AUTOREFERAT

dr n. biol. Mariusz Kaczmarek

Poznań 2018

Spis treści

Imię i nazwisko	3
Posiadane dyplomy/stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).....	4
a) tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia.....	4
c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	27
Działalność dydaktyczno-wychowawcza	41
Działalność organizacyjna.....	43

Imię i nazwisko

Mariusz Kaczmarek

Posiadane dyplomy/stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Rok	Tytuł/stopień
10.06.2009 r.	Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologia na podstawie wyróżnionej rozprawy doktorskiej, pt.: „Wpływ makrofagów opłucnowych na apoptozę i ekspresję białek regulujących apoptozę komórek nowotworowych” Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Lekarski I, promotor dr hab. n med. Jan Sikora
25.06.1998 r.	Tytuł magistra inżyniera biotechnologii na podstawie pracy magisterskiej, pt.: „Analiza molekularna genu <i>CFTR</i> w przypadkach bezpłodności męskiej”, wykonanej w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, promotor dr hab. med. Michał Witt; Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu Wydział Rolniczy, Kierunek Biotechnologia
25.06.1993 r.	Laborant chemiczny Policealne Studium Zawodowe przy Zespole Szkół Chemicznych w Poznaniu

Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Rok	Miejsce zatrudnienia/stanowisko
Od 1.10.2018 r.	Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej Starszy wykładowca
2010 – 2018 r.	Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej Adiunkt
2009 – 2010 r.	Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Zakład Immunologii, Katedra Immunologii Klinicznej Asystent
1999 – 2006 r.	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 2 im. H. Święcickiego w Poznaniu, Młodszy asystent
1998 – 2009 r.	Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu Starszy referent inżynierijno-techniczny

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Wzajemne oddziaływania pomiędzy wybranymi populacjami komórek układu odpornościowego a komórkami nowotworowymi w mikrośrodkowisku nowotworowego wysięku opłucnowego

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

- 1) **M. Kaczmarek**, A. Nowicka, M. Kozłowska, J. Zurawski, H. Batura-Gabryel, J. Sikora: Evaluation of the phenotype pattern of macrophages isolated from malignant and non-malignant pleural effusions. Tumour Biol. 2011; 32(6): 1123-32

Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.143

Punktacja MNiSW: 20.000

Liczba cytowań wg Web of Science: 15

***Indywidualny wkład własny obejmował:** zgromadzenie i analizę dostępnej literatury, określenie hipotezy badawczej, ustalenie koncepcji oraz koordynację badań, zdefiniowanie zastosowanej metodologii oraz organizację zespołu badawczego, preparatykę laboratoryjną zgromadzonego materiału badawczego, hodowle komórkowe in vitro, wykonanie oznaczeń molekularnych i cytometrycznych oraz pomiar stężenia badanych białek, ocenę i interpretację wyników, analizę statystyczną, przygotowanie oraz zredagowanie manuskryptu, opracowanie wstępnej i ostatecznej wersji publikacji.*

Udział procentowy: 90%

- 2) **M. Kaczmarek**, J. Sikora: Macrophages in malignant pleural effusions – alternatively activated tumor associated macrophages. Współczesna Onkol. 2012; 16(4): 279-28

Wskaźnik Impact Factor ISI: 0.211

Punktacja MNiSW: 15.000

Liczba cytowań wg Web of Science: 7

***Indywidualny wkład własny obejmował:** zgromadzenie i analizę dostępnej literatury, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, opracowanie wstępnej i ostatecznej wersji publikacji.*

Udział procentowy: 90%

- 3) **M. Kaczmarek**, M. Łagiedo, A. Masztalerz, M. Kozłowska, A. Nowicka, B. Brajer, H. Batura-Gabryel, J. Sikora: Concentrations of SP-A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non-small cell lung cancer. Immunobiology. 2018; 223(2): 200-209

Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.873

Punktacja Min. Nauki: 25.000

Indywidualny wkład własny obejmował: zgromadzenie i analizę dostępnej literatury, określenie hipotezy badawczej, ustalenie koncepcji oraz koordynację badań, zdefiniowanie zastosowanej metodologii oraz organizację zespołu badawczego, preparatykę laboratoryjną zgromadzonego materiału badawczego, wykonanie oznaczeń cytometrycznych oraz pomiar stężenia wybranych białek, ocenę i interpretację wyników, analizę statystyczną, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, opracowanie wstępnej i ostatecznej wersji publikacji.

Udział procentowy: 70%

- 4) **M. Kaczmarek**, B. Rubis, M. Frydrychowicz, A. Nowicka, B. Brajer-Luftmann, M. Kozłowska, M. Lagiedo, H. Batura-Gabryel, J. Sikora: Pleural macrophages can promote or inhibit apoptosis of malignant cells via humoral mediators depending on intracellular signaling pathways. *Cancer Invest.* 2018; 36(5): 264-278
doi10.1080/07357907.2018.1477158

Wskaźnik Impact Factor ISI: 2.053

Punktacja Min. Nauki: 20.000

Indywidualny wkład własny obejmował: zgromadzenie i analizę dostępnej literatury, określenie hipotezy badawczej, ustalenie koncepcji oraz koordynację badań, zdefiniowanie zastosowanej metodologii oraz organizację zespołu badawczego, preparatykę laboratoryjną zgromadzonego materiału badawczego, wykonanie oznaczeń cytometrycznych oraz pomiar stężenia wybranych cytokin oraz czynników transkrypcyjnych, wykonanie oceny molekularnej wybranych genów, ocenę i interpretację wyników, analizę statystyczną, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, opracowanie wstępnej i ostatecznej wersji publikacji.

Udział procentowy: 80%

- 5) **M. Kaczmarek**, J. Maciejewska, Ł. Spychalski, M. Socha-Kozłowska, A. Nowicka, J. Sikora. Evaluation of neutrophil immunophenotype in the microenvironment of malignant pleural effusion. *Med. J Cell Biol.* 2018; 6(2): 66-74 doi: 10.2478/acb-2018-0012

Indywidualny wkład własny obejmował: zgromadzenie i analizę dostępnej literatury, określenie hipotezy badawczej, ustalenie koncepcji oraz koordynację badań, zdefiniowanie zastosowanej metodologii oraz organizację zespołu badawczego, współudział w preparatyce laboratoryjnej zgromadzonego materiału badawczego, ocenę i interpretację wyników, analizę statystyczną, przygotowanie i zredagowanie manuskryptu, opracowanie wstępnej i ostatecznej wersji publikacji.

Udział procentowy: 70%

- 6) J. Budna, **M. Kaczmarek**, J. Sikora: Znaczenie komórek T regulatorowych w rozwoju tolerancji na nowotwór. *Postępy Biol. Kom.* 2011; 38(2):283-295

Wskaźnik Impact Factor: 0.073

Punktacja KBN/MNiI: 15.000

Liczba cytowań wg Web of Science: 3

Indywidualny wkład własny obejmował: współudział w przygotowaniu manuskryptu oraz opracowaniu ostatecznej wersji publikacji.

Udział procentowy: 15%

- 7) J. Budna*, M. Kaczmarek*, A. Kolecka-Bednarczyk, Ł. Spychalski, P. Zawierucha, J. Goździk-Spychalska, M. Nowicki, H. Batura-Gabryel, J. Sikora: Enhanced suppressive activity of regulatory T cells in the microenvironment of malignant pleural effusions. J Immunol Res. Vol. 2018 (2018), Article ID 9876014, doi.org/10.1155/2018/9876014

Wskaźnik Impact Factor ISI: 3.298

Punktacja Min. Nauki: 25.000

Indywidualny wkład własny obejmował: współudział w koncepcji badań oraz w preparatyce laboratoryjnej zgromadzonego materiału badawczego, pomiar badanych białek, ocenę i interpretację wyników, współudział w analizie statystycznej, współprzygotowanie i redagowanie manuskryptu.

Udział procentowy: 40%

Podsumowanie punktacji publikacji wchodzących w skład osiągnięcia:

Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor wg Journal Citation Reports = 10.651

Sumaryczna wartość punktacji MNiSW = 120.000

Sumaryczna liczba cytowań wg Web of Science: 25

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

Powstawanie nowotworu jest wieloetapowym procesem rozłożonym w czasie. Pojawienie się zmian genotypowych i fenotypowych w komórce, ich utrwalenie, a w dalszym etapie wzrost guza, ucieczka komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego i rozprzestrzenianie się w organizmie oraz, ostatecznie, tworzenie przerzutów w miejscach odległych od guza pierwotnego, obejmuje różnorodne mechanizmy. Podczas nowotworzenia zachodzą liczne zmiany, począwszy od defektów na poziomie molekularnym w obrębie komórki, poprzez stworzenie odrębnej sieci naczyń krwionośnych i przebudowę tkanki, aż do strukturalnego lub funkcjonalnego uszkodzenia istotnych dla życia narządów, co ostatecznie doprowadza do śmierci całego organizmu.

Jedną z podstawowych funkcji układu odpornościowego jest monitorowanie organizmu i sprawne usuwanie populacji komórek nieprawidłowych oraz takich, które uległy już transformacji nowotworowej. Pojawienie się w tkance komórek zmienionych nowotworowo indukuje zarówno wrodzone, jak i nabyte mechanizmy obronne. Ograniczony funkcjonalnie układ immunologiczny zamiast kontrolować nowotwór może wspierać jego

rozwój i rozprzestrzenianie się [1]. Konsekwencją długotrwałej interakcji między układem odpornościowym a nowotworem jest dynamiczny proces zmiany fenotypu guza, zwany immunoedytowaniem [2]. Długofalowa presja wytwarzana przez mechanizmy obronne organizmu sprzyja selekcji mniej immunogennych populacji komórek nowotworowych, które w rezultacie stają się nierozpoznawalne przez układ odpornościowy. Ukierunkowany w czasie proces immunoedytowania przebiega w trzech następujących po sobie etapach, tzw. trzech E: eliminacji (*ang.* elimination), równowagi (*ang.* equilibrium) i ucieczki (*ang.* escape) [3].

W pierwszym z tych etapów nie obserwuje się objawów klinicznych choroby nowotworowej. W fazie eliminacji zmutowane komórki pobudzają skierowaną przeciw nim odpowiedź immunologiczną, która może doprowadzić do spontanicznej regresji nowotworu. Zachodzący w tym czasie proces angiogenezy oraz zmiany w obrębie struktury tkanki indukują nieswoiste mechanizmy odpowiedzi immunologicznej w sposób analogiczny do pobudzenia przez mikroorganizmy, natomiast komórki zmienione dysplastycznie usuwane są z organizmu poprzez współpracujące ze sobą mechanizmy nieswoiste i swoiste. Komórki NK, limfocyty NKT oraz limfocyty $T\gamma\delta$ aktywowane są przez cytokiny prozapalne uwalniane przez komórki nowotworowe, komórki zrębu oraz infiltrujące nowotwór makrofagi. Międzykomórkowe mediatory rekrutujące różne populacje leukocytów do miejsca rozwijającego się nowotworu stymulują ich aktywność cytotoksyczną podejmowaną za pośrednictwem mechanizmów receptorowych (FasL, TRAIL, PD-L1 i PD-L2) lub sekrecyjno - membranolitycznych (poprzez białka: perforyna/granzym B/granulizyna). Dezintegracja błony komórkowej komórek nowotworowych prowadząca do nekrozy uwalnia z ich powierzchni antygeny nowotworowe, które stają się elementem inicjującym odpowiedź swoistą. Dojrzałe komórki dendrytyczne zawierające antygeny pochodzenia nowotworowego migrują do węzłów chłonnych, aby tam zaprezentować je naiwnym limfocytom T. W wyniku prezentacji antygeny następuje ekspansja klonalna cytotoksycznych limfocytów T (*ang.* cytotoxic T lymphocytes; CTL) specyficznych względem antygenów nowotworowych oraz ich rekrutacja do miejsca rozwoju guza pierwotnego, gdzie bezpośrednio atakują i zabijają komórki nowotworowe [4]. Efektywność fazy eliminacji jest jednakże ograniczona. Przy braku odpowiednich sygnałów prozapalnych indukujących odpowiedź immunologiczną może dojść do rozwinięcia tolerancji wobec nowotworu oraz selekcji komórek nowotworowych o zredukowanym potencjale immunogennym [5]. Rozwój stanu zapalnego

w miejscu tworzenia się nowotworu angażuje przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną. Jednak przy zbytnej intensywności sygnałów prozapalnych lub w trakcie przetrwałej, nawet utajonej klinicznie ekspozycji tkanki na czynniki zapalne, tzw. tłący się stan zapalny (*ang.* smoldering inflammation), zapalenie może sprzyjać progresji nowotworu. Przewlekły stan zapalny może być inicjowany i podtrzymywany przez czynniki uwalniane z umierających komórek, tzw. wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (*ang.* damage-associated molecular patterns; DAMP). Wysokie stężenie DAMP w obrębie tkanki może sprzyjać rozwojowi lub progresji guza [6]. W mechanizmie przywracania homeostazy zlokalizowane w mikrośrodowisku prozapalnym komórki prezentujące antygen, m.in. makrofagi towarzyszące nowotworom (*ang.* tumor-associated macrophages; TAM), mogą rozpocząć proces uwalniania czynników przeciwzapalnych, takich jak IL-10 lub TGF β , które wywołują lokalną immunosupresję i hamują aktywność komórek efektorowych [7].

Druga faza immunoedytowania, faza równowagi, jest najdłuższa i może trwać wiele lat. W tym czasie zachodzi dalsze modelowanie molekularne komórek nowotworowych, tzw. rzeźbienie (*ang.* sculpturing), które prowadzi do wytworzenia wyselekcjonowanej populacji odpornej wobec mechanizmów efektorowych komórek układu odpornościowego. Takie guzy o obniżonej immunogenności wykazują zwiększoną zdolność do przeżycia w organizmie, w którym układ odpornościowy funkcjonuje prawidłowo. Etap ten obejmuje ciągłą eliminację komórek nowotworowych znajdujących się pod immunologiczną presją selekcyjną i wytwarzanie nowych, bardziej odpornych wariantów klonalnych nowotworu. W tym czasie kluczową rolę odgrywają limfocyty naciekające guz (*ang.* tumor-infiltrating lymphocytes; TIL) oraz wydzielany przez nie IFN γ [4], natomiast komórki nowotworowe poprzez nowe mutacje stają się niestabilne genetycznie, co przyczynia się do ich wzrastającej odporności na atak układu odpornościowego. W fazie równowagi pod wpływem obecnych w mikrośrodowisku mediatorów, głównie chemokin i czynników wzrostu, tworzy się zrąb guza [8]. Faza ta nie niesie ze sobą szczególnych objawów klinicznych związanych z chorobą nowotworową, a jej ujawnienie jest nieoczekiwane [9].

