Załącznik 3A

AUTOREFERAT

dr n. med. Magdalena Bodnar

Katedra Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi oraz Onkologii Laryngologicznej
Wydział Lekarski I
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Fredry 10,
61-701 Poznań

Poznań 2019

Załącznik 3A

1. Imię i Nazwisko

Magdalena Beata Bodnar

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej

2008 – uzyskanie **dyplomu magistra analityki medycznej**
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
Praca magisterska pt.: *„Białko CRP jako marker aktywności choroby u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów"*, promotor pracy: dr n. med. Magdalena Kuligowska-Prusińska, Dyplom nr 1700/117999/2008, wydany przez Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu

2008 – uzyskanie **Prawa Wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego** (PZWL nr 09324)

2011 – uzyskanie **dyplomu doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej**
Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
Rozprawa doktorska pt.: *„Ocena ekspresji wybranych czynników procesu nowotworowego w modelu raka płaskonabłonkowego krtani"*, promotor rozprawy: Prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek, Dyplom nr 3660, wydany przez Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
2017 – uzyskanie **dyplomu ukończenia Podyplomowych Studiów z Biologii Molekularnej** Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie (ocena końcowa - bardzo dobry)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 03.11.2008 do 31.10.2012 - asystent w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

od 1.11.2012 do nadal - adiunkt w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Dodatkowo:

od 27.01.2009 do 31.08.2014 – wolontariusz na stanowisku młodszy asystent, w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy

od 03.11.2014 do 01.09.2016 – młodszy asystent (umowa o pracę na czas zastępstwa) w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. Antoniego Jurasza w Bydgoszczy

od 16.11.2015 do nadal – specjalista inżynieryjno-techniczny w Katedrze i Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Wydział Lekarski I, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 45, poz. 595 ze zm.)

a/ tytuł osiągnięcia naukowego:

Monografia:

„Zastosowanie wybranych markerów białkowych do oceny zdolności do tworzenia przerzutów w rakach płaskonabłonkowych krtani" Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2019 (ISBN 978-83-7597-366-2)

Recenzenci wydawniczy:
Prof. dr hab. n. med. Tomasz Grzybowski
Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Szyfter

b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Rak płaskonabłonkowy krtani (ang. *Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*, LSCC) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów obszaru głowy i szyi [1]. Nowotwory obszaru głowy i szyi (ang. *Head and Neck Cancer*, HNC), zwłaszcza raki płaskonabłonkowe krtani pozostają jednym z największych wyzwań współczesnej onkologii, wynikających z wysokiej chemiooporności komórek nowotworowych na zastosowane leczenie [2, 3, 4]. Pacjenci, u których zdiagnozowano raki płaskonabłonkowe obszaru głowy i szyi (ang. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) w zaawansowanych stadiach, charakteryzują się wysoką śmiertelnością uwarunkowaną rozwojem przerzutów i rozwojem trudnych operacyjnie i opornych na leczenie nawrotów choroby [1, 2, 3]. Nowotwory obszaru głowy i szyi stanowią heterogenną pod względem histologicznym, uwarunkowań

molekularnych, biologicznych, a także postępowania klinicznego grupę nowotworów [5, 6]. Niezmiennie LSCC należy do nowotworów o stałym wskaźniku zachorowalności oraz śmiertelności, wynikających z mało charakterystycznych objawów klinicznych, wysokiego potencjału metastatycznego oraz późnego rozpoznania w zaawansowanym stadium rozwoju choroby [7, 8]. Ponadto pięcioletnie odsetki przeżyć w tej grupie chorych wynoszą niezmiennie ok. 50% [7, 8].

W etiologii raków płaskonabłonkowych obszaru głowy i szyi wyznaczono dwa wzory profili kancerogenezy [9, 10]. Pierwszy tzw. klasyczny, uwarunkowany kancerogennym i mutagennym efektem działania czynników chemicznych oraz związanych z nimi zaburzeń na podłożu molekularnym (zarówno genetycznych jak i epigenetycznych) [9, 11]. Drugi model tzw. alternatywny, indukowany infekcją wirusem HPV model drogi kancerogenezy. Choć tzw. alternatywna teoria nowotworzenia, uwarunkowana infekcją wirusem HPV wciąż nie jest do końca zdefiniowana i wyjaśniona, zwłaszcza w przypadku raków krtani, stanowi istotny element w diagnostyce różnicowej tych nowotworów [9, 10]. Różnicowanie i wyszczególnienie HPV-zależnych nowotworów obszaru głowy i szyi jest istotnym etapem diagnostycznym, który warunkuje prognostyczne oraz kliniczne implikacje [9]. Cechami charakterystycznymi raków na podłożu zakażenia wirusem HPV, w porównaniu z tzw. klasycznymi HNSCC, jest ich niższy stopień dojrzałości histologicznej, szybszy przebieg kliniczny, ale przede wszystkim większa wrażliwość na radio- i chemioterapię, a także lepsze długoterminowe rokowanie [9, 10]. Na podstawie badań molekularnych w HNSCC „The Cancer Genome Atlas Network" potwierdzono, całkowicie odmienny mechanizm szlaków sygnałowych i zaburzeń molekularnych w grupach nowotworów obszaru głowy i szyi HPV-zależnych i HPV-niezależnych [9]. Wśród nowotworów głowy i szyi, obszarami o najwyższej częstości występowania zakażeń wirusów HR HPV stanowią: ustna część gardła (24,9%), a następnie w gardło środkowe (21,4%) [12]. W krtani dane wahają się pomiędzy 1-75% przypadków [12, 13, 14]. Dlatego w tej lokalizacji bezpośredni wpływ infekcji wirusów HPV w etiopatogenezę zmian wciąż budzi kontrowersje [12, 13]. Rozbieżności w uzyskanych wynikach, dotyczących zarówno częstości występowania i znaczenia klinicznego infekcji HPV, warunkują konieczność przeprowadzenia dalszych badań nad rolą infekcji wirusów HPV w tej lokalizacji, zwłaszcza możliwych implikacji klinicznych [15]. Liczne badania wykazały, iż immunohistochemiczna ocena ekspresji białka supresorowego p16Ink4a jest względem technik z zakresu biologii molekularnej zastępczym markerem, będącym wykładnikiem infekcji wysokoonkogennymi typami wirusów HPV [15]. Ponadto wskazuje się, iż do tej pory nie ma jednoznacznego markera/testu potwierdzającego infekcję HPV w materiale tkankowym, który mógłby być wykorzystywany w rutynowej diagnostyce histopatologicznej. Ponadto najnowsze badania wskazują na zmiany w poziomach ekspresji białka p16Ink4a wśród HPV-dodatnich, jak i HPV-ujemnych HNSCC [16]. Liczne zmiany molekularne wśród pacjentów o tym samym statusie infekcji HPV sugerują, że różnic w ekspresji białka p16Ink4a nie można wyłącznie tłumaczyć infekcją wirusami HPV, jednakże wzrost ekspresji p16Ink4a związany jest z lepszym rokowaniem pacjentów z LSCC [15, 16, 17]. Dlatego też ocena ekspresji

białka p16Ink4a może wywierać istotne implikacje kliniczne, a także warunkować dobór adekwatnych strategii terapeutycznych wśród pacjentów z LSCC.

Ponadto, zjawisko wewnętrznej heterogenności guza (*Intra-Tumor Heterogeneity)* ma kluczowe znaczenie dla wszystkich procesów towarzyszących transformacji, ale zwłaszcza progresji nowotworu, a także wpływa na skuteczność terapii przeciwnowotworowej [18]. Zróżnicowane profile ekspresji genów a w konsekwencji ich produktów białkowych, będące cechami charakterystycznymi m.in. jego stopnia zaawansowania mogą w istotny sposób wpływać na prawidłową diagnostykę pacjentów, ale także warunkować dobór właściwej terapii przeciwnowotworowej [19]. Podstawowym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań, stanowiła ocena właściwości biologicznych komórek nowotworowych komórek oraz charakterystyka ścieżek sygnałowych regulujących potencjał metastatyczny komórek nowotworowych. Prowadzone przeze mnie badania miały na celu poznanie mechanizmów molekularnych i biochemicznych, zwłaszcza ich białkowych produktów, kierujących szlakami przekazywania sygnałów. Badania ukierunkowane były na identyfikacji białek uczestniczących w tworzeniu przerzutów, które w przyszłości mogą stać się podstawą do wyselekcjonowania właściwych strategii terapeutycznych [20–22]. Jednym z kluczowych etapów moich badań jest wyselekcjonowanie kluczowych biomarkerów proteomicznych dla ryzyka złośliwej progresji u pacjentów z LSCC, które następnie mogą być wykorzystywane w rutynowej diagnostyce patomorfologicznej [23].