W ostatniej fazie immunoedytowania komórki nowotworowe są zdolne do unikania nadzoru immunologicznego w sposób zarówno bierny, jak i aktywny. Pojawiające się uszkodzenia tkanek i narządów sprawiają, że choroba nowotworowa uzyskuje pełen obraz kliniczny. W tym okresie rozrost komórek guza jest niekontrolowany i zachodzi szybciej niż wykształcanie się skutecznej obrony przeciwnowotworowej. Opisywane zjawisko nosi nazwę

prześlizgu (*ang.* sneaking through) [8]. Możliwość ucieczki spod nadzoru immunologicznego dają komórkom nowotworowym powiązane ze sobą mechanizmy, takie jak: unikanie rozpoznawania przez układ immunologiczny, aktywacja negatywnych szlaków regulatorowych, wydzielanie immunosupresyjnych cytokin i innych czynników humoralnych oraz rekrutacja i ułatwianie rozplemu komórek regulatorowych i supresorowych [10]. Strategia unikania rozpoznawania obejmuje utratę lub obniżenie ekspresji antygenów nowotworowych oraz cząsteczek prezentujących antygen, głównie MHC klasy II, a także zmiany struktury i funkcji białek uczestniczących w przetwarzaniu i transporcie cytoplazmatycznym antygenów, np. TAP1 i TAP2 [11, 12, 13]. Istotnym dla samoobrony nowotworu jest obniżenie wrażliwości na czynniki cytotoksyczne (np. IFN γ) oraz eliminacja limfocytów znajdujących się w nacieku leukocytarnym guza poprzez cząsteczki FasL i PD-L1, które inicjują ich programowaną śmierć, głównie apoptozę [14]. Sieć immunosupresyjna zależna od mediatorów, takich jak TGF β , IL-10 i PGE $_2$, angażuje w mikrośrodowisku nowotworu supresorowe subpopulacje makrofagów i neutrofilów, komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (*ang.* myeloid derived suppressor cells; MDSC), tolerogenne komórki dendrytyczne oraz limfocyty T regulatorowe (Treg) [15, 16, 17, 18]. Obecność komórek o silnie immunosupresyjnym charakterze intensyfikuje proces inaktywacji i eliminacji subpopulacji efektorowych komórek układu odpornościowego o charakterze przeciwnowotworowym. Limfocyty Treg oraz mieloidalne komórki supresorowe obecne w mikrośrodowisku nowotworu tłumią odpowiedź przeciwnowotworową, a także aktywnie wspierają proces przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej oraz angiogenezy. Wytworzenie przez guz własnej sieci naczyń krwionośnych zapewnia mu odpowiednią podaż substancji odżywczych oraz umożliwia komórkom migrację z miejsca pierwotnej zmiany do nisz metastatycznych. W tym procesie kluczową rolę odgrywają cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu, wydzielane zarówno przez komórki guza i jego zrębu (np. fibroblasty), jak i naciekające go makrofagi, neutrofile oraz MDSC. Badania populacji makrofagów będących pod wpływem mikrośrodowiska nowotworowego wykazały, że ich relacje z guzem zależą w znacznej mierze od humoralnych czynników regulatorowych. Zależnie od profilu cytokin, chemokin i czynników wzrostu w otoczeniu guza makrofagi mogą zmieniać swój stan czynnościowy, i w pierwszej fazie odpowiedzi immunologicznej przyjmować wzorzec przeciwnowotworowy, natomiast w miarę rozwoju guza ich aktywność może zyskiwać charakter pronowotworowy [19].

Wysięk opłucnowy towarzyszący rozwijającemu się nowotworowi stanowi szczególnie mikrośrodowisko. Przyczyną pojawiania się wysięków nowotworowych w jamie opłucnej może być rozwój pierwotnej formy guza opłucnej, jaką jest międzybłoniak (*łac.* mesothelioma), a także zagnieżdżanie się komórek nowotworowych pochodzących z przerzutów [20]. Wiele obserwacji wskazuje na to, że mikrośrodowisko wysięku nowotworowego wzmacnia złośliwość komórek nowotworowych. Płyn opłucnowy bogaty w różnego rodzaju składniki stymulujące pobudza komórki nowotworowe do podziałów i podtrzymuje ich przeżycie [21]. Komórki nowotworowe od pierwszych stadiów nowotworzenia pozostają w pośrednim lub bezpośrednim kontakcie z komórkami układu odpornościowego. W zależności od fazy karcynogenezy ich różnorodność, udział i stan czynnościowy ulega ciągłym zmianom. W tych interakcjach uczestniczą zarówno komórki pomocnicze, takie jak monocyty/makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne oraz inne komórki mieloidalne w różnym stadium dojrzałości, jak i komórki immunologicznie czynne, czyli komórki NK, różnorodne populacje limfocytów T i B. W zależności od warunków panujących w mikrośrodowisku nowotworu reakcja i stan czynnościowy komórek układu odpornościowego może zmieniać się dynamicznie i przechodzić metamorfozę, od aktywności efektorowej skierowanej przeciw nowotworowi do aktywności regulatorowej, czy wręcz supresorowej, która w sposób bierny lub aktywny wspiera rozwój nowotworu. Komórki nowotworowe obecne w obrębie różnych narządów kreują wokół siebie odmienne otoczenie. Różnorodność ta ma związek głównie z profilem wydzielanych czynników humoralnych, które kierują aktywnością komórek układu odpornościowego, jednak model rekrutacji leukocytów do otoczenia rozwijającego się guza jest uniwersalny.

W prezentowanym cyklu prac, stanowiącym opisywane osiągnięcie naukowe, nadrzędnym celem przeprowadzonych badań było określenie poszczególnych elementów zaangażowanych w interakcje komórek nowotworowych z komórkami układu odpornościowego w mikrośrodowisku wysięku opłucnowego. Zakres badanych zagadnień obejmował wskazanie różnorodnych rozpuszczalnych mediatorów regulujących aktywność komórek układu odpornościowego oraz zaangażowanie komórek będących elementami nieswoistej (makrofagi, neutrofile), jak i swoistej (Treg) odpowiedzi immunologicznej wykazujących silne działanie immunosupresyjne wspierające rozwój nowotworu. Omówienie każdego badanego mechanizmu zostanie przeprowadzone na podstawie uzyskanych wyników i wniosków opisanych wcześniej w publikacjach stanowiących podstawę cyklu.

- 1) **M. Kaczmarek**, A. Nowicka, M. Kozłowska, J. Zurawski, H. Batura-Gabryel, J. Sikora.
Evaluation of the phenotype pattern of macrophages isolated from malignant and non-malignant pleural effusions. *Tumour Biol.* 2011; 32(6): 1123-32

Makrofagi obecne w nowotworowym wysięku opłucnowym stanowią heterogenną populację. Składają się na nią rezydujące w opłucnej makrofagi opłucnowe oraz makrofagi przekształcone z monocytów rekrutowanych z krwi obwodowej, które pojawiają się w odpowiedzi na sygnały chemotaktyczne wydzielane przez różne komórki w trakcie nasilenia stanu zapalnego wywoływanego przez rozwijający się nowotwór. W związku z tym, że makrofagi opłucnowe stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami oraz komórkami nowotworowymi, są ważnym elementem odpowiedzi komórkowej w tym środowisku. Ich nadrzędną funkcją jest fagocytoza obumarłych komórek mezotelialnych i przechodzących do opłucnej mikroorganizmów, a także wspieranie reakcji zapalnej [22]. Dla opisu dynamicznego procesu zmiany profilu czynnościowego makrofagów towarzyszących nowotworom (TAM) zaproponowano model różnicujący prozapalne, przeciwnowotworowe makrofagi typu M1 od przeciwzapalnych, wspierających rozwój nowotworu makrofagów typu M2 [23]. Makrofagi M1 o fenotypie IL-12^{high}, IL-23^{high} i IL-10^{low} wspomagają odpowiedź typu Th1, produkują mediatory prozapalne i wykazują zwiększoną zdolność do niszczenia wewnątrzkomórkowych patogenów [24]. Makrofagi M2 mają fenotyp IL-12^{low}, IL-23^{low} i IL-10^{high}, wspierają profil Th2 oraz pełnią funkcje immunoregulacyjne. W naturalny sposób uczestniczą w procesach gojenia, angiogenezy oraz przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, przez co mogą aktywnie wspierać ekspansję nowotworu. W większości przypadków TAM mają podobny profil aktywacji do makrofagów typu M2, szczególnie w późnej fazie rozwoju guza [25].

Celem prezentowanej pracy była identyfikacja markerów charakteryzujących makrofagi, które zostały pozyskane z wysięków opłucnowych od pacjentów z nowotworowymi wysiękami opłucnowymi oraz od pacjentów z wysiękami opłucnowymi bez zdiagnozowanej choroby nowotworowej. Ponadto podjęto próbę określenia profilu aktywacji makrofagów obecnych w wysiękach nowotworowych i nienowotworowych. W badaniach wykorzystano makrofagi pochodzące z 15 nowotworowych i 23 nienowotworowych wysięków opłucnowych. W tym celu zastosowano odpowiednią metodę separacji opartą na adherentnych właściwościach makrofagów. Komórki poddano

wielokierunkowej analizie oceniając za pomocą RT-PCR ekspresję mRNA dla IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-18, TNF α , TGF β 1, IL1R1, IL1RAP, TLR2, TLR4, VLA4, CD62L, MMP2, MMP9, VEGFA, PDGFA i PDGFB. Jednocześnie metodą immunohistochemiczną określono obecność CD68, mezoteliny, MAC387, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF α i CD105. Metodę cytometrii przepływowej (*ang.* Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) wykorzystano do oceny cytoplazmatycznej ekspresji cytokin: IFN γ , TNF α , IL-6 i IL-10 oraz powierzchniowej ekspresji antygenów: CD11a, CD14, CD15, CD16, CD23, CD25, CD45, CD54, CD62L, CD69, VLA2, VLA3, VLA4, VLA6, TLR2, TLR4 i CCR7. W supernatantach z krótkoterminowej hodowli makrofagów zmierzono testami CBA Flex Set i ELISA stężenie TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP1, VEGF i TGF β 1.

Do analizy wyników uzyskanych w trakcie przeprowadzonych badań, obok bogatej gamy testów statystycznych, użyto również matematyczną metodę predykcji wykorzystującą w praktyce teorię zbiorów przybliżonych (*ang.* Rough set theory). W tym celu zastosowano oprogramowanie ROSE2 v2.2, stworzone przez Laboratorium Inteligentnych Systemów Wspomagania Decyzji Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej. Zastosowanie algorytmów matematycznych pomogło odrzucić wspólne elementy charakteryzujące makrofagi izolowane z obu rodzajów wysięków i skupić się wyłącznie na determinantach różniących obie subpopulacje.

Ocena stężenia mediatorów wydzielanych przez makrofagi izolowane z nienowotworowych i nowotworowych wysięków opłucnowych wykazała, że makrofagi z wysięków nowotworowych znacznie intensywniej syntetyzują czynniki wspierające rekrutację komórek mieloidalnych, rozwój reakcji zapalnej o charakterze przewlekłym, angiogenezę i przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Ocena cytometryczna immunofenotypu wskazała, że po odrzuceniu markerów, których ekspresja utrzymywała się na podobnym poziomie w obu grupach, profil immunofenotypowy makrofagów izolowanych z wysięków nowotworowych charakteryzował się wysoką ekspresją CD62L, CD14 oraz CD23 i tym samym zbliżał je do wzorca makrofagów typu M2. Na poziomie mRNA makrofagi opłucnowe z wysięków nowotworowych wykazywały ekspresję genu kodującego białko pomocnicze receptora dla IL-1 (IL1RAP), natomiast w komórkach tych nie ulegał ekspresji gen kodujący integrynę VLA4. Analiza predykcyjna badanego materiału wykazała, że obecność mRNA dla IL1RAP i jego brak dla VLA-4 z ponad 35% prawdopodobieństwem wskazuje na nowotworowe pochodzenie takich makrofagów.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy w literaturze w tak szerokim zakresie badano makrofagi obecne w wysiękach opłucnowych, łącznie z ich szczegółową i wielokierunkową charakterystyką molekularną. Wyniki z zaprezentowanej powyżej charakterystyki populacji makrofagów w wysiękach opłucnowych mogą przyczynić się do efektywniejszego wykrywania złośliwych nowotworów płuc. Badanie cytologiczne, będące standardem w diagnostyce i różnicowaniu wysięków opłucnowych, obarczone jest ograniczonymi możliwościami. Jedynie 60% przypadków wczesnych stadiów rozwoju nowotworu jest diagnozowanych przy użyciu cytologii [26]. W sytuacjach oceny cytologicznej, gdy nie stwierdza się innej przyczyny, większość wysięków w jamie opłucnej wiąże się z rozwojem nowotworu. W związku z tym ocena różnorodnych komponentów wysięku staje się istotnym obszarem dla poszukiwania nowych markerów diagnostycznych i celów terapeutycznych. Wskazane w prezentowanych badaniach geny oraz antygeny różnicowania pozwalają na zróżnicowanie populacji makrofagów pochodzących z wysięków nowotworowych i nienowotworowych. Mogą być zatem pomocniczymi markerami we wczesnej diagnostyce różnicowej wysięków opłucnowych. Odkrycie to stanowi ważne osiągnięcie poznawcze prezentowanych badań.

2) **M. Kaczmarek**, J. Sikora. Macrophages in malignant pleural effusions – alternatively activated tumor associated macrophages. *Współczesna Onkol.* 2012; 16 (4): 279-28

Podsumowaniem kilku lat badań koncentrujących się na obecności i roli makrofagów w mikrośrodku wysięków opłucnowych o różnej etiologii jest praca poglądowa prezentowana w ramach omawianego cyklu. Ogólna charakterystyka określa makrofagi jako komórki fagocytykujące zdolne do prezentacji antygenów. Stała obecność makrofagów w poszczególnych narządach i tkankach jest przyczyną wysokiej heterogenności tej populacji, a ich znaczna plastyczność w zakresie struktury i funkcji wynika z faktu, że komórki te mogą być rekrutowane do miejsc, gdzie w danym czasie są niezbędne w realizacji odpowiednich czynności układu odpornościowego. Również makrofagi zasiedlające okolice klatki piersiowej można podzielić na wiele różnych subpopulacji, wśród których makrofagi opłucnowe stanowią specyficzną grupę komórek o zasięgu ograniczonym do przestrzeni opłucnowej. Od innych subpopulacji makrofagi opłucnowe różnią się zarówno pod względem prezentowanego immunofenotypu, jak i wyspecjalizowanej funkcji. Ich nadrzędną rolą jest oczyszczanie opłucnej z martwych komórek mezotelialnych, mikroorganizmów i komórek

zmienionych nowotworowo. W odpowiedzi na rozmaite czynniki środowiskowe makrofagi różnicują się funkcjonalnie. Według ogólnie zaproponowanego schematu makrofagi mogą wydelać IL-12, która jest niezbędna dla syntezy $IFN\gamma$ i pobudzenia naiwnych limfocytów w kierunku profilu Th1, albo produkować IL-10, IL-4 i IL-13, dzięki którym stymulują odpowiedź typu Th2. W pierwszym wypadku makrofagi definiuje się jako M1, w drugim – jako M2. Fenotyp M1 zależy jest od $IFN\gamma$, IL-12 i IL-18. Komórki te wydelaają znaczne ilości cytokin prozapalnych oraz wykazują zmniejszoną zdolność fagocytarną pozostałości apoptotycznych. Fenotyp M2 pojawia się w odpowiedzi na IL-4, IL-10, IL-13, kompleksy immunologiczne, glukokortykoidy lub hormony sekosteroidowe (np. witamina D3) [24]. Ten typ aktywacji towarzyszy rozwojowi nowotworu, infekcjom pasożytniczym, miażdżycy lub naprawie centralnego układu nerwowego. Makrofagi M2 uczestniczą w procesie gojenia, usuwają martwe tkanki, aktywują fibroblasty, a także wspierają przebudowę tkanki podczas angiogenezy [19]. Wyróżniono trzy warianty polaryzacji M2: M2a (alternatywna aktywacja), M2b (aktywacja typu II; wrodzona aktywacja) i M2c (dezaktywacja) [27].

Różne badania wykazały, że makrofagi towarzyszące nowotworom (TAM) są często głównym składnikiem nacieku leukocytarnego wielu nowotworów. Stwierdzono, że ich liczba i status czynnościowy silnie koreluje z mediatorami obecnymi w mikrośrodowisku guza. Obecność czynników o charakterze immunosupresyjnym istotnie obniża ich naturalną aktywność przeciwnowotworową. We wczesnej fazie rozwoju guza mogą one przyjmować profil aktywacji typu M1, jednak w fazie zaawansowania nowotworu, TAM fenotypowo najbardziej upodabniają się do M2. Na tym etapie mogą one promować proliferację i rozprzestrzenianie się guza oraz formowanie przerzutów [28]. Makrofagi opłucnowe pobudzają limfocyty T do gromadzenia się w opłucnej i ekspansji klonalnej, jednak w wysiękach nowotworowych stwierdzono, że zwiększonej liczbie makrofagów towarzyszy obniżenie ekspresji TCR na limfocytach. Makrofagi izolowane z wysięków nowotworowych charakteryzują się upośledzoną aktywnością cytotoksyczną względem autologicznych komórek nowotworowych [29], natomiast poprzez różne, wydzielane mediatory mogą nawet chronić komórki różnych typów nowotworów przed apoptozą [30]. Ich profil aktywacji najbardziej odpowiada fenotypowi M2c. Obecność makrofagów w mikrośrodowisku nowotworu budzi nieprzerwanie duże zainteresowanie wielu badaczy. Podejmowane są próby eliminacji tych komórek z otoczenia guza bądź zmiany ich profilu aktywacji i ukierunkowania ich zaangażowania przeciw rozwijającemu się nowotworowi.

Prezentowana praca poglądowa ma istotny wkład w usystematyzowanie wiedzy dotyczącej makrofagów obecnych w tym szczególnym mikrośrodkowisku jakim jest nowotworowy wysięk opłucnowy.

- 3) **M. Kaczmarek**, M. Łagiedo, A. Masztalerz, M. Kozłowska, A. Nowicka, B. Brajer, H. Batura-Gabryel, J. Sikora. Concentrations of SP-A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non-small cell lung cancer. *Immunobiology*. 2018; 223(2): 200-209

Wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMP) stanowią ważny element złożonej sieci regulatorowej nieswoistej odpowiedzi układu odpornościowego. Są to różnego typu molekuly uwalniane z uszkodzonych komórek lub aktywnie wydzielane w stanach szoku komórkowego w celu pobudzenia wrodzonych mechanizmów obronnych i reperacyjnych. Z punktu widzenia czynnościowego DAMP stanowią ligandy różnego typu receptorów rozpoznających wzorce (*ang.* pattern recognition receptors; PRR), głównie receptorów Toll-podobnych (*ang.* Toll-like receptors; TLR) [31]. Wiele DAMP powiązано z karcynogenezą nowotworów różnego pochodzenia, ze szczególnym uwzględnieniem ich zaangażowania w rozwinięcie i utrzymywanie przewlekłego stanu zapalnego [32]. Stymulacja TLR potęguje lokalne wydzielanie mediatorów prozapalnych, które wzmagają uszkodzenie otaczających tkanek, w następstwie czego wzrasta ilość DAMP. Wysięki opłucnowe stanowią mikrośrodkowisko bogate w czynniki humoralne, zwłaszcza różnego typu DAMP uwalniane z komórek nekrotycznych. Białko A surfaktantu (*ang.* surfactant protein A; SP-A) oraz białko szoku cieplnego o masie 70 kDa (*ang.* heat shock protein 70; Hsp70) są ważnymi endogennymi regulatorami zaangażowanymi w odpowiedź immunologiczną w drogach oddechowych. Obydwa białka mają cechy DAMP i mogą wiązać się z TLR2 i TLR4, m.in. na powierzchni makrofagów, a ligacja SP-A lub Hsp70 z TLR pobudza komórki nowotworowe do wydzielania bogatego repertuaru cytokin prozapalnych [33, 34]. Stwierdzono, że wysokie stężenie Hsp70 może sprzyjać rozwojowi przerzutów i lekooporności. W niektórych typach nowotworów koreluje ono ze stopniem zaawansowania choroby oraz z krótszym całkowitym czasem przeżycia [35].

Celem prezentowanych badań było określenie roli SP-A i Hsp70 w rozwoju wysięków opłucnowych towarzyszących niedrobnokomórkowemu rakowi płuc, a także korelacji ich stężenia z obecnością makrofagów i wybranych mediatorów rozpuszczalnych w tym

mikrośrodowisku. Ocenie poddano 20 nowotworowych i 14 nienowotworowych wysięków opłucnowych. W każdej z prób zmierzono metodą ELISA poziom SP-A, Hsp70, IL-6, IL-18, G-CSF, M-CSF, SCF, SDF1 α i VEGF. Za pomocą cytometrii przepływowej określono odsetki i immunofenotyp makrofagów obecnych w badanych wysiękach, ze szczególnym uwzględnieniem profilów aktywacji M1 i M2. Metodą FACS oceniono również makrofagi pod względem ekspresji receptorów TLR2 i TLR4 oraz określono ekspresję genów kodujących te receptory (RT-PCR).

Uzyskane wyniki wskazały w wysiękach nowotworowych wyższe stężenie SP-A (na poziomie statystycznie istotnym) oraz niższe stężenie Hsp70 (bez istotności statystycznej). Stwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem obu białek. Jednocześnie potwierdzono wyższy odsetek komórek typu M2 w wysiękach nowotworowych. Badane makrofagi wykazywały ekspresję receptorów TLR2 i TLR4 zarówno na poziomie białka, jak i mRNA, co potwierdzało ich potencjalną wrażliwość na obecne w wysiękach odpowiadające im DAMP. Zaobserwowano także, że odsetek makrofagów M2 wzrastał wraz ze wzrastającym stężeniem SP-A i malał odwrotnie proporcjonalnie do stężenia Hsp70. Stężenie SP-A było wprost proporcjonalne do stężenia czynnika komórek macierzystych (*ang.* stem cell factor; SCF), którego wyższe stężenie na poziomie istotnym statystycznie obserwowano w wysiękach nowotworowych. Wyższe stężenie SCF i VEGF w wysiękach nowotworowych oraz ich korelacja z SP-A wskazuje na możliwy wpływ białka A surfaktantu na rozwój i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych, a także na udział w zwiększaniu objętości wysięku poprzez zmianę przepuszczalności błony opłucnej.

Praktycznym aspektem prezentowanej pracy było wykazanie przy pomocy oceny jakości klasyfikatora, czyli krzywej ROC (*ang.* Receiver Operating Characteristic), oraz modelu regresji logistycznej użyteczności oceny stężenia SP-A dla diagnostyki nowotworowych wysięków opłucnowych. Wykazano, że optymalny punkt odcięcia, powyżej którego stężenie SP-A wiąże się z obecnością wysięku nowotworowego wynosi 53,38 ng/ml. Miara trafności tego modelu, czyli pole pod wykresem krzywej ROC (*ang.* area under curve; AUC), wzrastała, gdy w badanym wysięku stężenie G-CSF było niższe niż 0,008 ng/ml. W świetle uzyskanych danych w prezentowanej pracy podkreślono znaczenie SP-A jako potencjalnego biomarkera dla wczesnej diagnostyki wysięków opłucnowych towarzyszących niedrobnokomórkowemu rakowi płuca i jego potencjalnego wykorzystania dla wsparcia klasycznych metod diagnostyki cytologicznej.

- 4) **M. Kaczmarek**, B. Rubis, M. Frydrychowicz, A. Nowicka, B. Brajer-Luftmann, M. Kozłowska, M. Lagiedo, H. Batura-Gabryel, J. Sikora. Pleural macrophages can promote or inhibit apoptosis of malignant cells via humoral mediators depending on intracellular signaling pathways. *Cancer Invest.* 2018; 36(5): 264-278.

doi: 10.1080/07357907.2018.1477158

Obecne w wysiękach makrofagi opłucnowe poddane szerokiej gamie oddziaływań, zarówno w bezpośrednim kontakcie z różnymi populacjami komórek, jak i pośrednio przy udziale licznych czynników rozpuszczalnych, same stają się ważnym modulatorem mikrośrodowiska. W warunkach patologicznych w opłucnej często stanowią ponad połowę wszystkich komórek obecnych w wysięku. O skomplikowanym charakterze oddziaływań makrofagów z mikrośrodowiskiem wysięku opłucnowego, w którym się znajdują przemawia fakt, że poprzez wpływ na cykl komórkowy oraz ekspresję białek regulujących apoptozę mogą one wzmacniać albo ograniczać rozwój i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych [30]. O tym jaki efekt makrofagi mogą wywołać decyduje splot różnych mechanizmów, z których wiele jest trudnych do przewidzenia. Problemy w ich precyzyjnym określeniu potęgują wzajemne oddziaływania zachodzące pomiędzy różnymi mediatorami międzykomórkowymi, takimi jak cytokiny, chemokiny oraz czynniki wzrostu, które mają charakter synergistyczny, addytywny, kaskadowy lub antagonistyczny. Czynniki rozpuszczalne wydzielane przez makrofagi cechuje plejotropia i redundancja, co dodatkowo wzmacnia wielokierunkową naturę oddziaływań tej populacji na komórki obecne w ich otoczeniu. Z drugiej strony, komórki różnych typów nowotworów wykazują odmienną wrażliwość na zewnątrzpo pochodne mediatory. Często w trakcie ekspansji nowotworu zmienia się repertuar receptorów ulegających ekspresji w obrębie jego komórek. Taka metamorfoza umożliwia komórkom nowotworowym ucieczkę spod nadzoru immunologicznego, a także adaptację do zmieniających się warunków w lokalizacji pierwotnej oraz tworzenie ognisk przerzutowych. W tym mechanizmie nowotwór wykorzystuje zarówno pętlę autokrynną, jak i oddziaływania parakrynnie z otaczającymi go komórkami tkanki macierzystej oraz układu odpornościowego. Stwierdzono, że mikrośrodowisko nowotworu bogate w immunosupresyjne mediatory polaryzuje aktywację obecnych w nim makrofagów w kierunku profilu M2 [36], a makrofagi izolowane z nowotworowych wysięków opłucnowych wykazują profil aktywacji podobny do M2. O tym, czy obecne

w mikrośrodowisku makrofagi wywołają efekt pro- lub antynowotworowy, decydują ostatecznie szlaki sygnalizacyjne aktywowane w cytoplazmie komórek nowotworowych [37, 38, 39].

Celem przeprowadzonego eksperymentu było ustalenie, czy makrofagi izolowane z wysięków opłucnowych mogą wpływać na aktywność pro- lub antyapoptotyczną komórek ustalonych linii ludzkich nowotworów poprzez różne szlaki sygnalizacyjne regulujące poziom ekspresji wybranych czynników transkrypcyjnych związanych ze stanem zapalnym. Do badań wykorzystano model *in vitro*, w którym komórki ustalonej linii raka płuc A549, raka jelita grubego HT29, linii ostrej białaczki promielocytarnej HL60 oraz ostrej białaczki z limfocytów T Jurkat hodowano w obecności mediów kondycjonowanych, uzyskanych z krótkoterminowej hodowli makrofagów izolowanych z wysięków opłucnowych. Wysięki opłucnowe uzyskano od 15 pacjentów z chorobą nowotworową oraz od 23 osób, u których nie zdiagnozowano nowotworu. Makrofagi separowano z wysięków wykorzystując ich właściwości adherentne i hodowano je w czasie 48 godzin. Po tym czasie z nad makrofagów zbierano nadsącze, które następnie mieszano w stosunku 1:1 ze świeżą pożywką RPMI-1640 suplementowaną 20mM HEPES, 10% FBS i 1% mieszaniną antybiotyków (100 U/ml penicyliny G, 100 µg/ml streptomycyny, 25 mg/ml amfoterycyny B), i w takiej formie już jako media kondycjonowane dodawano do hodowli komórek nowotworowych, które pozostawiano na 72 godziny w inkubatorze. Przy użyciu zestawów ELISA oraz cytometrycznych testów BD™ CBA Human Flex Set zmierzono w mediach kondycjonowanych stężenie TNF α , IL-2 oraz IL-6. Reakcję RT-PCR wykorzystano do analizy ekspresji genów kodujących poszczególne podjednostki receptorów dla badanych cytokin (*IL2RA*, *IL2RB*, *IL2RG*, *IL6R*, *IL6ST*, *TNFRSF1A* i *TNFRSF1B*). Aktywność enzymatyczną kaspazy 3 określono przy użyciu testu EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #2, natomiast stężenie czynników transkrypcyjnych NF κ B p50, NF κ B p65, c-Fos, CREB-1, ATF-2 i c-Rel testem TransFactor Profiling Kit – Inflammation 1.