Na podstawie dotychczasowych badań wskazano, że proces tworzenia przerzutów jest ściśle kontrolowany poprzez chemokiny i odpowiadające im receptory oraz ekspresję białek szoku cieplnego. Aktywacja szlaków sygnałowych przez czynnik wzrostowy pochodzenia stromalnego-1 (SDF1-L) a następnie poprzez zaktywowane receptory CXCR, odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu przerzutów [24]. Blokowanie osi SDF1-L/CXCR na poziomie liganda bądź receptora w ściśle określonych grupach pacjentów, może doprowadzić do zahamowania migracji komórek nowotworowych i tworzenia przerzutów, stanowiąc istotne potencjalne cele terapeutyczne [25]. Ponadto ocena zmian w poziomach ekspresji białek HSP wykazała, że HSP mogą być użytecznymi biomarkerami procesu progresji nowotworowej oraz w ocenie stopnia zróżnicowania i agresywności komórek nowotworowych [26, 27]. Wykazano rolę białek szoku cieplnego w modulacji mikrośrodowiska guza, wskazując, iż zależna od HSP modulacja aktywności metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej warunkuje szlaki przekazywania sygnałów w mikrośrodowisku guza oraz między komórkami nowotworowymi, a także warunkuje zdolność do migracji komórek nowotworowych [28, 29]. Jednakże w rakach płaskonabłonkowych krtani ekspresja, rola i mechanizmy sygnałowe pomiędzy szlakami chemokiny SDF1-L, białkami szoku cieplnego i czynnika transkrypcyjnego NF-κB nie zostały wyjaśnione. Dlatego głównym złożeniem mojej pracy była ocena wzajemnych odziaływań tych białek w szlakach sygnałowych jako potencjalnych czynników warunkujących progresję nowotworu. Ponadto celem niniejszej pracy była ocena zmian poziomów ekspresji białek w grupach LSCC podzielonych pod względem statusu białka p16Ink4a

oraz określenie wspólnych zależności w ekspresji oznaczanych białek we wspólnych szlakach sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za proces tworzenia przerzutów. Zrozumienie mechanizmów szlaków przekazywania sygnałów za pośrednictwem ligandu SDF1-L (SDF1-L/CXCR) oraz białek szoku cieplnego, jako głównych szlaków warunkujących tworzenie przerzutów, mogą stać się podstawą do opracowania nowych spersonalizowanych strategii terapeutycznych w LSCC.

Cel naukowy pracy

1. Które z ocenianych białek szlaków zaangażowanych w proces progresji nowotworowej (SDF1-L/CXCR, HSPs, NF-κB) uczestniczą w procesie tworzenia przerzutów w LSCC?
2. Jaką rolę odgrywają wzajemne odziaływania białek w szlakach sygnałowych w procesie progresji LSCC?
3. Czy infekcja HR HPV stanowi czynnik etiologiczny w procesie transformacji nowotworowej LSCC oraz czy ocena diagnostyczna poziomu ekspresji białka p16Ink4a w LSCC może być traktowana jako surogat infekcji HPV w LSCC?

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzona na archiwalnym materiale tkankowym w postaci bloczków parafinowych uzyskanym od 359 pacjentów, którym wykonano całkowitą laryngektomię. Badania zostały przeprowadzone na bloczkach parafinowych w postaci mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarray*, TMA) zawierających: pierwotne utkanie raka płaskonabłonkowego krtani, prawidłową błonę śluzową nagłośni oraz przerzuty raka płaskonabłonkowego krtani w węzłach chłonnych.
Z wyselekcjonowanego materiału tkankowego pochodzącego odpowiednio: z wycinków tkankowych zawierających reprezentatywne utkanie guza (min. 80% utkania guza), wycinków tkankowych zawierających prawidłową błonę śluzową (granica cięcia; min. 3 cm od utkania guza, stanowiący materiał kontrolny), wycinków tkankowych zawierających przerzuty SCC w węzłach chłonnych, utworzono bloczki mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarray*, TMA). Na bloczkach parafinowych w postaci mikromacierzy tkankowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne mające na celu ocenę lokalizacji i poziomów ekspresji białek: p16Ink4a, SDF1-L, CXCR4, CXCR7, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90L, HSP90B, NF-κB. Następnie, spośród przypadków p16Ink4a(+) przeprowadzono reakcję PCR, w celu oceny statusu DNA HPV.

Ocenę powierzchni oraz intensywności dodatnio wyznakowanych komórek dla białek SDF1-L, CXCR4, CXCR7, HSPs, NF-κB przeprowadzono za pomocą zautomatyzowanych metod morfometrycznych z wykorzystaniem narzędzia graficznego ImageJ wersja 1.46a. Ekspresję białka p16Ink4a określono za pomocą dwu-stopniowej skali) 0 – brak ekspresji, 1 – ekspresja dodatnia (odczyn obejmujący ≥70% komórek dodatnio wyznakowanych, ekspresja białka jądrowo-cytoplazmatyczna) [30]. Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem programu

Statistica 13.0 (StatSoft). Ponadto przeprowadzono hierarchiczną analizę skupień wykorzystując oprogramowanie R3.5.0 z pakietem EA-quintiles (www.r-project.org), która jest matematycznym algorytmem umożliwiającym grupowanie obiektów wg hierarchii klasyfikacji. Analiza polega na przeprowadzeniu podziałów, rozpoczynając od analizy pojedynczego obiektu jako odrębnego skupienia, tworząc tzw. macierz, w której wszystkie analizowane obiekty należą do jednego skupienia. Wyniki te zobrazowane są w postaci macierzy, z wykorzystanie tzw. mapy ciepła (ang. *heat map*) wraz z dendrogramem.

Omówienie uzyskanych wyników badań

W przeprowadzonym badaniu DNA HPV stwierdzono w 1,1% analizowanych przypadków. W 3 przypadkach stwierdzono DNA HPV16, a w 1 przypadku DNA HPV18. Analiza odczynów immunohistochemicznych białka p16Ink4a wykazała dodatnią, rozlaną, cytoplazmatyczno-jądrową ekspresję białka p16Ink4a w 20% przypadków pierwotnego utkania LSCC, w 16% przypadków w prawidłowej błony śluzowej oraz w 7% przypadków przerzutów w węzłach chłonnych. Analiza wykazała liczne korelacje ekspresji oznaczanych białek (SDF1-L/CXCR, HSPs, NF-κB) względem wzajemnych szlaków sygnałowych, a także względem stopnia zajęcia węzłów chłonnych. W wyniku przeprowadzonych analiz wyodrębniono odmienne profile białkowe wśród pacjentów z LSCC pod względem statusu białka p16Ink4a. Wykazano istotnie wyższe wartości ekspresji białka SDF1-L, CXCR7 oraz CXCR4 w grupie p16Ink4a(-) co wskazuje na aktywację zarówno klasycznego jak i alternatywnego szlaku dla liganda SDF1-L w grupie p16Ink4a(-). Natomiast w grupie p16Ink4a(+) wykazano istotnie wyższe wartości ekspresji receptora SDF1-L i CXCR4, sugerując w tym przypadku aktywację jedynie klasycznego szlaku aktywacji liganda. Szczegółowa analiza zmian poziomów ekspresji białek szoku cieplnego i analiza skupień wyszczególniła białka HSP60, HSP70 oraz HSP90B, jako czynników różnicujących w obu analizowanych grupach. Wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji białek HSP60, HSP70, HSP90B grupie p16Ink4a(-) pomiędzy grupą pacjentów bez przerzutów do węzłów chłonnych i z przerzutami do węzłów chłonnych. Ponadto w grupie p16Ink4a(+) wykazano różnice istotne statystycznie w poziomach ekspresji białka HSP27 i HSP90L. Stwierdzono istotny wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB w grupie p16Ink4a(-) w porównaniu z grupą p16Ink4a(+) sugerując, iż do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-κB dochodzi w grupie p16Ink4a(-).

Analiza skupień wyodrębniła specyficzne profile białkowe charakteryzujące określone grupy badane. Po raz pierwszy wykazano, że zmiana profilu ekspresji receptorów CXCR4 i CXCR7, oraz białek HSP70, HSP90L i HSP90B różnicuje pacjentów z LSCC pod względem obecności przerzutów w węzłach chłonnych pomiędzy grupami p16Ink4a(+) oraz p16Ink4a(-). Szczegółowa analiza skupień w grupie p16Ink4a(+) CaN0 wykazała istotny wzrost ekspresji receptora CXCR4, korelujący synergistyczny spadek ekspresji receptora CXCR7 i czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Natomiast

w grupie p16Ink4a(-), stwierdzono istotny wzrost ekspresji receptora CXCR7, czynnika SDF1-L oraz czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Dalsza analiza profilów ekspresji białek przedstawiona na podstawie dendrogramu wyszczególniła osobną grupę korelujących ze sobą białek szoku cieplnego: HSP90L, HSP70 oraz HSP90B. Analiza skupień wykazała znaczący stopień współdziałania tych białek w grupie p16Ink4a(-), jednocześnie wskazując na grupę przypadków z zaawansowanym stopniem zajęcia węzłów chłonnych.

Podsumowanie

Regulacja aktywności poszczególnych czynników w szlakach sygnałowych jest bardzo złożona i opiera się na skomplikowanej sieci zależności pomiędzy komórkami guza, macierzą zewnątrzkomórkową i towarzyszącymi im komórkami prawidłowymi. Wzajemne interakcje pomiędzy szlakiem czynnika SDF1-L i jego specyficznymi receptorami (CXCR) oraz białkami szoku cieplnego i czynnikami transkrypcyjnymi, są kluczowymi elementami w procesie tworzenia przerzutów w raku płaskonabłonkowym krtani. Znajomość zmian w poziomach ekspresji oraz wzajemne korelacje w ekspresji oznaczanych parametrów mogą stanowić podstawę do opracowywania nowych metod diagnostycznych i strategii terapeutycznych, zwłaszcza wśród pacjentów z rozpoznaniem LSCC bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0). W niniejszej pracy przebadano zmiany profili ekspresji białek w celu wyselekcjonowania potencjalnych markerów uczestniczących w zdolności komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów w LSCC. Analizy przeprowadzone w wyniku realizacji niniejszej pracy umożliwiły przedstawienie zmodyfikowanego schematu klasyfikacji pacjentów z LSCC oraz teoretycznego schematu oddziaływania białek w szlaku progresji LSCC wobec statusu białka p16Ink4a. Ponadto stworzenie hipotetycznego, na podstawie właściwości i mechanizmów biologicznych oznaczanych białek, schematu potencjalnych celów terapeutycznych w różnych etapach progresji wśród pacjentów z LSCC. Schemat klasyfikacji LSCC powstał w oparciu o analizy statystyczne przeprowadzone względem statusu ekspresji białka p16Ink4a oraz wyników analizy skupień. W niniejszym schemacie klasyfikacji uwzględniono, iż nowotwory obszaru głowy i szyi dla celów terapeutycznych, obecnie są klasyfikowane pod względem obecności infekcji wirusami HPV, ale także uwzględniając nadekspresję białka p16Ink4a jako istotnego parametru rokowniczego. Pacjenci HNSCC z zakażeniem HPV i bez, klasyfikowani są do grup charakteryzujących się odmiennym profilem ekspresji zmian na podłożu molekularnym i biologicznym. Pomimo, iż w przypadku LSCC, przypadki z zakażeniem HPV stanowią niewielki odsetek chorych (1-5%, dane w oparciu o wyniki własne oraz dane piśmiennictwa), ze względu na implikacje kliniczne, wskazane jest wyodrębnienie tej grupy pacjentów w procesie diagnostycznym [12, 13, 14]. Jednak istotnym elementem, który może wskazać na nowe strategie diagnostyczne i klasyfikację pacjentów, jest status ekspresji białka p16Ink4a w LSCC. Ponieważ wskazano, iż wzrost ekspresji białka p16Ink4a jest

wykładnikiem dobrego rokowania oraz lepszej odpowiedzi na leczenie, także wśród pacjentów HPV-ujemnych [15, 16, 17]. Deregulacje zachodzące w szlakach sygnałowych i dokładna charakterystyka składowych szlaków, w których uczestniczy p16Ink4a (p16Ink4a-cyklinaD1-CDK4-RB oraz p16Ink4a-cyklinaD1-CDK6-RB) powinny stanowić główny punkt odniesienia dla zrozumienia kluczowych mechanizmów molekularnych i etapów progresji nowotworowej w LSCC. W wyniku analizy badań przeprowadzonych w niniejszym opracowaniu, udowodniono, że ekspresja białka p16Ink4a nie może być w prosty sposób traktowana jako badanie potwierdzające zakażenie HPV, ale może stanowić istotny element różnicujący pacjentów z LSCC. W oparciu o przeprowadzone analizy statystyczne oraz hierarchiczną analizę skupień, stwierdzono i opracowano odmienne profile ekspresji białek (szlaku SDF1-L/CXCR, HSP, NF-κB) uwzględniając status ekspresji p16Ink4a w LSCC.

Pomimo, iż w komórkach nowotworowych bardzo często stwierdza się podwyższoną ekspresję liganda SDF1-L, do nasilenia sygnalizacji szlaków wewnątrzkomórkowych dochodzi w momencie wiązania liganda z odpowiednim receptorem, stanowiących kluczowy etap w mechanizmie tworzenia przerzutów w LSCC. Wyniki niniejszej pracy wykazały silny związek mechanizmów klasycznego i alternatywnego aktywacji szlaku SDF1-L/CXCR względem stopnia zajęcia węzłów chłonnych w LSCC. Po raz pierwszy wykazano wyraźne różnice w ekspresji białek w szlaku SDF1-L/CXCR w grupie p16Ink4a(-) oraz p16Ink4a(+). Wskazano, iż w grupie p16Ink4a(+) dochodzi do aktywacji receptora CXCR4, zatem drogi klasycznej szlaku SDF1-L sugerując się, iż może stanowić istotny cel terapeutyczny wśród pacjentów z rozpoznaniem LSCC bez przerzutów do węzłów chłonnych. Natomiast w przypadku pacjentów p16Ink4a(-) tworzenie przerzutów do węzłów chłonnych uwarunkowane jest synergistycznym działaniem szlaku klasycznego przez CXCR4 i alternatywnego przez CXCR7. Zidentyfikowanym nowym czynnikiem pod względem strategii terapeutycznych w LSCC może być receptor CXCR7, którego ekspresja i udział w aktywacji SDF1-L, ujawniła się w grupie pacjentów p16Ink4a(-). Potwierdza to teorię, że komórki nowotworowe zdolne są do aktywacji alternatywnych mechanizmów aktywacji szlaków przekazywania sygnałów, wzmagając swój potencjał metastatyczny. W badaniach wykazano, że CXCR7 stanowi negatywy parametr rokowniczy, a także może stanowić istotny dodatkowy cel terapeutyczny z zastosowaniem specyficznych inhibitorów tego receptora, we wczesnych, ale także późnych etapach progresji nowotworowej (wśród pacjentów z rozpoznaniem bez przerzutów do węzłów chłonnych i z przerzutami do węzłów chłonnych) [31, 32, 33], co również zostało potwierdzone w niniejszej pracy. Podkreślono także, że potencjalne zablokowanie ścieżki sygnałowej odbywa się dopiero w momencie addytywnego blokowania obu swoistych receptorów, warunkując uzyskanie oczekiwanych efektów w postaci znacznego ograniczenia wzrostu komórek nowotworowych [31, 32, 33]. Uzyskane wyniki potwierdziły tę tezę, wskazując iż w grupie LSCC p16Ink4a(-) komórki nowotworowe zdolne są do aktywacji SDF1-L za pomocą obu szlaków sygnalizacyjnych CXCR4-

CXCR7, które mogą być istotnym elementem w opracowaniu skuteczniejszych metod terapeutycznych.