W trakcie badania odnotowano w mediach kondycjonowanych wysokie stężenie IL-6, które znacznie przewyższało stężenie TNF α i IL-2. Wykorzystane w eksperymencie komórki ustalonych ludzkich nowotworów cechowała ekspresja mRNA dla wszystkich analizowanych podjednostek receptorów dla cytokin. Pod wpływem mediów kondycjonowanych średnia wartość aktywności kaspazy 3 wzrosła w komórkach linii A549 i HL60 i uległa obniżeniu w linii HT29 i Jurkat. Jednakże szczegółowa analiza wykazała, że poszczególne media

kondycjonowane wpływały na każdą z linii komórkowych w różny sposób. Komórki linii HL60 i Jurkat różniły się wzajemnie profilem ekspresji badanych czynników transkrypcyjnych, a także w różny sposób odpowiadały na zastosowane w eksperymencie media kondycjonowane. W komórkach linii HL60 odnotowano znaczne obniżenie ekspresji czynników NFκB p50, CREB-1 i ATF-2, natomiast w linii Jurkat ekspresja CREB-1 i ATF-2 po stymulacji mediami kondycjonowanymi wzrosła. W przypadku linii Jurkat wykazano odwrotnie proporcjonalną zależność (na poziomie istotnym statystycznie) pomiędzy ekspresją czynników transkrypcyjnych NFκB p65 i c-Rel a aktywnością enzymatyczną kaspazy 3. W rezultacie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że makrofagi izolowane z wysięków opłucnowych mogą hamować bądź inicjować apoptozę komórek nowotworowych poprzez wydzielane mediatory międzykomórkowe. Obserwowany efekt jest uwarunkowany składem wysięku, który może być różny w zależności od jego pochodzenia, nowotworowego lub nienowotworowego.

Podjęte w pracy badania mające na celu wskazanie aktywowanych szlaków sygnalizacyjnych oraz skomplikowanych zależności pomiędzy różnymi białkami w odpowiedzi na czynniki obecne w mikrośrodowisku rozwijającego się nowotworu leżą u podstaw nowych koncepcji walki z nowotworem. Wiedza na ten temat oraz umiejętność kontroli powyższych mechanizmów warunkuje możliwość stworzenia bardziej efektywnych programów terapii spersonalizowanej.

- 5) **M. Kaczmarek**, J. Maciejewska, Ł. Spychalski, M. Socha-Kozłowska, A. Nowicka, J. Sikora. Evaluation of neutrophil immunophenotype in the microenvironment of malignant pleural effusion. *Med. J Cell Biol.* 2018; 6(2): 66-74 doi: 10.2478/acb-2018-0012

Kluczowym składnikiem nieswoistej odpowiedzi układu odpornościowego są granulocyty. Wśród tej wysoce heterogennej populacji najliczniejszą grupę we krwi obwodowej stanowią granulocyty obojętnochłonne, tzw. neutrofile. Ich ilość, mobilność, reaktywność wobec zmieniających się warunków oraz wyjątkowa wszechstronność w zakresie oddziaływań efektorowych stawia je w pierwszej linii obrony organizmu przeciwko różnego typu zagrożeniom zewnątrz- i wewnątrzpochodnym. Aktywowane neutrofile, jako tzw. mikrofagi, zdolne są do bezpośredniej eliminacji patogenu poprzez jego fagocytozę, wykorzystując wewnętrzną i zewnętrzną aktywność cytobójczą uwarunkowaną mechanizmami zależnymi i niezależnymi od reaktywnych form tlenu, wydzielając liczne

mediatory rozpuszczalne, głównie cytokiny i chemokiny o silnym działaniu prozapalnym. W ostateczności, żeby nie dopuścić do kolonizacji organizmu przez bakterie, tworzą neutrofilową sieć zewnątrzkomórkową, (*ang.* neutrophil extracellular traps; NET), której wyrzut może się zakończyć dla neutrofila śmiercią samobójczą. W ostatnim czasie wykazano, że podobnie jak makrofagi, neutrofile mogą być istotnym pośrednikiem w procesie transformacji i rozprzestrzeniania się nowotworu oraz modulatorem odporności przeciwnowotworowej [40]. W zależności od czynników obecnych w otaczającym je mikrośrodku i ze względu na szczególną plastyczność, podobnie jak makrofagi, mogą rozwijać spolaryzowany wzór immunofenotypowy. Neutrofile wspierające aktywację limfocytów T cytotoksycznych oraz wydzielające czynniki hamujące rozwój nowotworu nazwano neutrofilami towarzyszącymi nowotworowi (*ang.* tumor-associated neutrophils; TAN) typu N1, natomiast wydzielające mediatory wzmacniające proliferację i inwazyjność nowotworu oraz angiogenezę – N2 [41]. W porównaniu z makrofagami, neutrofile nie stanowią licznej grupy komórek obecnej w nowotworowych wysiękach opłucnowych. Jednakże mediatory charakteryzujące aktywność wydzielniczą neutrofilów, takie jak CXCL8 (IL-8), są ważnym elementem kształtującym środowisko humoralne wysięków opłucnowych. Jak dotąd nie został dostatecznie dobrze poznany wpływ mikrośrodowiska nowotworowego wysięku opłucnowego na immunobiologię zawartych w nim neutrofilów.

Celem oznaczeń opisanych w publikacji załączonej do prezentowanego cyklu prac było określenie odsetka neutrofilów w wysięku opłucnowym i krwi obwodowej od pacjentów z wysiękiem opłucnowym towarzyszącym niedrobnokomórkowemu rakowi płuca. Przeanalizowano 37 nowotworowych i 23 nienowotworowe wysięki opłucnowe, od 34 pacjentów wraz z wysiękami opłucnowymi pozyskano również krew obwodową. Kontrolę stanowiły próbki krwi obwodowej od uczestników, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej. Status funkcjonalny badanych komórek określono na podstawie ekspresji wybranych cząsteczek zaangażowanych w chemotaksję oraz fagocytozę. Przy użyciu cytometru przepływowego ustalono odsetki neutrofilów wykazujących ekspresję selektyny L (CD62L) oraz podjednostek wchodzących w skład kompleksów integryn $\beta 2$: LFA-1, Mac-1 i LeuM5 (CD11a, CD11b, CD11c i CD18). Na podstawie średniej intensywności fluorescencji (*ang.* mean fluorescence intensity; MFI) określono także poziom ekspresji badanych cząsteczek. Testem ELISA zmierzono stężenie obecnej w wysiękach elastazy neutrofilowej, enzymu charakteryzującego aktywność czynnościową badanych komórek.

W badanych próbkach wysięków opłucnowych stwierdzono obecność neutrofilów, a średni odsetek neutrofilów obecnych we krwi obwodowej pacjentów z wysiękami opłucnowymi przewyższał średni odsetek tych komórek w grupie kontrolnej. Pod względem poziomu ekspresji cząsteczek CD11b oraz CD18, neutrofile obecne w wysiękach opłucnowych znacznie przewyższały neutrofile w próbkach krwi obwodowej chorych i w grupie kontrolnej. Na neutrofilach z wysięków opłucnowych stwierdzono również wyższą ekspresję cząsteczki CD11a w stosunku do neutrofilów we krwi obwodowej pacjentów z wysiękami. Ocena stężenia elastazy neutrofilowej pozwoliła stwierdzić zależność wprost proporcjonalną pomiędzy badanym czynnikiem a ilością neutrofilów obecnych w wysiękach.

Zaprezentowane badania potwierdziły zmienność funkcjonalną neutrofilów warunkowaną mikrośrodowiskiem, w którym się znajdują. Obserwowana plastyczność pozwala wskazać granulocyty obojętnochłonne jako jeden z celów terapii przeciwnowotworowej. Immunomodulacja neutrofilów polegająca na próbie przywrócenia naturalnych dla tej populacji właściwości przeciwnowotworowych umożliwiłaby opracowanie nowych schematów immunoterapeutycznych. W razie niemożliwości przeprogramowania tej krótkowiecznej populacji komórek, innym rozwiązaniem może być ich eliminacja z otoczenia komórek nowotworowych. Jest to szczególnie istotne w świetle ostatnich obserwacji, w których wskazano, że TAN obecne w otoczeniu niektórych nowotworów mogą rekrutować makrofagi TAM oraz limfocyty Treg, a także negatywnie wpływać na skuteczność terapii przeciwnowotworowej [42].

6) J. Budna, **M. Kaczmarek**, J. Sikora: Znaczenie komórek T regulatorowych w rozwoju tolerancji na nowotwór. *Postepy Biol. Kom.* 2011; 38(2):283-295

Drugą pracą poglądową wchodzącą w skład cyklu publikacji prezentowanego osiągnięcia naukowego jest artykuł dotyczący badań immunofenotypu i różnych subpopulacji limfocytów T regulatorowych oraz fizjologicznych i patologicznych aspektów związanych z ich biologią. W pracy zebrano dostępne w literaturze światowej informacje obejmujące swym zakresem zagadnienie jakim jest znaczenie komórek Treg w rozwoju tolerancji wobec rozwijającego się nowotworu. W sposób szczególny została podkreślona rola mechanizmów komórkowych i molekularnych, które komórki Treg wykorzystują w celu supresji przeciwnowotworowej odpowiedzi układu odpornościowego. Dyskusji poddano również

problem immunosupresyjnego zaangażowania komórek Treg w mikrośrodowisku nowotworu w świetle skuteczności nowych metod terapii przeciwnowotworowych.

Obok naturalnych limfocytów T regulatorowych charakteryzujących się immunofenotypem CD4+/CD25+/FoxP3+, które tak jak inne limfocyty T dojrzewają w grasicy, wyróżniono liczne grupy Treg, które pod wpływem czynników obecnych w mikrośrodowisku uzyskują silnie immunosupresyjny stan czynnościowy. Mediatorami, które indukują regulatorowy fenotyp tych limfocytów są głównie IL-10 i TGFβ, ale także IL-4 i IL-13, czyli cytokiny, które charakteryzuje silny potencjał supresyjny. W celu kontroli procesów efektorowych limfocyty Treg wykorzystują zarówno mechanizmy humoralne, jak i komórkowe. Pośród czynników rozpuszczalnych najważniejszymi są wspomniane wcześniej cytokiny blokujące, takie jak IL-10 i TGFβ oraz IL-35. Jednakże podobnie jak komórki NK czy cytotoksyczne limfocyty T, Treg mogą w celu supresji wykorzystywać sekrecyjno-membranolityczny mechanizm cytotoksyczności zależny od granzymów i perforyn, a także mechanizm receptorowy zależny od interakcji pomiędzy receptorami i odpowiadającymi im ligandami, np. FasL-Fas oraz TRAIL-DR5. Innym ważnym sposobem oddziaływania Treg na odpowiedź immunologiczną jest ograniczenie zdolności komórek pomocniczych do aktywacji limfocytów T efektorowych.

Zaprezentowana praca poglądowa stała się podstawą teoretyczną dla stworzenia koncepcji badawczych i przeprowadzenia analiz skupionych na tej wyjątkowej populacji limfocytów obecnej również w wysiękach opłucnowych.

7) **J. Budna*, M. Kaczmarek***, A. Kolečka-Bednarczyk, Ł. Spychalski, P. Zawierucha, J. Goździk-Spychalska, H. Batura-Gabryel, J. Sikora. Enhanced suppressive activity of regulatory T cells in the microenvironment of malignant pleural effusions. *J Immunol Res.* 2018; 2018:9876014. doi: 10.1155/2018/9876014

Mediowana przez nowotwór odpowiedź immunosupresyjna osłabia aktywność czynnościową efektorowych limfocytów T. W skrajnych wypadkach limfocyty towarzyszące nowotworom mogą być eliminowane z otoczenia guza bezpośrednio przez komórki nowotworowe [43, 44]. Najważniejszym mechanizmem unikania nadzoru immunologicznego przez guz, zwłaszcza w zaawansowanej fazie rozwoju, jest immunosupresja zależna od regulatorowych limfocytów T [45]. Treg stanowią 5–10% populacji pomocniczych limfocytów T. Pod względem immunofenotypu definiowane są na podstawie ekspresji

antygenów $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ [46]. W warunkach fizjologicznych Treg są niezbędne w mechanizmie tolerancji, w którym utrzymują układ odpornościowy w stanie równowagi. Ich aktywność immunosupresyjna wiąże się z wydzielanymi przez te komórki IL-10 i TGF β . Zarówno IL-10, jak i TGF β blokują aktywność limfocytów T efektorowych oraz wspierają rozwój nowotworu. Ponadto TGF β aktywuje czynnik transkrypcyjny FoxP3, kluczowy dla immunosupresyjnej aktywności Treg. W wysiękach nienowotworowych istotną rolę w syntezie TGF β odgrywają komórki mezotelialne opłucnej, podczas gdy w wysiękach nowotworowych mediator ten wydzielany jest głównie przez komórki nowotworowe [47].