W badaniach wykazano, że wieloczynnikowość procesu nowotworzenia skłania do wykorzystania strategii wykorzystania białek szoku cieplnego, co w połączeniu z podaniem cytostatyków i/lub radioterapią może się przyczynić do zmniejszenia dawek leków i promieniowania koniecznych do wywołania śmierci komórkowej [34]. Strategia wpływu na komórki nowotworowe uwzględniająca plejotropową aktywność białek szoku cieplnego, wskazuje, iż mogą one stanowić istotny parametr prognostyczny, ale także istotny cel terapeutyczny [34]. Ocena zmian w poziomach ekspresji białek HSP wykazała, że HSP mogą być użytecznymi biomarkerami procesu progresji nowotworowej oraz stopnia zróżnicowania i agresywności komórek nowotworowych [34, 35]. W niniejszej pracy wykazano, że ekspresja białek HSP60, HSP70, HSP90 różnicuje pacjentów w grupach p16Ink4a(-) oraz p16Ink4a(+) pod względem stopnia zajęcia węzłów chłonnych. Sugerując, iż inhibitory tych białek mogą stanowić istotne elementy w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych. HSP stanowią istotne czynniki wzmagające wrażliwość komórek nowotworowych na radioterapię [36]. Badania na liniach komórkowych potwierdzały, że ekspresja HSP90 była istotnie wyższa w przypadkach p16-ujemnym porównaniu z p16-dodatnimi HNSCC, a zastosowanie ganetespib'u zwiększało cytotoksyczność i indukowało apoptozę komórek nowotworowych p16-ujemnych bardziej niż p16-dodatnich [35]. Ponadto w badaniach *in vitro* ganetespib w połączeniu z cisplatyną i radioterapią wzmagał efekt cytotoksyczny. Ponieważ ekspresja HSP90 jest wyższa w komórkach p16-ujemnych, uzasadniona jest dalsza ocena aktywności klinicznej inhibitorów HSP90 w rakach płaskonabłonkowych obszaru głowy i szyi. Najnowsze badania podkreślają znaczenie ekspresji białek szoku cieplnego, zwłaszcza HSP90 w opracowaniu skutecznych terapii [37, 38]. Wskazując, iż ocena zmian poziomów ich ekspresji i znajomość interakcji w szlakach przekazywania sygnałów daje możliwość regulacji ich funkcji poprzez zdolność do zahamowania aktywności [38]. Jednym z głównych celów badań, jest poszukiwanie grupy białek związanych z procesem tworzenia przerzutów w LSCC, zwłaszcza ocena ich diagnostycznej wartości przy zastosowaniu rutynowych procedur diagnostycznych. Kolejne badania podkreślają także wpływ ekspresji HSP na aktywację NF-κB, która jest niezbędna w leczeniu wielu chorób i konstrukcji efektywnych terapii adiuwantowych [39, 40]. Wyniki niniejszych badań potwierdziły korelację białek szoku cieplnego z czynnikiem NF-κB na różnych etapach progresji LSCC (wśród pacjentów z rozpoznaniem bez przerzutów do węzłów chłonnych i z przerzutami do węzłów chłonnych). W wielu badaniach wykazano związek szlaków NF-κB i HSP z opornością na napromienianie, ponadto wykazano większą wrażliwość na działanie radioterapii po zahamowaniu tych szlaków [28, 40]. Analiza profilów ekspresji białek uzyskana w wyniku realizacji niniejszej, wyszczególniła osobną grupę korelujących ze sobą białek szoku cieplnego: HSP90L, HSP70 oraz HSP90B oraz wykazała znaczący stopień współdziałania tych białek w grupie p16Ink4a(-), jednocześnie wskazując na grupę przypadków

z zaawansowanym stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Wyniki te udowadniają udział tych białek w późniejszych etapach progresji nowotworowej oraz wskazują na potencjalne czynniki w zahamowaniu progresji nowotworowej w LSCC. Kolejna analiza zmian profilu ekspresji białek wyszczególniła grupę przerzutów w węzłach chłonnych (N+), gdzie stwierdzono wzrost ekspresji białek HSP60, SDF1-L oraz NF-κB, co sugeruje odmienny profil zmian molekularnych w przerzutach, w porównaniu z pierwotnym utkaniem guza. Zatem potwierdzona wieloczynnikowość procesu nowotworzenia skłania do wykorzystania połączonych elementów w tworzeniu strategii terapeutycznych. Wyniki niniejszych badań wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań obejmujących swoim obszarem regulacje obu tych szlaków pod kątem skutecznych kierunku terapii.

Ocena poszczególnych składowych szlaków sygnałowych, ściśle powiązanych z określonymi fazami tworzenia przerzutów, może dostarczyć pełniejszych informacji o mechanizmie nowotworzenia oraz podwyższyć wrażliwości komórek nowotworowych na oddziaływanie stosowanych czynników terapeutycznych.

Wnioski

1. Wyodrębnienie grup pacjentów p16Ink4a(-) oraz p16Ink4a(+) może stanowić jeden z podstawowych etapów rutynowej diagnostyki wskazując, iż wyselekcjonowane grupy pacjentów LSCC p16Ink4a(-) oraz LSCC p16Ink4a(+), charakteryzują się odmienną ekspresją białek w analizowanych szlakach sygnalizacyjnych. Poziom ekspresji białka p16Ink4a może być rutynowo wykorzystywanym narzędziem diagnostycznym różnicującym pacjentów z LSCC. Może stanowić podstawę do zmiany klinicznej interpretacji nadekspresji białka p16Ink4a w LSCC oraz analizując biologiczne aspekty punktem wyjścia do nowej klasyfikacji pacjentów z LSCC oraz wyboru odpowiedniej terapii.

2. Wzrost poziomów ekspresji oraz korelacje ekspresji białek szlaku SDF1/CXCR4-CXCR7, odgrywają znaczącą rolę w procesie tworzenia przerzutów w przypadku raków płaskonabłonkowych krtani. Zmiany poziomów ekspresji receptorów chemokinowych CXCR4 oraz CXCR7, wykazują znaczący stopień zróżnicowania pomiędzy grupami LSCC p16Ink4a(-) oraz LSCC p16Ink4a(+). Istotny wzrost ekspresji receptorów chemokinowych CXCR4 i CXCR7 mogą potwierdzać ich funkcje stymulujące w progresji komórek nowotworowych w LSCC, a hipotetyczne zastosowanie inhibitorów tych receptorów może w znaczący sposób zahamować progresję nowotworową w LSCC.

3. Profil pacjentów LSCC p16Ink4a(-) jest ściśle związany z aktywacją klasycznego i alternatywnego szlaku sygnalizacji poprzez ligand SDF1-L. Tworzenie przerzutów u pacjentów p16Ink4a(-) uwarunkowane jest synergistycznym działaniem szlaku klasycznego przez receptor CXCR4 i alternatywnego przez receptor CXCR7. Sugerując, iż komórki nowotworowe LSCC

wzmagają swój potencjał metastatyczny poprzez zdolność do aktywacji alternatywnych mechanizmów aktywacji szlaków (np. poprzez wzrost ekspresji receptora CXCR7) przekazywania sygnałów.

4. Ekspresja białek HSP60, HSP70, HSP90 istotnie różnicuje pacjentów w grupach LSCC p16Ink4a(-) oraz p16Ink4a(+), wskazując na ich udział w procesie progresji nowotworowej w LSCC. Wysokie poziomy HSP60, HSP90L i HSP90B względem stopnia zajęcia węzłów chłonnych, sugerują, iż inhibitory tych białek mogą stanowić istotne elementy w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych zwłaszcza w grupie LSCC p16Ink4a(-). Zatem znajomość wzajemnych interakcji pomiędzy oznaczanymi białkami szoku cieplnego daje możliwość kontroli poziomów ich ekspresji sugerując, iż zmiany w poziomach ekspresji białek HSP mogą być użytecznymi biomarkerami procesu progresji nowotworowej.

5. Izoformy białka HSP90, odpowiednio HSP90L i HSP90B, wykazują znaczący stopień zróżnicowania i wskazują na ich udział w procesie tworzenia przerzutów wśród pacjentów LSCC p16Ink4a(-) oraz p16Ink4a(+).

6. Korelacja ekspresji białek szoku cieplnego HSP27, HSP60, HSP70 oraz czynnika NF-κB w istotny sposób charakteryzują odmienny profil białkowy dla przerzutów SCC w węzłach chłonnych.

7. Charakterystyka ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB na poziomie białka wykazała, że immunohistochemiczna ocena ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB, może być proteomicznym biomarkerem ryzyka rozwoju przerzutów w LSCC w grupie p16Ink4a(-). Wykazanie ekspresji cząsteczek docelowych jako biomarkerów związanych ze zdolnością do tworzenia przerzutów przez komórki LSCC czyni je potencjalnie przydatnymi w selekcji i monitorowaniu odpowiedzi na terapię.

8. Niski odsetek przypadków DNA HPV-dodatnich w LSCC (1,1%), potwierdza, iż w etiologii raka płaskonabłonkowego krtani, pacjenci HPV-dodatni stanowią niewielki odsetek przypadków.

9. Wysoki odsetek przypadków LSCC charakteryzujących się wzrostem ekspresji białka p16Ink4a, tzw. p16Ink4a(+), w przypadkach HPV-ujemnych (19%), sugerują, iż w przypadku LSCC wzrost ekspresji białka p16Ink4a nie może być stosowany jako jednoznaczny marker infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego. Rola i udział infekcji wirusów brodawczaka ludzkiego w krtani jest bardziej złożona niż w ustnej części gardła, a ekspresja p16Ink4a może w większości przypadków nie odzwierciedlać nowotworów wywoływanych przez wirusa brodawczaka ludzkiego.

10. Wzrost ekspresji białka p16Ink4a w LSCC może przebiegać w oparciu o inny mechanizm niż związany z infekcją wirusem HPV, wskazując na zróżnicowane mechanizmy molekularne zachodzące w przebiegu LSCC.