Celem prezentowanej publikacji była ocena obecności Treg w nowotworowych i nienowotworowych wysiękach opłucnowych, z uwzględnieniem stężenia IL-10 i TGF β . Ponadto w limfocytach Treg separowanych z wysięków opłucnowych analizowano ekspresję mRNA dla cząsteczek FoxP3, CTLA-4, CD28 i GITR oraz białka FoxP3. Przebadano 30 próbek wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe; 21 wysięków niezawierających komórek nowotworowych od pacjentów z chorobą nowotworową i 25 wysięków nienowotworowych. Ocenę immunofenotypu przeprowadzono techniką FACS. Stężenie IL-10 i TGF β zmierzono testami ELISA. Komórki Treg wyizolowano z wysięków metodą separacji magnetycznej. Za pomocą reakcji RT-qPCR zmierzono poziom ekspresji genów *FOXP3*, *CD28*, *GITR*, *CTLA-4*.

W wyniku badań stwierdzono wyższą częstość na poziomie istotnym statystycznie występowania komórek $CD4^+/CD25^+/FoxP3^+$ w wysiękach opłucnowych zawierających komórki nowotworowe. Wskazuje to możliwy wpływ komórek nowotworowych na zwiększoną proliferację lub migrację komórek Treg do mikrośrodowiska nowotworowego wysięku opłucnowego w odpowiedzi na obecne w nim czynniki regulatorowe. Zaobserwowany wzrost względnej ekspresji genów *FOXP3*, *CD28*, *CTLA-4* i *GITR* w komórkach Treg w porównaniu z ekspresją w komórkach nieaktywowanych limfocytów T wiąże się ze wzmocnioną aktywnością immunosupresyjną Treg obecnych w mikrośrodowisku nowotworowych wysięków opłucnowych.

Zaprezentowany cykl publikacji, stanowiący podstawę osiągnięcia naukowego, obejmował szeroko zakrojone badania, których celem była ocena wybranych mechanizmów regulujących ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego. W trakcie analiz wykorzystano modele *in vitro* (hodowle ustalonych linii ludzkich nowotworów) oraz materiał kliniczny pochodzący od chorych, u których w trakcie choroby nowotworowej pojawił się wysięk w jamie opłucnej, dla których kontrolę stanowiły wysięki opłucnowe o etiologii nienowotworowej. Zastosowanie licznych technik analitycznych, obejmujących metody oceny komórek, białek oraz ekspresji genów, umożliwiło badanie głównych wykładników ucieczki nowotworu zależnych od utraty cząsteczek prezentujących antygen. Określono udział licznej grupy rozpuszczalnych mediatorów regulujących proces transformacji nowotworowej, uczestniczących w budowie lokalnej i ustrojowej immunosupresji oraz wspierających rozwój i rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych w trakcie progresji choroby, a także oceniono udział makrofagów towarzyszących nowotworom (TAM), neutrofilów towarzyszących nowotworom (TAN) i limfocytów T regulatorowych (Treg) w mikrośrodku nowotworu. Obraz, jaki się wyłania na podstawie uzyskanych wyników, potwierdza wielopoziomowy charakter zależności pomiędzy komórkami układu odpornościowego a nowotworem. Istotnym wkładem prezentowanych prac w rozwój wiedzy w zakresie immunologii nowotworów jest często pionierski oraz użyteczny charakter badań.

Literatura:

1. Malmberg KJ, Ljunggren HG. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):16-31
2. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8
3. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60
4. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 2007 May;121(1):1-14
5. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):293-9
6. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene.* 2016 Nov 17;35(46):5931-5941
7. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther.* 2005 Sep;4(9):924-33
8. Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med.* 2016 Jun;279(6):541-62

9. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):567-8
10. Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Nov;56(11):1687-700
11. Ogino T, Shigyo H, Ishii H, Katayama A, Miyokawa N, Harabuchi Y et al. HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Res*. 2006 Sep 15;66(18):9281-9
12. Esteban F, Redondo M, Delgado M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. MHC class I antigens and tumour-infiltrating leucocytes in laryngeal cancer: long-term follow-up. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(11):1801-4
13. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997 Feb;18(2):89-95
14. Houston AM, Michael-Robinson JM, Walsh MD, Cummings MC, Ryan AE, Lincoln D et al. The "Fas counterattack" is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability. *Hum Pathol*. 2008 Feb;39(2):243-50
15. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol*. 2012 Aug;22(4):327-34
16. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol*. 2018 Feb;19(2):108-119
17. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):315-22
18. Zou JM, Qin J, Li YC, Wang Y, Li D, Shu Y et al. IL-35 induces N2 phenotype of neutrophils to promote tumor growth. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):33501-33514
19. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jan;3(1):23-35
20. Shuey K, Payne Y. Malignant pleural effusion. *Clin J Oncol Nurs*. 2005 Oct;9(5):529-32
21. Kassir J, Klominek J, Kohn EC. Tumor microenvironment: what can effusions teach us? *Diagn Cytopathol*. 2005 Nov;33(5):316-9
22. Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, Spatafora M, Toews GB. Mononuclear cells in exudative malignant pleural effusions. Characterization of pleural phagocytic cells. *Chest*. 1994;106(4):1042-9
23. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:453-61
24. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003 Feb;73(2):209-12
25. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992 Jul;13(7):265-70
26. Fenton KN, Richardson JD. Diagnosis and management of malignant pleural effusions. *Am J Surg*. 1995 Jul;170(1):69-74
27. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):677-86
28. Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med*. 2001 Mar 19;193(6):F23-6

29. Yanagawa E, Uchida A, Moore M, Micksche M. Autologous tumor killing and natural cytotoxic activity of tumor-associated macrophages in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1985;19(3):163-7
30. Kaczmarek M, Frydrychowicz M, Nowicka A, Kozłowska M, Batura-Gabryel H, Sikora J et al. Influence of pleural macrophages on proliferative activity and apoptosis regulating proteins of malignant cells. *J Physiol Pharmacol.* 2008 Dec;59 Suppl 6:321-30
31. Huang J, Xie Y, Sun X, Zeh HJ, 3rd, Kang R, Lotze MT et al. DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing Res Rev.* 2015 Nov;24(Pt A):3-16
32. Lagiedo M, Sikora J, Kaczmarek M. Damage-Associated Molecular Patterns in the Course of Lung Cancer--A Review. *Scand J Immunol.* 2015 Aug;82(2):95-101
33. Kremlev SG, Umstead TM, Phelps DS. Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP-1. *Am J Physiol.* 1997 May;272(5 Pt 1):L996-1004
34. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002 Apr 26;277(17):15028-34
35. Syrigos KN, Harrington KJ, Karayiannakis AJ, Sekara E, Chatziyianni E, Syrigou EI et al. Clinical significance of heat shock protein-70 expression in bladder cancer. *Urology.* 2003 Mar;61(3):677-80
36. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006;42:717-727.
37. Iriki T, Ohnishi K, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Pan C, Ikeda K, Mori T, Suzuki M, Ichiyasu H, Kohroggi H, Takeya M, Komohara Y. The cell-cell interaction between tumor-associated macrophages and small cell lung cancer cells is involved in tumor progression via STAT3 activation. *Lung Cancer.* 2017 Apr;106:22-32
38. Wang VY, Li Y, Kim D, Zhong X, Du Q, Ghassemian M, Ghosh G. Bcl3 Phosphorylation by Akt, Erk2, and IKK Is Required for Its Transcriptional Activity. *Mol Cell.* 2017 Aug 3;67(3):484-497.e5
39. Nguyen DP, Li J, Yadav SS, Tewari AK. Recent insights into NF- κ B signalling pathways and the link between inflammation and prostate cancer. *BJU Int.* 2014 Aug;114(2):168-76
40. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jul 25;11(8):519-31
41. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol.* 2013 Jul;228(7):1404-12
42. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Huang XW, Wang Z, Chen EB, Fan J, Cao Y, Dai Z, Zhou J. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology.* 2016 Jun;150(7):1646-1658.e17
43. Sikora J, Zeromski J. Expression of TCR-zeta chain and apoptosis in subpopulations of tumor-associated lymphocytes (TALs) from malignant pleural effusions. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002;40(4):347-51
44. Sikora J, Dworacki G, Zeromski J. Expression of TCR zeta chain of tumor associated lymphocytes from malignant pleural effusions. *Adv Exp Med Biol.* 2001;495:325-9
45. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016 Aug;28(8):401-9
46. Li P, Liu C, Yu Z, Wu M. New Insights into Regulatory T Cells: Exosome- and Non-Coding RNA-Mediated Regulation of Homeostasis and Resident Treg Cells. *Frontiers in immunology.* 2016;7:574
47. Cheng D, Lee YC, Rogers JT, Perkett EA, Moyers JP, Rodriguez RM et al. Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest.* 2000 Dec;118(6):1747-53

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

W trakcie ponad dwudziestoletniej pracy naukowej uczestniczyłem w licznych projektach naukowych (łącznie 38 projektów badawczych), wielokrotnie współpracowałem z jednostkami naukowymi Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, a także z zewnętrznymi instytucjami naukowymi oraz przedsiębiorstwami prywatnymi (zał. 3). Wykształcenie biotechnologiczne znacząco wpłynęło na rozwój i doskonalenie moich umiejętności w zakresie technik analitycznych: od hodowli komórkowych *in vitro*, poprzez cytometrię przepływową, techniki immunochemiczne, do metod biologii molekularnej. Efektem moich działań jest 55 publikacji w formie prac oryginalnych oraz 12 poglądowych.

W najbardziej syntetycznym ujęciu prace niewłączone do cyklu stanowiącego podstawę prezentowanego osiągnięcia naukowego obejmują sześć obszarów wiedzy. Głównym nurtem moich zainteresowań naukowo-badawczych jest immunologia nowotworów, czego wyrazem jest obszerny zbiór publikacji związanych z tym tematem. Kolejnym obszarem mojego zaangażowania badawczego jest udział w poszukiwaniu i charakterystyce różnych związków będących wynikiem syntezy chemicznej lub substancji pochodzenia naturalnego, które docelowo mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii i profilaktyce nowotworów. Następny kierunek badań obejmuje prace poświęcone zaangażowaniu różnych elementów układu odpornościowego w mechanizmach towarzyszących infekcjom wirusami hepatotropowymi w przebiegu wirusowych zakażeń wątroby (HBV i HCV). Czwarta grupa artykułów podejmuje tematykę przewlekłych chorób, m.in. POChP, cukrzycę typu I, wrzodziejące zapalenie jelit czy przewlekłe zapalenie zatok przynosowych, którym towarzyszy stan zapalny angażujący różne składowe układu odpornościowego. Najnowszy cykl prac koncentruje się na zagadnieniu biozgodności różnego typu materiałów projektowanych jako materiały zastępcze lub służące regeneracji tkanek i narządów. Chronologicznie najwcześniej podejmowane przeze mnie badania skupiały się na analizie molekularnej genu *CFTR* w przypadkach bezpłodności męskiej.

1) Immunologia nowotworów

Od momentu rozpoczęcia pracy zawodowej po uzyskaniu tytułu magistra inżyniera byłem związany z Katedrą i Zakładem Immunologii ówczesnej Akademii Medycznej w Poznaniu kierowaną przez prof. dra hab. Jana Żeromskiego, która z czasem uzyskała status Katedry i Zakładu Immunologii Klinicznej w ramach Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Obecnie Zakład Immunologii kierowany przez prof. dra hab. Jana Sikorę mieści się w strukturze Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, której kierownikiem jest prof. dr hab. Grzegorz Dworacki. Od początku moje główne zainteresowania badawcze były skupione wokół zagadnień związanych z tematyką mikrośrodowiska nowotworu. Szczególnym celem analiz stała się ocena aktywności nowotworu upośledzającej funkcjonowanie układu immunologicznego. Ważnym doniesieniem dla dalszego rozwoju zainteresowań w tym obszarze tematycznym było opisanie rozpuszczalnych mediatorów zaangażowanych w mechanizmy immunosupresji zależnej od nowotworu na przykładzie nowotworowego wysięku opłucnowego [**Cancer Detect Prev. 2004; 28(5): 325-30**]. Była to pierwsza praca w moim dorobku naukowym, która podejmowała problematykę nowotworowego wysięku opłucnowego. Artykuł powstał w ramach grantu KBN nr **4 P05B 095 16**. Wynikiem badań było stwierdzenie w środowisku nowotworowego wysięku opłucnowego znamienne wyższego stężenia cytokin o charakterze immunosupresyjnym (IL-10 i TGFβ) oraz rozpuszczalnej postaci FasL (*ang.* soluble FasL; sFasL), a ponadto wykazanie odwrotnie proporcjonalnej zależności pomiędzy stężeniem sFasL a ekspresją łańcucha ζ (zeta) kompleksu TCR-CD3 limfocytów T. Limfocyty T obecne w mikrośrodowisku nowotworowego wysięku opłucnowego z obniżoną ekspresją podjednostki CD3ζ charakteryzowały się wyższą podatnością na apoptozę.

Dalsze prace prowadzone nad środowiskiem wysięków opłucnowych przyniosły odkrycie zjawiska, w którym makrofagi opłucnowe poprzez wydzielane czynniki humoralne mogą chronić komórki nowotworowe przed apoptozą [**J Physiol Pharmacol. 2008; 59 Suppl 6: 321-30**]. Opublikowane wyniki łączyły się z tematem mojej dysertacji doktorskiej. Badania zostały wykonane w ramach grantu promotorskiego KBN nr **N402 05832/1792**, którego byłem głównym wykonawcą. W związku z nielicznymi w tamtym czasie doniesieniami w ogólnodostępnej literaturze światowej podjęty temat interakcji pomiędzy makrofagami a komórkami nowotworowymi w wysiękach opłucnowych za pomocą

mediatorów rozpuszczalnych miał charakter pionierski. Celem badań była ocena wpływu mediów kondycjonowanych uzyskanych w trakcie krótkoterminowych hodowli *in vitro* makrofagów separowanych z wysięków opłucnowych na wybrane białka pro- i antyapoptotyczne w komórkach ustalonych linii ludzkich nowotworów. W tym celu został stworzony model *in vitro*, za pomocą którego zbadano apoptozę, aktywność proliferacyjną oraz ekspresję białka Fas, Bcl2, kaspazy 3 i surwiwiny w komórkach nowotworowych hodowanych w mediach kondycjonowanych.

Kolejne badania dotyczące zagadnienia immunosupresji zależnej od obecnych w mikrośrodku nowotworu komórek układu odpornościowego, których aktywność sprzyja ucieczce nowotworu spod nadzoru immunologicznego, obejmowały szeroko zakrojoną ocenę limfocytów Treg. Praca oryginalna, która znalazła się poza głównym cyklem będącym podstawą osiągnięcia, poświęcona jest biologii tej wyjątkowej populacji limfocytów T [**Immunobiology. 2017; 222(3): 499-505**]. Praca, w której jestem autorem do korespondencji, została wykonana w ramach grantu KBN nr **N N402 4288 39**. Na podstawie 76 próbek wysięków opłucnowych oceniono częstość występowania Treg w środowisku nowotworowym i nienowotworowym, a także przeanalizowano związek pomiędzy odsetkiem tej populacji w wysiękach a progresją choroby. W trakcie badań stwierdzono wyższy odsetek Treg w wysiękach nowotworowych, któremu towarzyszyło obniżenie liczby limfocytów T efektorowych. Częstość Treg w wysiękach zawierających komórki nowotworowe korelowała z postępem choroby nowotworowej oraz, zgodnie z analizą krzywej Kaplana-Meiera, wpływała negatywnie na czas przeżycia pacjentów. Uzyskane rezultaty potwierdziły ważną pozycję, jaką zajmują Treg w sieci immunosupresyjnej rozwijanej w trakcie ekspansji nowotworu w mikrośrodku wysięku opłucnowego.

Kolejne trzy publikacje w zakresie omawianego obszaru badań związanego z immunologią nowotworów dotyczyły niezwykle interesującego zagadnienia jakim jest udział receptorów TLR i ich ligandów pochodzenia endogennego (DAMP) w mikrośrodku nowotworu [**Cancer Microenviron. 2008; 1(1): 37-42; Folia Histochem Cytobiol. 2010; 48(4): 624-31; Scand J Immunol. 2015; 82(2): 95-101**]. W związku z doniesieniami opisującymi obecność TLR w obrębie ludzkich komórek nowotworowych podjęto działania badawcze finansowane z programu KBN nr **N N401 1833 33** mające na celu eksperymentalną weryfikację zaprezentowanego problemu. Pierwsza praca zawiera przegląd danych zawartych w literaturze przedmiotu, obejmujący opis struktury i poznanych funkcji

receptorów TLR. Szczególny akcent położono na informacje dotyczące wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału, mediowanej przez kinazy, takie jak IRAK1/4 czy MAPK, oraz białka adaptorowe, np. MD-2, MyD88 czy TRIF, które inicjują aktywność czynników transkrypcyjnych NF- κ B, AP-1 lub IRF. Od tego, który szlak cytoplazmatyczny zostanie pobudzony, zależy kierunek aktywacji komórki. Stwierdzono, że TLR prezentowane przez komórki nowotworowe mogą hamować postęp nowotworu. Zaprezentowano również doniesienia, w których powiązано obecność bakterii w mikrośrodkowisku nowotworu z promocją guza poprzez zależne od aktywacji TLR wytwarzanie immunosupresyjnych cytokin, takich jak TGF β , i rozwinięcie oporności na apoptozę indukowaną przez TNF α lub TRAIL. Opisano także potencjalne kierunki rozwoju immunoterapii nowotworów z wykorzystaniem wybranych TLR, np. TLR9, i ich syntetycznych agonistów. Zebrane wiadomości stanowiły podstawę teoretyczną pracy oryginalnej, w której sześć linii komórkowych ludzkich raków krtani (PCI-4B, PCI-19, PCI-37A, PCI-37B, UT35, Hep2) poddano analizie immunohistochemicznej, molekularnej (RT-PCR) i funkcjonalnej w aspekcie ekspresji dziesięciu receptorów TLR (TLR1-10). Testy czynnościowe wykonano z użyciem ośmiu ligandów (LPS – *P. gingivalis*; LPS – *E. coli*; LTA-SA; Poli(I:C); Flagellin; Imiquimod; ssPolyU/LyoVecTM; ODN – CpG) specyficznych dla siedmiu badanych TLR. Badanie wykazało, że testowane linie komórkowe różniły się między sobą w zakresie syntezy poszczególnych receptorów TLR. Wyniki RT-PCR ujawniły mRNA dla większości badanych TLR, poza TLR3 w linii PCI-37A. W trakcie oceny cytometrycznej wykazano, że komórki hodowane bez obecności ligandów charakteryzowały się wyższą ekspresją cytoplazmatyczną badanych TLR. Dodatek ligandów zmniejszał udział cytoplazmatyczny badanych receptorów i zwiększał ich obecność w obrębie błony komórkowej. W związku z obserwowaną wysoką ekspresją TLR w komórkach pochodzenia przerzutowego stwierdzono, że wzrost ekspresji TLR sprzyja rozwojowi guza. Ostatnia publikacja poświęcona receptorom TLR i ich ligandom dawała przegląd źródeł literaturowych związanych z cząsteczkami DAMP i ich oddziaływaniami w mikrośrodkowisku raka płuca. Praca ta powstała przy wsparciu projektów KBN nr **N N402 6847 40** i studenckiego UMP nr **502-05-01127188-50710**. Pomimo że DAMP są ważnymi mediatorami uczestniczącymi w procesach naprawczych tkanek, wzrasta ilość doniesień literaturowych, w których przytaczane są dowody na to, że poprzez niekontrolowaną aktywację TLR przyczyniają się do rozwoju różnych stanów patologicznych. W artykule zaprezentowano wybrane DAMP, takie jak rodzina białek Hsp, S100, HMGB1,

heparanaza oraz SP-A, które poprzez odpowiadające im TLR wykazują negatywny lub pozytywny wpływ na rozwój i rozprzestrzenianie się raka płuca. Zagadnienia opisane w publikacji, szczególnie udział SP-A i Hsp70 w mikrośrodowisku raka płuca, stały się podstawą pracy oryginalnej, która stanowi część osiągnięcia naukowego opisanego w głównej części tego autoreferatu. Natomiast aspekt funkcjonalny aktywności SP-A poprzez receptory TLR jest obecnie badany w modelu *in vitro*, będącym podstawą pracy doktorskiej, której jestem promotorem pomocniczym.

Kolejny artykuł, którego jestem pomysłodawcą i autorem seniorem, to praca poglądowa poświęcona molekularnym aspektom pluripotencji komórek nowotworowych [Tumour Biol. 2016; 37(4):4241-9]. Publikacja była częścią realizacji projektu studenckiego UMP nr 502-05-01127188-50620. Szczegółowy przegląd wybranych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za utrzymywanie macierzystego charakteru komórek obejmował białka Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28 oraz Bmi1. Od momentu, gdy stwierdzono, że czynniki pluripotencji odgrywają kluczową rolę w nabieraniu i utrzymywaniu przez komórki nowotworowe cech komórek macierzystych (*ang.* cancer stem cells; CSC), zagadnienie to jest intensywnie badane. Do tej pory wykazano, że ekspresja czynników transkrypcyjnych związanych z pluripotencją wiąże się ze złym rokowaniem oraz znacznie krótszym czasem przeżycia, a także ze zwiększonym stopniem złośliwości histologicznej i zaawansowania klinicznego guza. W związku z odkryciem komórek CSC pojawiły się całkowicie nowe hipotezy tłumaczące powstawanie nowotworu.

W oparciu o dane literaturowe odnoszące się do strategii ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego polegającej na unikaniu rozpoznawania przez komórki efektorowe układu odpornościowego poprzez utrwalenie mutacji w obrębie genów kodujących cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej oraz nieprawidłową ekspresję i funkcje białek uczestniczących w wewnątrzkomórkowym przetwarzaniu i transporcie peptydów, powstała praca, w trakcie której oceniono ekspresję cząsteczek MHC klasy I oraz genów kodujących białka TAP1 i TAP2 w przypadku 20 ustalonych linii komórkowych ludzkich nowotworów [Folia Histochem Cytobiol. 2007; 45(3): 205-14]. Przeprowadzone obserwacje potwierdziły różnorodną immunogenność w obrębie odmiennych typów nowotworów. W trakcie oceny immunocytochemicznej wykonano komputerową analizę morfometryczną połączoną z przestrzenną wizualizacją. Zastosowane narzędzie analityczne cechowała nowatorskość, a sama metoda badawcza, miała charakter pionierski. Ponadto,

analiza danych cytometrycznych została poszerzona o próbę parametryzacji wartości intensywności fluorescencji (MFI). Przy zastosowaniu algorytmu matematycznego opisano relację między wartościami MFI odczytywanymi dla badanej próbki i kontroli izotypowej. Opisany wzorem stosunek pomiędzy wartościami MFI, nazwany względną intensywnością fluorescencji (*ang.* relative fluorescence intensity; RFI), miał na celu uzyskanie wartości niezależnej od warunków, w których był wykonywany odczyt.

Ostatnim artykułem wchodzącym w skład prezentowanego zakresu zainteresowań naukowo-badawczych dotyczących immunologii nowotworu jest praca oryginalna poświęcona badaniom ekspresji receptorów dla IL-10 w mikrośrodkowisku guzów mózgu [**Anticancer Res. 2017; 37(10): 5777-5783**]. Pomysł kierunku badań cytometrycznych i ich ostateczna analiza mojego autorstwa stały się podstawą odkrycia, że leukocyty obecne w mikrośrodkowisku pierwotnych guzów mózgu wykazują znacznie wyższą ekspresję obu podjednostek receptora dla IL-10 (α i β) w porównaniu z leukocytami w otoczeniu guzów przerzutowych. Wyniki oceny cytometrycznej zostały potwierdzone testami immunohistochemicznymi na skrawkach tkankowych. W związku z tym, że prezentowane badanie miało wstępny charakter, rola podjednostek IL-10R wymaga dokładniejszego wyjaśnienia. Jednak na obecnym etapie badań można wskazać przydatność oceny komórek IL10R⁺/CD45⁺ jako pomocniczego markera w różnicowaniu pierwotnych i przerzutowych guzów mózgu.

Ze względu na to, że immunologia nowotworów stanowi główny obszar moich wieloletnich zainteresowań naukowych, spośród 67 pełnotekstowych publikacji (oryginalnych i poglądowych) wchodzących w skład całego dorobku, 16 prac, razem z pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia, czyli prawie 1/4, poświęconych jest temu zagadnieniu. Obecnie w różnych wydawnictwach na recenzje lub decyzje edytorów czekają kolejne dwa artykuły poświęcone tematowi immunologii nowotworów.

Łączna liczba publikacji: 9

Łączny wskaźnik Impact Factor ISI: 13.626

Łączna punktacja MNiSW: 122.000

Łączna liczba cytowań wg Web of Science: 84

2) Związki chemiczne i substancje pochodzenia naturalnego, przeznaczone do terapii i profilaktyki nowotworów

Moje wieloletnie doświadczenie w zakresie cytometrii przepływowej, zarówno w aspekcie preparatyki, jak i analizy, zaowocowało współpracą z wieloma jednostkami naukowymi. Od dziesięciu lat istotnym obszarem moich zainteresowań naukowo-badawczych jest ocena efektów oddziaływania biologicznego różnych nowo zsyntetyzowanych związków chemicznych oraz substancji pochodzenia naturalnego na komórki nowotworowe. Opisywane eksperymenty prowadzone są w ramach szerokich, często interdyscyplinarnych zespołów badawczych. Mój udział w tych grupach obejmuje głównie analizę funkcjonalną komórek hodowanych w różnych modelach *in vitro* w zakresie cyklu komórkowego, apoptozy i nekrozy, a także innych procesów metabolicznych istotnych z punktu widzenia żywotności komórki, np. oporności wielolekowej (*ang.* multi-drug resistance; MDR). Pierwsze publikacje w moim dorobku w tej dziedzinie opisywały oddziaływanie fitosteroli na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych oraz komórki ludzkich nowotworów. Podejmowały również próbę określenia podłoża chorób związanych z metabolizmem tych substancji pochodzenia roślinnego [**Br J Nutr.** 2008; 100(6): 1183-91; **Med Chem.** 2010; 6(4): 184-90].

Celem kolejnego badania była identyfikacja mechanizmu regulacji ekspresji i aktywności telomerazy pod wpływem pochodnych oksydacji papaweryny w komórkach ustalonej linii ludzkiego raka piersi. Wynikiem przeprowadzonych eksperymentów było wykazanie selektywnej zdolności badanych związków do hamowania aktywności telomerazy [**Invest New Drugs.** 2009; 27(4): 289-96]. Temat aktywności telomerazy został podjęty ponownie w aspekcie analizy molekularnego wyciszania genów kodujących główne podjednostki kompleksu telomerazy. W konkluzji przeprowadzonej analizy stwierdzono, że obniżenie ekspresji podjednostki TERT inicjuje apoptozę, która eliminuje komórki nowotworowe [**Mol Biol Rep.** 2013; 40(8): 4995-5004].

Następne dwa badania posłużyły scharakteryzowaniu aktywności biologicznej syntetycznych pochodnych kwasu oleanolowego (*ang.* oleanolic acid; OA). Wykazano, że testowane analogi OA, HIMOXOL i DIOXOL, istotnie hamowały oporność wielolekową komórek badanych linii komórkowych ludzkiej ostrej białaczki limfoblastycznej,

a także indukowały apoptozę i autofagię komórek linii ludzkiego raka piersi MDA-MD-231 [Pharmacol Rep. 2011; 63(6): 1500-17; Chem Biol Interact. 2014; 208: 47-57].

Inną grupą intensywnie studiowanych związków były syntetyczne analogi resweratrolu. Stwierdzono, że te polifenolowe pochodne węglowodorów wielopierścieniowych hamowały wzrost komórek raka jajnika, zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, indukowały wzrost ekspresji genów proapoptotycznych, zatrzymywały cykl komórkowy w fazie G2/M i aktywowały wewnątrzkomórkowy szlak apoptotyczny. Podobny efekt wywoływał sam resweratrol, jego pochodne oraz kwas taninowy wobec hodowanych *in vitro* komórek ludzkiego i szczurzego glejaka [Toxicol Appl Pharmacol. 2012; 263(1): 53-60; Sci Rep. 2016; 6: 32627. DOI: 10.1038/srep32627; Toxicol In Vitro. 2017; 43: 69-75; Cytotechnology. 2018; 28. doi: 10.1007/s10616-018-0227-3].