11. W odniesieniu do właściwości biologicznych oznaczanych parametrów białkowych, istotnym wykładnikiem w doborze adjuwantowej terapii w LSCC może stanowić korelacja ekspresji białek szlaku SDF1-L/CXCR, białek szoku cieplnego oraz czynnika NF-κB na różnych etapach progresji LSCC (zwłaszcza wśród pacjentów z rozpoznaniem bez przerzutów do węzłów chłonnych i z przerzutami do węzłów chłonnych, oraz ekspresji tego białka w SCC w węzłach chłonnych). Potwierdzone wysokie poziomy ekspresji tych białek mogą sugerować związek białek tych szlaków z opornością na napromienianie, a zahamowanie tych szlaków może doprowadzić do zwiększenia wrażliwości na działanie radioterapii.

Piśmiennictwo

[1] Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncol* 2016; 91: 13–23.

[2] Bose P, Brockton NT DJ. Head and neck cancer: from anatomy to biology. - PubMed - NCBI. *Int J Cancer* 2013; 133: 2013–23.

[3] Gil Z, Fliss DM. Contemporary management of head and neck cancers. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 296–300.

[4] Daneshi N, Fararouei M, Mohammadianpanah M, et al. Effects of Different Treatment Strategies and Tumor Stage on Survival of Patients with Advanced Laryngeal Carcinoma: A 15-Year Cohort Study. *J Cancer Epidemiol* 2018; 2018: 1–8.

[5] Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, et al. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta otorhinolaryngol Ital* 2013; 33: 77–87.

[6] Slootweg PJ, Grandis JR. Tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space. In El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. (Eds): WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th Edition, IARC 2017; 77-105.

[7] Wierzbicka M, Bień S, Osuch-Wójcikiewicz E, et al. Zalecenia diagnostyczno-lecznicze w leczeniu nowotworów głowy i szyi. *Pol Przegląd Otorynolaryngol* 2011; 1: 17–43.

[8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66: 7–30.

[9] Cancer Genome Atlas Network TCGAN. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* 2015; 517: 576–82.

[10] Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol* 2012; 22: 128–42.

[11] Jenkins G, O'Byrne KJ, Panizza B, et al. Genome stability pathways in head and neck cancers. *Int J Genomics* 2013; 2013: 464720.

[12] Isayeva T, Li Y, Maswahu D, et al. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol* 2012; 6 Suppl 1: S104-20.

[13] Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 2011; 33: 581–6.

[14] Duray A, Descamps G, Arafa M, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol* 2011; 39: 51–9.

[15] Venuti A, Paolini F. HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head Neck Pathol* 2012; 6: 63–74.

[16] Stephen JK, Divine G, Chen KM, et al. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol* 2013; 2: 51–61.

[17] Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 269–282.

[18] Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 2013; 501: 346–54.

[19] McAllister SS, Weinberg RA. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. *J Clin Oncol* 2010;

28: 4022–8.

[20] Bodnar M, Szylberg L, Kazmierczak W, et al. Differentiated expression of membrane type metalloproteinases (MMP-14, MMP-15) and pro-MMP2 in laryngeal squamous cell carcinoma. A novel mechanism. *J Oral Pathol Med* 2013; 42: 267–74.

[21] Bodnar M, Szylberg L, Kazmierczak W, et al. Tumor progression driven by pathways activating matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Oral Pathol Med* 2014; 44: 437–443.

[22] Bodnar M, Szylberg Ł, Kaźmierczak W, et al. Immunohistochemical expression of p27(kip1) in metastatic laryngeal squamous cell carcinoma. *Adv Med Sci* 2014; 59: 206–12.

[23] Bodnar M, Luczak M, Bednarek K, et al. Proteomic profiling identifies the inorganic pyrophosphatase (PPA1) protein as a potential biomarker of metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Amino Acids* 2016; 48: 1469–76.

[24] Ishikawa T, Nakashiro K-I, Hara S, et al. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 61–6.

[25] Uchida D, Onoue T, Tomizuka Y, et al. Involvement of an Autocrine Stromal Cell Derived Factor-1/CXCR4 System on the Distant Metastasis of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 685–694.

[26] Colaco CA, Bailey CR, Walker KB, et al. Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 461230.

[27] Rappa F, Farina F, Zummo G, et al. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: an overview. *Anticancer Res* 2012; 32: 5139–50.

[28] Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, et al. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. *Pharmaceuticals* 2018; 11: 2.

[29] Chatterjee S, Burns TF, Chatterjee S, et al. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1978.

[30] Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 2017; 67: 122–137.

[31] Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med* 2013; 19: 12–22.

[32] Hou K-L, Hao M-G, Bo J-J, et al. CXCR7 in tumorigenesis and progression. *Chin J Cancer* 2010; 29: 456–9.

[33] Sun X, Cheng G, Hao M, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 709–22.

[34] Shrestha L, Bolaender A, Patel HJ, et al. Heat Shock Protein (HSP) Drug Discovery and Development: Targeting Heat Shock Proteins in Disease. *Curr Top Med Chem* 2016; 16: 2753–64.

[35] Patel K, Wen J, Magliocca K, et al. Heat shock protein 90 (HSP90) is overexpressed in p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, and its inhibition in vitro potentiates the effects of chemoradiation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 74: 1015–1022.

[36] McLaughlin M, Barker HE, Khan AA, et al. HSP90 inhibition sensitizes head and neck cancer to platin-based chemoradiotherapy by modulation of the DNA damage response resulting in chromosomal fragmentation. *BMC Cancer* 2017; 17: 86.

[37] Dimitriou N, Pavlopoulou A, Tremi I, et al. Prediction of Gold Nanoparticle and Microwave-Induced Hyperthermia Effects on Tumor Control via a Simulation Approach. *Nanomaterials* 2019; 9: 167.

[38] Wu T-T, Zhou S-H. Nanoparticle-based targeted therapeutics in head-and-neck cancer. *Int J Med Sci* 2015; 12: 187–200.

[39] Kumar S, Stokes J, Singh UP, et al. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett* 2016; 374: 156–166.

[40] Brown MS, Diallo OT, Hu M, et al. CK2 modulation of NF-kappaB, TP53, and the malignant phenotype in head and neck cancer by anti-CK2 oligonucleotides in vitro or in vivo via sub-50-nm nanocapsules. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 2295–307.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza

Jestem autorką/współautorką 180 prac naukowych o łącznej wartości współczynnika **Impact Factor 112.359** oraz **liczbą punktów MNiSW 1315.000.** Zbiorczy wykaz publikacji, ocena dorobku naukowego oraz analiza bibliometryczna publikacji znajdują się w załączniku nr 4 i 5 wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

W 2008 roku ukończyłam studia na kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską pt. „*Białko CRP jako marker aktywności choroby u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów*" wykonałam w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej pod kierownictwem pani dr n. med. Magdaleny Kuligowskiej-Prusińskiej, którą obroniłam w lipcu 2008 roku. Od listopada 2008 roku zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej CM UMK w Bydgoszczy na stanowisku asystenta.

Pierwszym kierunkiem prowadzonych przez mnie badań była charakterystyka biologii nowotworzenia w różnych typach nowotworów złośliwych, ze szczególnym uwzględnieniem raków płaskonabłonkowych krtani. Szczególną uwagę zwróciłam na ocenę zmian i interakcji zachodzących pomiędzy nowotworem a podścieliskiem. Ponadto, zwróciłam szczególną uwagę na interakcje zachodzące pomiędzy komórkami nowotworowymi a otaczającym je mikrośrodowiskiem, tzw. *tumor host-intereactions* (interakcja guz-gospodarz). W swoich badaniach zwracałam szczególną uwagę na ocenę poziom ekspresji oznaczanych parametrów białkowych w podścielisku nowotworu, które w świetle najnowszych badań stanowi tzw. *niszę* umożliwiającą progresję nowotworową (**Bodnar M.** i wsp. Przegl. Lek.: 2009: 66, s. 598- 602, **Bodnar M.** i wsp. Przegl. Lek. 2010: 67, s. 850-854.). Jednym z głównych nurtów moich zainteresowań stanowiła ocena zmian poziomów ekspresji metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs), jako istotnych czynników związanych z przebudową podścieliska nowotworu. Podstawowym etapem tych badań stanowiła analiza szlaków sygnalizacyjnych warunkujących stymulację lub zahamowanie ekspresji metaloproteinaz, ze szczególnym uwzględnieniem metaloproteinazy 2 (MMP2) oraz metaloproteinazy 9 (MMP9). Na realizację powyższych badań otrzymałam **grant promotorski pt.: *Szlaki ekspresji metaloproteinaz w procesie przebudowy podścieliska nowotworów w raku płaskonabłonkowym krtani.* Nr projektu N N401 020640, Narodowe Centrum Nauki.** W wyniku realizacji tych badań wykazałam, iż enzymy proteolityczne (MMP2) oraz ich aktywatory i inhibitory (MT1-MMP, MT2-MMP, TIMP3) charakteryzują się istotnym wzrostem ekspresji zarówno w komórkach nowotworowych i w podścielisku nowotworu. Uzyskane przeze mnie wyniki badań,

potwierdziły znaczenie tych enzymów jako czynników, których poziomy ekspresji w znaczący sposób różnicują pacjentów z LSCC, wskazując ich rolę jako potencjalnych czynników prognostycznych w LSCC. Ponadto zastosowane podczas realizacji niniejszych badań analizy statystyczne z zastosowaniem drzew klasyfikacyjnych, umożliwiły czytelne graficznie przedstawienie zależności w ekspresji oznaczanych białek wśród pacjentów chrakteryzujących się różnym stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Wykazałam, iż na każdym etapie tworzenia przerzutów następuje aktywacja określonych metaloproteinaz (MMP2, MMP9, MT-MMP1-2, TIMP1-3) wspomagających ten proces. Uzyskane przeze mnie wyniki badań potwierdziły tzw. "mikrośrodowiskowy model inwazji nowotworu" w LSCC. Ponadto zwróciłam szczególna uwagę na plejotropową aktywność tkankowych inhibitorów metaloproteinaz w LSCC, które w różnych warunkach wykazują zdolność do aktywacji lub zahamowania poziomów ekspresji odpowiadających im MMP.