Prowadzono również badania innych wielopierścieniowych węglowodorów, takich jak kombretastatyna czy benzanilid, których tiolowe pochodne mogłyby znaleźć zastosowanie jako nowoczesne, selektywne chemoterapeutyki. Wykonane testy *in vitro* potwierdziły pro-apoptotyczną aktywność badanych związków [Toxicol In Vitro. 2016; 37: 148-161; Eur J Med Chem. 2018; 144: 797-816]. Model *in vitro*, w którym badano skuteczność działania wybranych pochodnych ftalocyjanin wobec komórek linii ustalonych ludzkich nowotworów, wykazał możliwą przydatność tych fotouczulaczy do terapii fotodynamicznej [J Med Chem. 2015; 58(5): 2240-55].

W ostatnim czasie ważnym kierunkiem moich badań stała się ocena różnych nanocząsteczek i ich kompleksów w zakresie potencjalnego cytobójczego i cytostatycznego wpływu na mikroorganizmy oraz komórki nowotworowe. Testom poddano różnego typu związki chemiczne o strukturze nanocząsteczkowej uzyskane z ekstraktów roślinnych dzięki technologii „zielonej syntezy”. Prace prowadzone są we współpracy z Katedrą Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Uzyskane wyniki stały się podstawą trzech publikacji [Arabian J Chem. 2016 DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.02.009; Biomed Microdevices. 2017; 20(1) :5; Adv. Nat. Sci.-Nanosci. Nanotechnol. 2018; 9(2) 025015 : 1-9] oraz trzech zgłoszeń patentowych złożonych w 2017 roku w Urzędzie Patentowym nr P.419995, P.424738, P.424739 (wnioski są w trakcie rozpatrywania). We współpracy z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu powstała praca poświęcona ocenie

przeciwnowotworowego wpływu ekstraktu owocu czarnej porzeczki wobec komórek linii ustalonej ludzkiego raka jelita grubego [J. Funct. Foods 2018; 42: 224-236].

Ogólny dorobek piśmienniczy w tym zakresie jest najobszerniejszy oraz najbardziej wszechstronny. Obecnie w różnych wydawnictwach pięć kolejnych manuskryptów oczekuje na recenzje lub decyzje edytorów.

łączna liczba publikacji: 17

łączny wskaźnik Impact Factor ISI: 50.590

łączna punktacja MNIŚW: 532.000

łączna liczba cytowań wg Web of Science: 192

3) Zmiany w obrębie układu odpornościowego w przebiegu wirusowych zakażeń wątroby typu B i C

Wieloletnia współpraca z Katedrą i Kliniką Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu przyniosła w efekcie artykuły, których wspólną tematyką była ocena różnych elementów układu odpornościowego zaangażowanych w trakcie wirusowych zakażeń wątroby typu B i C (WZW B i C). Prace te realizowano przy wsparciu projektu badawczego KBN nr **2 P05A 069 27**. Obecnie realizowany jest kolejny grant finansowany przez Narodowe Centrum Nauki nr **NCN 2016/23/B/NZ6/01497**, w którym zaplanowano ocenę poszczególnych populacji leukocytów u pacjentów chorych na WZW typu C poddanych terapii bezinterferonowej. Celem pierwszej fazy badań była ocena cytometryczna różnych subpopulacji leukocytów u pacjentów pediatrycznych z WZW typu C i porównanie ich z parametrami obserwowanymi u zdrowych uczestników badania. W badanych próbkach krwi obwodowej stwierdzono, zgodnie z oczekiwaniami, że różne populacje zaangażowane w odpowiedź przeciwwirusową zwiększały znacznie swoją częstość, szczególnie komórki NK oraz limfocyty T cytotoksyczne CD3⁺/CD8⁺/CD28⁻. Jednocześnie odnotowano spadek liczebności populacji limfocytów T pomocniczych i aktywowanych. Ponadto u pacjentów HCV+ obserwowano obniżenie odsetka mieloidalnych komórek dendrytycznych (mDC; Lin1⁻/CD11c⁺), przy względnie niezmiennym odsetku subpopulacji plazmocytoidalnej (pDC; Lin1⁻/CD123⁺) [Prz. Epid. 2005; 59(2): 483-9; Scand J Immunol. 2006; 63(4): 311-9; J. Pediatr. Infect. Dis. 2007; 2(3): 141-6].

W kolejnym etapie badań wysiłki analityczne zostały skoncentrowane na ocenie zaangażowania, subpopulacjach i aktywności funkcjonalnej komórek NK w przebiegu WZW

typu C. W pierwszej publikacji w tym cyklu zgromadzono informacje, które stały się podstawą teoretyczną rozwijaną w kolejnych pracach. We współpracy z Pracownią Diagnostyki Chorób Wątroby Wieku Dziecięcego Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, przy wsparciu grantu KBN nr **N N407 012**, wykazano, że w grupie pacjentów z przewlekłym HCV+ włóknieniu wątroby towarzyszy obniżenie aktywności komórek NK. Spadek aktywności łączył się ze wzrostem ekspresji receptorów immunoglobulinopodobnych (*ang.* killer cells' immunoglobulin-like receptors; KIR) o charakterze hamującym, CD158e, i z obniżeniem ekspresji receptorów charakteryzujących się potencjałem aktywującym komórki NK, CD158i i NKG2D. Stwierdzono, że odsetek komórek NK wykazujących ekspresję receptorów CD158i, KIR2D i APRI może być niezależnym wskaźnikiem stłuszczenia wątroby. Ponadto stopień uszkodzenia wątroby korelował z ekspresją hamujących receptorów CD158b i CD158e. Dodatkowo wzrost ekspresji tych receptorów skojarzono z pozytywnym czynnikiem prognostycznym, jakim jest trwała odpowiedź wirusologiczna na leczenie (*ang.* sustained virologic response; SVR) [**Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 2011; 59(6): 449-55; **Inflammation.** 2013 Oct; 36(5): 1004-12; **Ann Hepatol.** 2017 Jul-Aug; 16(4): 521-529; **Med Microbiol Immunol.** 2018 Feb; 207(1): 55-63].

Najważniejszym odkryciem w tym obszarze badań było wykazanie ekspresji receptorów Toll-podobnych na komórkach pochodzących z biopłatów wątroby w przewlekłych wirusowych zapaleniach wątroby typu C u dzieci. Było to pierwsze doniesienie na ten temat, które pojawiło się w piśmiennictwie światowym. Ekspresję oraz możliwe znaczenie receptorów Toll-podobnych u pediatrycznych pacjentów chorych na WZW typu B i C oceniano ramach dwóch projektów KBN nr **N N401 1747 33** i nr **N N401 5357 40**. Przeprowadzono cytometryczną ocenę wybranych receptorów TLR na leukocytach krwi obwodowej chorych przed leczeniem przeciwwirusowym i po nim oraz zdrowych uczestników badania. Stwierdzono, że ekspresja TLR2 i TLR4 wzrasta w wyniku terapii przeprowadzonej IFN α i rybawiryną [**Scand J Immunol.** 2005; 62(4): 407-12; **Prz. Epid.** 2006; 60(4): 657-63].

Wykorzystując model hodowli komórek gwiazdzistych wątroby *in vitro*, oceniono funkcjonalnie wybrane receptory TLR pod wpływem stymulacji przez odpowiadające im ligandy [**Centr. Eur. J. Immunol.** 2013; 38(4): 486-93].

Przy okazji oceny materiału klinicznego oraz badań eksperymentalnych powstały również trzy prace pogładowe, w których zawarto wiedzę na temat mechanizmów molekularnych aktywowanych w komórkach za pośrednictwem receptorów rozpoznających wzorce w trakcie zakażeń wirusami HBV i HCV. Prace te dotyczyły wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału oraz czynników transkrypcyjnych, za pośrednictwem których dochodzi do reakcji efektorowej pobudzanych w ten sposób komórek [**Post. Bioch. 2006; 52(1): 56-61; Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2010; 58(4): 295-302; Post. Biol. Komórki 2015; 42(4): 765-79**].

łączna liczba publikacji: 13

łączny wskaźnik Impact Factor ISI: 16.096

łączna punktacja MNiSW: 165.000

łączna liczba cytowań wg Web of Science: 83

4) Zmiany w obrębie układu odpornościowego w przebiegu chorób, którym towarzyszy przewlekły stan zapalny

Prace badawcze ujęte w tym obszarze mojego dorobku naukowego wiążą się ze współpracą z różnymi jednostkami organizacyjnymi Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Ścisła współpraca z katedrami i klinikami dotyczyła zróżnicowanego materiału klinicznego, przez co stawiała przede mną wysokie wymagania w zakresie kompetencji analitycznych, zarówno na poziomie doboru metod, organizacji pracy w laboratorium, jak i umiejętności związanych z oceną i interpretacją wyników. Swoboda w posługiwaniu się technikami immunochemicznymi oraz cytometrią przepływową często angażowała mnie w proces decyzyjny obejmujący kreowanie koncepcji i kierunku badań laboratoryjnych wykorzystywanych do analizy materiału klinicznego. We współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Onkologii Gastroenterologicznej i Chirurgii Plastycznej, w ramach projektu KBN nr **2 P05C 072 28**, oceniano przydatność pomiaru ploidii DNA oraz wybranych markerów zapalenia w diagnostyce polipowatości rodzinnej jelita grubego i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego [**Proktologia 2009; 10(2): 108-16; Proktologia 2009; 10(3): 162-9**].

Wspólne działanie z Katedrą i Kliniką Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej skupiło się na próbie wskazania w grupie chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP) markerów wczesnego wykrywania raka płuca. Badania te

zostały wsparte projektem KBN nr **N N402 5980 40**. W efekcie stwierdzono, że supresorowe komórki pochodzenia szpikowego (MDSC) oraz wybrane DAMP stanowią elementy istotne dla rozwoju POChP ze względu na ich wpływ na rozwój stanu zapalnego [**Pol Arch Med Wewn.** 2016; 126(12): 980-988; **Adv Exp Med Biol.** 2018; 11. doi:10.1007/5584_2018_165].

Rezultatem współpracy z Kliniką Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Katedry Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi oraz Onkologii Laryngologicznej są prace poświęcone zaangażowaniu różnych elementów układu odpornościowego w przebiegu przewlekłego zapalenia zatok z polipami i bez polipów. Pierwsza opublikowana praca ma charakter poglądowy i przybliży rolę makrofagów w tym mikrośrodkowisku [**Post. Chir. Głowy i Szyi** 2016; 15(1):1-13]. Praca poglądowa stała się podstawą teoretyczną dla oznaczeń eksperymentalnych, w trakcie których przebadano profil immunofenotypowy monocytów i makrofagów we krwi obwodowej i materiale tkankowym od pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok z polipami i bez polipów [**Immunobiology** 2018 Oct; doi: 10.1016/j.imbio.2018.09.004]. Powstały również dwie prace oryginalne, które obecnie czekają w różnych wydawnictwach na recenzje i decyzje edytorów.

Kolejną pracą poglądową w tym obszarze badań jest artykuł poświęcony roli receptorów TLR i witaminy D, która stanowi ligand dla TLR, w przebiegu cukrzycy typu I. Praca ta jest efektem mojego zaangażowania w rolę opiekuna studenckiego koła naukowego [**Scand J Immunol.** 2014; 80(2):75-84].

We współpracy z Kliniką Psychiatrii Dorosłych UMP uczestniczyłem w badaniach osób z chorobą afektywną dwubiegunową. W pierwszej publikacji opisano wyniki porównania cech neurobiologicznych i temperamentalnych potomstwa pacjentów poddanych terapii litem [**World J Biol Psychiatry.** 2015; 16(4):272-7], w drugiej oceniono poziom autoprzeciwciał przeciwko receptorom NMDAR i GAD oraz zmierzono białka IGF-1 u chorych z chorobą afektywną dwubiegunową w fazach manii i depresji oraz remisji choroby [**Neuropsychobiology.** 2018 Oct 18:1-8. doi: 10.1159/000493740].

Pozostałe artykuły dotyczą profilu aktywacji płytek krwi u pacjentów z ostrym udarem niedokrwinnym mózgu [**Thromb Haemost.** 2012; 108(1):107-18], oceny wykładników psychosomatycznych u pacjentów z trądzikiem [**Ann Dermatol.** 2016; 28(4):464-9] oraz wpływu ograniczenia ekspresji genu kodującego kaweolinę-1 na synowocyty pochodzące od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [**Adv Clin Exp Med.** 2018 Aug 6. doi: 10.17219/acem/75611].

łączna liczba publikacji: 12

łączny wskaźnik Impact Factor ISI: 23.089

łączna punktacja MNiSW: 235.000

łączna liczba cytowań wg Web of Science: 27

5) Ocena *in vitro* biogodności nowych materiałów do zastosowań biomedycznych

W ostatnim czasie zaangażowałem się w badania, których celem jest wytwarzanie nowych materiałów do zastosowań biomedycznych. Do tej pory rezultatem współpracy podjętej z Instytutem Inżynierii Materiałowej Politechniki Poznańskiej jest cykl sześciu artykułów. Badania obejmowały ocenę biogodności materiałów poddawanych innowacyjnym metodom obróbki technologicznej prowadzącej do uzyskania struktury nanocząsteczkowej oraz znacznych zmian warstwy powierzchniowej. Wprowadzane modyfikacje w istotny sposób poprawiały parametry fizykochemiczne badanych materiałów, ale także miały prowadzić do polepszenia ich właściwości biologicznych w zakresie przyswajalności przez tkanki otaczające implant. Analiza biogodności obejmowała ocenę wpływu materiału, jaki wywierał on na komórki osteoblastów i fibroblastów hodowane w warunkach *in vitro* w jego bezpośredniej i pośredniej obecności. Tytan o strukturze nano- lub mikrokryształicznej, z powierzchnią modyfikowaną w różny sposób bioszkieł, srebrem lub borem, badano pod względem cytotoksyczności oraz oddziaływania na cykl komórkowy. W efekcie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że dokonane modyfikacje w znaczny sposób polepszały asymilację badanych materiałów przez komórki będące z nimi w kontakcie [J Biomed Mater Res A. 2014;102(5):1316-24; Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016; 69: 1240-7; J Mat Science. 2016; 51(11): 5259-70; Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017; 73: 525-536; Prz. Spawal. 2017; 89(10): 32-8]. Kolejnym krokiem w trakcie przeprowadzanych analiz biogodności była ocena molekularna genów kodujących białka zaangażowane w bioadaptację komórek w kontakcie z nowosyntetyzowanymi materiałami [Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018 Dec 1;93:437-444].