Podsumowaniem tego okresu badań była **rozprawa doktorska** zatytułowana *„Ocena ekspresji wybranych czynników procesu nowotworowego w modelu raka płaskonabłonkowego krtani"*, której promotorem był pan Prof. dr hab. n. med. Andrzej Marszałek, na podstawie której uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, uzyskałam stopień **doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej**. Ponadto wyniki uzyskane w wyniku realizacji badań zostały opublikowane w pracach naukowych: **Bodnar M.** i wsp. Przegl. Lek. 2011: 68, s. 678-683; **Bodnar M.** i wsp. J. Oral Pathol. Med. 2013: 42, s. 267-274; **Bodnar M.** wsp. J. Oral Pathol. Med. 2015: 44, s. 437-443; Burduk*P. **Bodnar*M.** i wsp. Head Neck-J. Sci. Spec. 2015: 37, s. 418-422 oraz były prezentowane podczas licznych krajowych i zagranicznych konferencji, publikowane w materiałach zjazdowych (wykaz w załączniku nr 4).

Moje zainteresowanie rolą metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej objęły także inne dziedziny m.in. z zakresu medycyny regeneracyjnej. W ramach współpracy z Katedrą Urologii, Zakładem Medycyny Regeneracyjnej CM UMK wskazaliśmy na rolę metaloproteinaz (MMP2) w transdyferencjacji mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego w komórki podobne do wysepek oraz ich rolę w przebudowie ściany pęcherza moczowego po wykonaniu rekonstrukcji. Wyniki tych badań zostały opublikowane w publikacjach: Pokrywczyńska M., Jundziłł A., **Bodnar M.**, i wsp. Eur. Urol. Suppl. 2010: 9, s. 632; Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar, M.** i wsp. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2015: 63, s. 377-384) oraz przedstawione podczas licznych kongresów naukowych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych moje główne zainteresowania i tematyka badawcza dotyczyły biologii nowotworzenia nowotworów obszaru głowy i szyi, ale także innych nowotworów złośliwych. Jednakże główną uwagę zwróciłam na poszukiwanie swoistych markerów

diagnostycznych, będących wykładnikami procesu transformacji i progresji nowotworowej. Jednym z etapów badań była ocena nasilenia procesu neoangiogenezy poprzez ocenę średniej gęstości mikrounaczynienia wyrażoną zmianami poziomów ekspresji białka CD105 (MVD/CD105) w utkaniu raka płaskonabłonkowego krtani (SCC). W wyniki przeprowadzonych analiz wykazano, iż glikoproteina CD105 może stanowić istotny parametr będącym wykładnikiem nowo powstałych naczyń w LSCC a ocena poziomów ekspresji CD105 może stanowić ważny element prognostyczny podczas diagnostyki LSCC (**Bodnar M.** i wsp. Przegl. Lek. 2012: 69, s. 726-730). Ponadto w wyniku realizacji tego projektu kolejnym zagadnieniem, które zostało przeze mnie poruszone, była standaryzacja immunohistochemicznej oceny ekspresji oznaczanych białek. Pomimo, iż w diagnostyce patomorfologicznej rutynowo wykorzystywana jest skala wg Remmele-Stegner oraz jej modyfikacje, posiada ona wiele ograniczeń. Dlatego podczas realizacji kolejnych projektów badawczych z zastosowaniem oznaczeń immunohistochemicznych, wykorzystana została zautomatyzowana analiza morfometryczna, która opierała się na opracowaniu przez nasz zespół badawczy autorskich algorytmów wykorzystując program graficzny (ImageJ). Zastosowany sposób oceny ekspresji oznaczanych białek jest aktualnie rutynowo wykorzystywany podczas realizacji licznych projektów, a wyniki badań immunohistochemicznych ocenionych morfometrycznie zostały opublikowane w licznych pracach naszego zespołu: (**Bodnar M.** i wsp. Przegl. Lek. 2012: 69, s. 726-730; **Bodnar M.** i wsp. Adv. Med. Sci. 2014: 59, s. 206-212; Szylberg Ł., **Bodnar M.** i wsp. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2018: 66, 6, s. 463-470; Bednarek K., ..., **Bodnar M.**, i wsp. Tumor Biol. 2016: 37, s. 11115-11126) oraz licznych doniesieniach zjazdowych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4).

Następnym etapem badań była ocena poziomu ekspresji białek uczestniczących w szlaku sygnalizacyjnym PI3K/AKT/mTOR, szlaku pośredniczącego w regulacji metabolizmu, wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych oraz regulacji angiogenezy. Kolejne uzyskane przeze mnie wyniki badań wykazały różnicujące wartości poziomów ekspresji białka p27 jako czynnika różnicującego i prognostycznego u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani. Na realizację powyższych badań cyklicznie uzyskiwałam finansowanie jako **Laureat Grantów dla Młodych Naukowców Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu (MN-7/WL/2011, MN-6/WL/2012, MN-2/WL/ 2013, MN-10/WL/2014).** Ponadto za pracę pt.: „Ocena gęstości mikrounaczynienia (MVD) w raku płaskonabłonkowym krtani" **Bodnar M.** i wsp. otrzymałam **Pierwszą Nagrodę dla Młodych Naukowców za najlepszą pracę podczas** XIII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej TYTOŃ A ZDROWIE "Palenie tytoniu w kontekście współistniejących uzależnień" 7-9 listopada 2012 roku.

Istotną częścią mojej aktywności naukowej była od 2011 roku współpraca z Zespołem Naukowców z Zakładu Genetyki Nowotworów Instytutu Genetyki Człowieka, Polskiej Akademii Nauk oraz Katedrą i Kliniką Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Wydziału I Lekarskiego, UMP w Poznaniu. W ramach niniejszej współpracy prowadzone są badania dotyczące identyfikacji zmian w obrębie