łączna liczba publikacji: 6

łączny wskaźnik Impact Factor ISI: 20.292

łączna punktacja MNiSW: 164.000

łączna liczba cytowań wg Web of Science: 26

6) Analiza molekularna genu *CFTR* w przypadkach bezpłodności męskiej

Chronologicznie, pierwsze prace oryginalne w moim dorobku naukowym były efektem badań molekularnych, podjętych jeszcze w trakcie przygotowywania pracy magisterskiej pod kierunkiem prof. dra hab. Michała Witta, w ówczesnym Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu (obecnie Instytut Genetyki Człowieka PAN) we współpracy z Poradnią Andrologiczną Kliniki Rozrodczości Instytutu Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej w Poznaniu [**Pol. Przegląd Nauk o Zdrowiu 2004; 4:73-77; Pol. Przegląd Nauk o Zdrowiu 2004; 4:78-83**]. Celem powyższych analiz było określenie obecności mutacji w genie *CFTR* oraz częstości ich występowania w grupie chorych z wrodzoną obustronną niedrożnością nasieniowodów (*ang.* congenital bilateral absence of the vas deferens; CBAVD). Badania te podjęto w związku z wykazaniem silnego związku pomiędzy obecnością mutacji w genie *CFTR*, odpowiadających za występowanie mukowiscydozy, a nieprawidłowościami w męskim układzie rozrodczym. Przeprowadzona ocena molekularna miała dla populacji polskiej charakter pionierski. W efekcie wyniki uzyskane w badanej próbie potwierdziły silny związek pomiędzy obecnością najbardziej charakterystycznych dla mukowiscydozy mutacji oraz różnego typu azoospermii. W wymiarze użytecznym prace wsparły potrzebę diagnostyki molekularnej pacjentów z azoospermią zaporową w kierunku obecności mutacji w genie *CFTR*, w związku z ryzykiem występowania u nich niepełnoobjawowej mukowiscydozy, co w istotny sposób mogłoby wpłynąć na ograniczenie możliwości przeprowadzenia różnego typu technik terapeutycznych męskiej niepłodności.

Łączna liczba publikacji 2

Działalność dydaktyczno-wychowawcza

Działalność dydaktyczną rozpocząłem w 2004 roku w Katedrze i Zakładzie Immunologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, jeszcze w czasie, gdy byłem zatrudniony na stanowisku starszego referenta inżynierijno-technicznego. Ze względu na moje wykształcenie biotechnologiczne zostałem wówczas zaangażowany do prowadzenia ćwiczeń zatytułowanych: „Some applications of molecular biology in immunology” w ramach kursu „Basic and Clinical Immunology – Course For English Speaking Medical Student”, dla Oddziału Kształcenia w Języku Angielskim. Kurs prowadzony był dla studentów II roku 4-year study.

Po uzyskaniu stopnia doktora, w roku akademickim 2009/2010, w Katedrze Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu zostałem zatrudniony na etacie asystenta. Moje pensum w tamtym czasie obejmowało 240 godzin dydaktycznych. Od momentu zatrudnienia na etacie naukowo-dydaktycznym prowadzę zajęcia ze studentami, zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Od roku akademickiego 2010/2011 byłem zatrudniony na etacie adiunkta, z pełnym wymiarem pensum dydaktycznego na poziomie 210 godzin (rok akademicki 2016/2017 – 282 godz.; 2017/2018 – 513 godz.). Od 1 października 2018 jestem zatrudniony na etacie starszego wykładowcy.

Od początku mojej pracy dydaktycznej podstawowym przedmiotem, do którego nauczania zostałem włączony, była „Immunodiagnostyka”, wchodząca w skład podstawy programowej IV roku kierunku lekarskiego na Wydziale Lekarskim I. Po wewnątrzuczelnianej reformie programowej powierzono mi prowadzenie zajęć z przedmiotu „Immunologia”. Obecnie prowadzę zajęcia w zakresie wykładów, seminariów oraz ćwiczeń ze studentami II roku kierunku lekarskiego na Wydziale Lekarskim I i II, II roku kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym oraz II roku kierunku lekarsko-dentystycznego na Wydziale Lekarskim II. Tematem wykładów są „Nieswoiste mechanizmy obronne” oraz „Cytokiny”, seminaria obejmują „Mechanizmy odporności swoistej”, natomiast ćwiczenia dotyczą zagadnień z zakresu immunodiagnostyki. Kolejnym nauczany przeze mnie przedmiotem jest „Immunopatologia”, który prowadzę dla studentów IV roku kierunku analityka medyczna. Na wykładach omawiam zjawisko tolerancji immunologicznej i autoimmunizację oraz niedobory odporności. Seminaria przygotowywane są w zakresie chorób autoimmunizacyjnych narządowo-swoistych, immunopatologii układu oddechowego

oraz niedoborów odporności. Kolejnymi przedmiotami, w których nauczaniu uczestniczę, są ćwiczenia z „Biochemii ogólnej i żywności” oraz „Nowoczesne techniki diagnostyczne”. Na ćwiczeniach, dzieląc się swoim doświadczeniem diagnostycznym, kształcę studentów w dziedzinie praktycznej immunodiagnostyki.

Mój udział w ramach Oddziału Kształcenia w Języku Angielskim obejmuje obecnie nauczanie studentów II roku 4-letnich studiów (Advanced MD Program) i III roku 6-letnich studiów (Doctor of Medicine) na kierunku lekarskim w trakcie kursu „Basic Immunology” oraz studentów II roku 5-letnich studiów na kierunku lekarsko-dentystycznym (5-year DDS) w ramach kursu „Immunology”. W 2013 roku powierzono mi funkcję współkoordynatora kursu „Immunology” dla 5-letniego programu DDS. Moim obowiązkiem w obrębie pełnionej funkcji jest współudział w tworzeniu treści programowych, redagowaniu sylabusu dla studentów, a także opracowaniu systemu oceny studentów.

Ważną częścią mojej pracy dydaktycznej jest udział w kursach podyplomowych organizowanych przez Uniwersytet Medyczny w Poznaniu. Prowadzę wykłady i ćwiczenia z przedmiotu „Immunologia i immunopatologia” dla studentów I roku Niestacjonarnego Studium Kształcenia Podyplomowego w Zakresie Analityki Medycznej oraz z przedmiotu „Immunologia kliniczna” dla studentów II roku specjalizacji „Laboratoryjna Diagnostyka Medyczna” dla diagnostów laboratoryjnych. Współuczestniczyłem także w prowadzeniu zajęć z przedmiotu „Immunogenetyka” dla słuchaczy specjalizujących się w „Laboratoryjnej Genetyce Medycznej”.

Odmiennym aspektem mojej aktywności dydaktycznej jest udział w powstawaniu prac doktorskich, magisterskich i licencjackich. Obecnie jestem promotorem pomocniczym dwóch dysertacji doktorskich realizowanych w Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Jedna z prac powstaje we współpracy z Katedrą Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Od 2012 roku jestem opiekunem prac magisterskich, a od 2013 roku pełnoprawnym promotorem. Do chwili obecnej byłem opiekunem czterech, promotorem trzynastu i recenzentem sześciu prac magisterskich. Jedna z prac powstała wspólnie z Pracownią Technologii Wysokoprzepustowych Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu i stanowiła kontynuację współpracy, na mocy której w roku akademickim 2015/2016 została napisana praca licencjacka. W tym roku akademickim (2018/2019) pod moim kierownictwem

przygotowywane są dwie prace magisterskie. Spośród kierowanych przeze mnie prac cztery zostały nagrodzone lub wyróżnione na różnych konkursach prac magisterskich.

Działalność organizacyjna

Moja działalność organizacyjna wiąże się z aktywnością dydaktyczną, naukową oraz diagnostyczną. Przyjęcie mnie w 1998 roku na etat naukowo-techniczny w Katedrze i Zakładzie Immunologii ówczesnej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu wiązało się z zadaniem organizacji Pracowni Biologii Molekularnej. Z powierzonego mi zadania wywiązałem się w dwukrotnie. Najpierw zorganizowałem pracownię w pierwszej siedzibie Katedry, a następnie w 2005 roku, gdy Katedra zmieniała swoją lokalizację, po raz drugi. Obecnie Pracownia Biologii Molekularnej stanowi integralną część Zakładu Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Jako starszy referent inżynieryjno-techniczny zabezpieczałem funkcjonowanie Katedry Immunologii Klinicznej w zakresie opieki oraz prowadzenia ewidencji w magazynie odczynników chemicznych, w tym również substancji trujących, toksycznych, szkodliwych oraz związków rakotwórczych, a także – wdrażania nowych programów komputerowych.

W związku z moim wykształceniem oraz doświadczeniem zawodowym w latach 2003/2004 zostałem oddelegowany z ramienia Katedry Immunologii Klinicznej do działania w strukturach zorganizowanego przez Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 2 im. H. Święckiego w Poznaniu Zespołu ds. Akredytacji – Laboratorium. W trakcie prac Zespołu byłem zobowiązany do przystosowania Katedry Immunologii Klinicznej do standardów, które szpital musiał spełnić przed przyznaniem akredytacji. Moje zadania obejmowały wprowadzenie ewidencji aparatury diagnostycznej oraz przygotowanie standardowych procedur operacyjnych (SOP) dla wszystkich wykonywanych przez Katedrę procedur diagnostycznych. Praca ta miała dla mnie szczególnie istotny charakter, ponieważ od 2003 roku jestem diagnostą laboratoryjnym i należę do Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (nr wpisu na listę: 07417). Od 2006 roku posiadam pełne Prawo Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego (seria AA 03738). Obecnie jestem w trakcie wykonywania specjalizacji w zakresie „Laboratoryjnej Genetyki Medycznej”.

Od 2003 – 2007 roku sprawowałem funkcję sekretarza technicznego Komitetu Immunologii Polskiej Akademii Nauk, który następnie został przemianowany na Komitet Immunologii i Etiologii Zakażeń Człowieka Polskiej Akademii Nauk. W tym czasie, zgodnie

z umową zajmowałem się, m.in. prowadzeniem sekretariatu, organizacją zebrań Komitetu oraz protokołowaniem posiedzeń.

Wraz z przejściem na etat naukowo-dydaktyczny moja aktywność organizacyjna zmieniła charakter. Po rozpoczęciu pełnoetatowej działalności dydaktycznej, od 2011 roku zostałem opiekunem Studenckiego Koła Naukowego – SKN Immunologii Klinicznej, działającego w strukturach Studenckiego Towarzystwa Naukowego (STN) Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu przy Zakładzie Immunologii Katedry Immunologii Klinicznej. Od dwóch lat uczestniczę w pracach zespołu recenzentów naukowych projektów badawczych zgłaszanych przez studentów STN (2017, 2018). Zaangażowanie w działalność dydaktyczno-naukową w strukturach STN skupiło moją aktywność na licznych przedsięwzięciach organizowanych przez studentów różnych kierunków Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Od 2014 roku regularnie jestem zapraszany jako członek jury w sesji „Basic Life Science” odbywającej się w trakcie International Congress of Young Medical Scientists, najważniejszego przedsięwzięcia organizowanego co roku przez poznańskie STN. Ponadto, w 2015 roku uczestniczyłem w pracach Komitetu Naukowego VI. Wykładów Otwartych z cyklu Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu organizowanych przez SKN „Biosfera” działające przy Katedrze Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. W 2018 roku zostałem ponownie zaproszony przez SKN „Biosfera” do pracy w komisji oceniającej prezentacje uczestników w „Sesji Diagnostycznej” IX. Wykładów Otwartych z cyklu Spotkania Młodych z Nauką w Poznaniu.

Ze względu na szczególny charakter pracy dydaktycznej związanej z nauczaniem studentów II i IV roku kierunku analityka medyczna (ponad 100 godzin dydaktycznych) od 2013 roku zostałem włączony w skład minimum kadrowego dla kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Udział i zaangażowanie studentów analityki medycznej w pracę organizacyjną i konsolidację środowiska studentów tego kierunku zaowocował utworzeniem Poznańskiego Towarzystwa Studentów Medycyny Laboratoryjnej (PTSML). Na wniosek grupy założycielskiej 9 stycznia 2013 roku JM Rektor Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu powołał PTSML wpisem do rejestru organizacji studenckich Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W odpowiedzi na prośbę studentów

przyjąłem funkcję opiekuna towarzystwa, za co zostałem uhonorowany przez organizację członkostwem honorowym.

W ramach programu międzynarodowej wymiany naukowej SCORE (Standing Committee on Research Exchange) byłem opiekunem studentów z Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Medycyny (International Federation of Medical Students' Associations; IFMSA). Jak dotąd pod moim kierownictwem pracowali studenci z Brazylii, Ekwadoru, Panamy i Japonii.

Ważnym obszarem mojej działalności organizacyjnej jest członkostwo w towarzystwach naukowych. Obecnie jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka (PTGCz), Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej (PTIDiK), Polskiego Towarzystwa Cytometrii (PTC) oraz Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki (PTBK). W Oddziale poznańskim PTIDiK aktualnie pełnię funkcję skarbnika. Jednym z ważnych zadań statutowych Oddziału Poznańskiego PTC jest organizacja konferencji naukowej pod wspólnym tytułem „Poznańskie Dni Cytometrii i Immunopatologii”. W 2015 roku zostałem zaproszony do pełnienia funkcji sekretarza Komitetu Organizacyjnego „II. Poznańskich Dni Cytometrii i Immunopatologii”. W 2018 roku przyjąłem zaproszenie do prac w Komitecie Naukowym „III. Poznańskich Dni Cytometrii i Immunopatologii”.

W latach 2012 – 2016 byłem członkiem Rady Wydziału na Wydziale Lekarskim I Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, do której zostałem wybrany z grupy nauczycieli akademickich.

Od 2014 roku jestem regularnie zapraszany przez różnych edytorów do recenzji manuskryptów w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Do chwili obecnej podjąłem się procesu recenzenckiego 27 prac zgłoszonych do publikacji w 15 różnych czasopismach, m.in. Acta Biomaterialia, BMC Medical Genomics, Cancer Immunology Immunotherapy, Journal of Materials Science, Materials, Tumor Biology.

Poznań, dnia 29.10. 2018 r.