genomu i epigenomu, które warunkują rozwój nowotworów z wykorzystaniem technik z zakresu biologii molekularnej i cytogenetyki, uzupełnionych o analizy funkcjonalne oraz ocenę poziomu ekspresji białek. Ponadto w listopadzie 2013 roku odbyłam staż naukowy w Zakładzie Genetyki Nowotworów, Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk, prowadząc badania molekularne dotyczące oceny biologii nowotworzenia w nowotworach obszaru głowy i szyi. Należy także nadmienić, iż od grudnia 2015 roku jestem zatrudniona na stanowisku specjalisty inżynieryjno-technicznego w Katedrze i Klinice Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Wydziału I Lekarskiego, UMP w Poznaniu, pod kierownictwem pani Profesor dr hab. Małgorzaty Wierzbickiej. Współpraca z ośrodkami naukowymi z Poznania zaowocowała szerokim zakresem prowadzonych badań dotyczących biologii nowotworzenia nowotworów obszaru głowy i szyi oraz chłoniaków Hodgkina. W ramach powyższej współpracy na uwagę zasługują przeprowadzone badania proteomiczne na liniach komórkowych raka płaskonabłonkowego krtani, a następnie na materiale tkankowym LSCC, które miały na celu ocenę zmian ekspresji białek w procesie progresji w LSCC. Przeprowadzona analiza proteomiczna umożliwiła **identyfikację 122 białek,** a spośród nich **siedmiu białek** wykazujących istotne różnice w LSCC, odpowiednio: annexynę III (ANXA3), annexynę V (ANXA5), calreticulinę (CALR), białko szoku cieplnego 60 (HSP60), białko szoku cieplnego (HSP70), PPA1 (ang. *inorganic pyrophosphatase1*) i PDIA3 (ang. *protein disulphide isomerase3*). W wyniku prowadzonych badań wykazaliśmy, iż ocena ekspresji PPA1 w procesie inwazji nowotworowej, może przyczynić się do rozwoju terapii opartej na działaniu przeciwinwazyjnym. Poziom białka PPA1 wskazuje korelację z występowaniem przerzutów w raku płaskonabłonkowym krtani. Uhonorowaniem tego projektu była praca: **Bodnar M**, i wsp. *Amino Acids* 2016; 48: 1469–76, a wyniki uzyskane w wyniku realizacji niniejszej pracy były przedstawiane na krajowych i międzynarodowych kongresach naukowych (wykaz przedstawiony w załączniku nr 4). Ponadto praca ta uzyskała **wyróżnienie za najlepszy plakat w sekcji Head and Neck Pathology** i zakwalifikowana do prezentacji ustnej, przez Komitet Organizacyjny 31st Int. Congress of the International Academy of Pathology oraz European Society of Pathology podczas 31st International Congress of the International Academy of Pathology, European Society of Pathology; w Kolonii (Niemcy), **Bodnar M.**, i wsp. 25-29.09.2016 r. W wyniku realizacji kolejnych projektów badawczych wykazano w wyniku analizy mikromacierzy genomowych wykazaliśmy nadekspresję genów: *CCNA2, CCNB1, CCNB2 i CDK1* w LSCC. A dalsze analizy wskazały, iż nadekspresja *CDK1* zarówno na poziomie mRNA jak i białka pojawia się na bardzo wczesnym etapie kancerogenezy w LSCC (Bednarek K., ..., **Bodnar M. i wsp.** Tumor Biol. 2016: 37, s. 11115-11126). Ponadto w kolejnych badaniach zwróciliśmy szczególną uwagę na zaburzenia występujące w genie *FAM107A* (3p14.3), wskazując, że współistniejąca delecja w 3p i hipermetylacja regionu promotorowego *FAM107A* jest jedną z charakterystycznych cech w LSCC, co może sugerować, że gen *FAM107A* jest obiecującym genem supresorowym zaangażowanym w rozwój LSCC (Kiwerska K., ..., **Bodnar M.** i wsp. Sci. Rep. 2017: 7, s. 1-11). Ponadto praca ta została **nominowana do Nagrody International Poster Prize,**

przyznana przez **Komitet Organizacyjny 2nd International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer and 3rd International Symposium on HPV Infection in Head and Neck Cancer, 25-27.01.2018 r.** Kiwerska K., ..., **Bodnar M.**, i wsp. 2018). Natomiast najnowsze badania koncentrują się nad molekularną oceną zmian w chłoniaku Hodgkina. W wyniku prowadzonych analiz wykazaliśmy, iż ekspresja ELF1 ulega deregulacji w cHL zarówno na poziomie genetycznym i epigenetycznym, a zatem może stanowić nowy czynnik transkrypcyjny, którego spadek ekspresji przyczynia się do utraty fenotypu komórek B przez komórki HRS (Paczkowska J., Soloch N., **Bodnar M.** i wsp. Br. J. Haematol. 2019, DOI: 10.1111/bjh.15757). Podsumowując, w wyniku powyższej współpracy byłam i jestem wykonawcą projektów NCN: pt: 1) „*Wyciszanie i analiza funkcjonalna genu CDK1 w płaskonabłonkowym raku krtani*" 2014-2017, nr projektu 2013/11/N/NZ2/02483; 2) *Analiza ekspresji genów i białek potencjalnie zaangażowanych w tworzenie przerzutów do węzłów chłonnych w nowotworach krtani.* 2016-2019. Nr projektu: UMO-2015/17/B/NZ5/00645. Jestem autorką raz współautorką licznych publikacji naukowych: Hartmann S., ..., **Bodnar M.** i wsp. J. Appl. Genet. 2012: 53, s. 167-174; Bednarek K., ..., **Bodnar M.** i wsp. Tumor Biol. 2016: 37, s. 11115-11126; Kiwerska K., ..., **Bodnar M.** i wsp. Sci. Rep. 2017: 7, s. 1-11; Byzia E., Soloch N., **Bodnar M.** i wsp. Mol. Carcinogen. 2018: 57, s. 878-885; Paczkowska J., Soloch N., **Bodnar M.** i wsp. Br. J. Haematol. 2019, DOI: 10.1111/bjh.15757) oraz doniesień zjazdowych prezentowanych podczas licznych kongresów krajowych i zagranicznych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4).

Kolejnym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań była ocena mechanizmów molekularnych i biochemicznych, zwłaszcza ich białkowych produktów, kierujących szlakami przekazywania sygnałów białek szoku cieplnego oraz szlaku liganda SDF1-L/CXCR oraz czynnika transkrypcyjnego NF-κB warunkujących tworzenie przerzutów w LSCC. Ponadto zwróciłam szczególną uwagę na wzrost ekspresji białka p16Ink4a, w przypadkach pacjentów LSCC HPV(-). Udział infekcji wirusów HPV w LSCC wciąż pozostaje niejednoznaczny, liczne badania wskazują, iż odsetek przypadków LSCC HPV(+) waha się od 1-75%, jednakże najistotniejszą kwestią jest pomimo związku z bardziej zaawansowanym stadium węzłowym, pacjenci HPV(+) charakteryzują się lepszym rokowaniem. Ponadto wskazując, iż wzrost ekspresji białka p16Ink4a wśród pacjentów HPV(-) (np. w SCC płuc także wiąże się z lepszym rokowaniem pacjentów). Możliwość wyselekcjonowania czynników zaangażowanych w proces tworzenia przerzutów, a także ocena ekspresji białka p16Ink4a były kontynuacją moich rozważań nad biologią i mechanizmem nowotworzenia w LSCC, które zostały szczegółowo opisane w monografii. Jednym z głównych celów pracy była analiza wyników umożliwiająca różnicowanie pacjentów z LSCC, a następnie ocena szlaków sygnalizacyjnych, w grupach LSCC sklasyfikowanych na podstawie różnic w poziomach ekspresji p16Ink4a. Natomiast zainteresowanie rolą, mechanizmem działania oraz zmianami w poziomach ekspresji p16Ink4a w innych niż LSCC nowotworach zostało także przedstawione w publikacjach:

Zydroń R., Marszałek A., **Bodnar M.** i wsp. Braz. J. Otorhinolaryngol. 2018: 84, s. 338-343; Zydroń R., **Bodnar M.,** i wsp. Nowa Audiofonol. 2017: 6, s. 113.

Od początku mojej pracy w celu doskonalenia warsztatu naukowego, technicznego i zawodowego brałam udział w licznych warsztatach, kursach szkoleniowych, mających na celu rozwinięcie i poszerzenie wiedzy z zakresu nowoczesnych technik histopatologicznych, zwłaszcza z zakresu immunohistochemii, technik hybrydyzacji *in situ* oraz technik z zakresu biologii molekularnej. Ponadto w 2017 roku ukończyłam studia podyplomowe na kierunku Biologia Molekularna na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie.

Prowadzenie badań naukowych na materiale tkankowym utrwalonym w formalinie oraz zatopionym w bloczki parafinowe, wymaga niezwykle restrykcyjnych procedur diagnostycznych, aby zachować niezmienioną immunoreaktywność oraz strukturę kwasów nukleinowych. Jednym z etapów mojej pracy zarówno naukowej, jak i zawodowej, jako diagnosty laboratoryjnego, było **opracowanie autorskich procedur standaryzacji zabezpieczenia materiału cytologicznego do postaci bloczków parafinowych (tzw. cell-block'i).** Znaczna utrata diagnostycznego materiału cytologicznego podczas jego przygotowania i opracowania, a także konieczność wykonania dodatkowych oznaczeń z zakresu immunohistochemii lub biologii molekularnej, skłoniła mnie do poszukiwania technik umożliwiających zabezpieczenie tego typu materiału, a także podobnie jak w przypadku materiału histologicznego utworzenie tzw. 'banku informacji o pacjencie" jakim jest materiał zabezpieczony w postaci bloczka parafinowego. Jednocześnie procedura tworzenia bloczków parafinowych z materiału cytologicznego (cell-block) musiała być w taki sposób wystandaryzowana, aby móc w dalszej kolejności przeprowadzić oznaczenia IHC lub np. FISH. Mając na celu odpowiednie zabezpieczenie i stabilizację (zachowanie immunoreaktywności komórek) badanego materiału **opracowałam autorskie procedury diagnostyczne zabezpieczenia i opracowania materiału cytologicznego.** Pierwsza wystandaryzowaną procedurą, było **opracowanie procedury przygotowania bloczków parafinowych zawierających materiał cytologiczny w albuminie surowicy bydlęcej (tzw. cell-block BSA).** A następnie opracowanie nowej techniki **cell-blocków w postaci enkapsulatów w alginianie**. W wyniku licznych prac wykazałam, że procedura enkapsulacji alginianem, umożliwiła i) zabezpieczenie materiału cytologicznego w postaci bloczka parafinowego; ii) jednorodne – równomierne rozproszenie materiału cytologicznego na całej powierzchni tzw. kulek alginianowych, dzięki czemu, każdy seryjny skrawek zawierał reprezentatywne komórki; iii) zastosowanie formaliny umożliwiło wykorzystanie rutynowo stosowanych przeciwciał przy oznaczeniach IHC, a także sond molekularnych przy rekacjach FISH. Technika enkapsulacji alginianem, jest aktualnie rutynowo stosowaną techniką w Zakładzie Patomorfologii do zabezpieczenia materiału cytologicznego po wykonaniu biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej lub zabezpieczenia materiału cytologii złuszczeniowej (mocz, płyn mózgowo rdzeniowy, BAL). Autorska technika zabezpieczenia materiału cytologicznego została wykorzystana w dwóch pracach magisterskich pt.: *„Możliwość rozszerzenia panelu badań*

materiału cytologicznego" oraz „Możliwości zwiększenia efektywności uzyskiwania materiału diagnostycznego aspiracyjnej biopsji cienkoigłowej", których byłam pomocniczym opiekunem naukowym. Ponadto techniki te były rutynowo wykorzystywane podczas realizacji licznych prac naukowych z wykorzystaniem linii komórkowych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4)

Technika enkapsulacji alginianem została także wykorzystana podczas zabezpieczenia i oceny profilu immunoreaktywności komórek nowej linii komórkowej *carcinoma mucoepidermale*, na podstawie, której wraz z zespołem naukowców otrzymałam **patent nr PL 229 507 B11 pt.: *Nowa linia komórkowa carcinoma mucoepidermale* udzielony przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej**. Przedmiotem wynalazku była nowa wyizolowana linia komórkowa pochodząca z komórek guza ślinianki z rozpoznaniem histopatologicznym raka śluzowo-naskórkowego, która może być wykorzystywana do badań *in vitro* m.in. do przeprowadzania wyciszania lub indukcji ekspresji genów, analiz funkcjonalnych określających żywotność zmodyfikowanych komórek, analiz cytotoksyczności nanokompleksów połączonych z przeciwciałem do określonych białek.

POZOSTAŁE BADANIA I WSPÓŁPRACA Z JEDNOSTKAMI NAUKOWYMI

Od początku mojej pracy naukowej prowadziłam liczne badania z Jednostkami Naukowymi CM UMK. Jednym z zagadnień w przebiegu mojej pracy naukowej, podczas którego zwróciliśmy po raz kolejny szczególną uwagę na rolę mikrośrodowiska, była ocena ekspresji białek szlaków odpowiedzi immunologicznej w tkankach popłodów pochodzących z ciąż bliźniaczych. W ramach realizacji tego projektu uczestniczyłam w realizacji **grantu dla młodych naukowców MN3/WL/2013 CM UMK**, w wyniku realizacji którego zwróciliśmy uwagę na rolę szlaków sygnalizacyjnych czynników MyD88 i NOD2, wskazując na zróżnicowane poziomy ekspresji białek TLR-2, NOD2 i NF-κB warunkujących rozwój różnic pomiędzy bliźniętami. Wyniki niniejszych badań zostały opublikowane w publikacjach naukowych z moim współautorstwem (Szylberg Ł., **Bodnar M.** i wsp. Perinatol. Neonatol. Ginekol. 2013: 6, s. 125-130; Szylberg Ł., **Bodnar** M. i wsp. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2018: 66, s. 463-470) oraz doniesieniach zjazdowych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4). Ponadto wyniki niniejszej pracy zostały przeze mnie zaprezentowane podczas **VI Kongresu Polskiego Towarzystwa Medycyny Perinatalnej,** 26-28 września 2013 roku w Poznaniu, podczas którego praca pt.: Analiza różnic immunologicznych w popłodach ciąż bliźniaczych" **Bodnar M**, Szylberg Ł. i wsp. otrzymała **Pierwszą Nagrodę Dla Młodych Naukowców**.

Poszukiwanie markerów białkowych, ocena ich lokalizacji oraz poziomów ekspresji, które w przyszłości mogą stanowić nowe markery diagnostyczne, stanowiło i nadal stanowi jeden z podstawowych nurtów moich zainteresowań. Prowadzone przez mnie w zespole naukowym Katedry i Zakładu Patomorfologii Klinicznej badania dotyczyły m.in. poszukiwania wczesnych markerów

zawału mięśnia sercowego. W wyniku wielu analiz wyselekcjonowano dwa białka h-FABP oraz MYBPC3, jako markerów umożliwiających wykrycie wczesnej fazy zawału mięśnia sercowego w autopsyjnym materiale tkankowym. Nasz zespół naukowy za powyższa pracę otrzymał **Wyróżnienie za Najlepszą Pracę W Sesji Plakatowej** praca pt.: "*h-FABP i MYBPC3 jako markery zawału mięśnia sercowego w badaniu autopsyjnym - doniesienie wstępne*" Szylberg L., **Bodnar M** i wsp. 2012, przyznaną przez Komitet Naukowy podczas XLVI Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików (III Konferencja poświęcona Digitalizacji Obrazów Mikroskopowych w Medycynie) w Poznaniu 24-26.05.2012r.

Warto również podkreślić liczną współpracę z Jednostkami CM UMK, w ramach której prowadziłam liczne badania zarówno naukowe, jak również łączyłam doświadczenie zawodowe jako diagnosty laboratoryjnego, podczas których poszukiwałam markerów białkowych, które w rutynowy sposób mogłyby być wykorzystywane w diagnostyce patomorfologicznej. W ramach współpracy z Oddziałem Klinicznym Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Dzieci i Młodzieży prowadziłam badania nad nowymi algorytmami diagnostycznymi, zwłaszcza panelami immunohistochemicznymi dotyczącymi możliwości rozszerzenia morfologicznych badań diagnostycznych u dzieci z podejrzeniem choroby Hirschsprunga: Szylberg Ł., Gałązka P., **Bodnar M.**, i wsp. Pol. J. Pathol. 2016: 67, s. 71-72. Z Katedrą i Zakładem Immunologii CM UMK badania dotyczyły oceny czynników warunkujących odpowiedź immunologiczną w błonie śluzowej żołądka u dzieci z zakażeniem Helicobacter pylori (Michałkiewicz J., ..., **Bodnar M.** i wsp. Mediat. Inflamm. 2015: 2015, s. 1-7.). W ramach współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii, Traumatologii i Urologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu wykazaliśmy udział białka FoxP3 w procesie transformacji nowotworowej w nowotworów tarczycy u dzieci (Szylberg Ł., **Bodnar M.** i wsp. Fetal Pediatr Pathol. 2014; 33, s. 84-91). W wyniku współpracy Katedrą i Zakładem Biochemii Klinicznej CM UMK prowadziłam badania dotyczące regulacji epigenetycznej w nowotworzeniu raków jelita grubego, zwłaszcza zmian w poziomach ekspresji TET, AID oraz TDG (Dziaman T., ..., **Bodnar M,** i wsp, Clin. Epigenet. 2018: 10, s. 1-11). We współpracy z Katedrą Chirurgii Ogólnej, Chirurgii Wątroby i Chirurgii Transplantacyjnej CM UMK prowadziłam badania dotyczące aktywności metaloproteinaz oraz roli apoptozy w etiopatogenezie przepuklin pachwinowych u otyłych pacjentów (Szczęsny W., **Bodnar M.** i wsp. J. Surg. Res. 2013: 180, s. 260-265). Ponadto w wyniku współpracy z Katedrą i Kliniką Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej CM UMK uczestniczyłam w badaniach opisu przypadków dotyczących oceny diagnostycznej i postepowaniem w rzadkich zmianach: *histiocytoid eccrine sweat gland carcinoma of eyelids* (gruczolaku potowym ekrynowym histioidnym) (Seredyka-Burduk, Burduk P., **Bodnar M.**, i wsp. Braz. J. Otorhinolaryngol 2018: 84, s. 665-668) oraz diagnostyki różnicowej gruczolaka wielopostaciowego (*pleomorphic adenoma*) w jamie nosowej (Wierzchowska M., **Bodnar M.**, i wsp. Wideochirurgia Tech. Małoinwazyjne 2015: 10, 332-336. We współpracy z Katedra i Kliniką Położnictwa, Chorób Kobiecych i Ginekologii Onkologicznej

CM UMK prowadziłam badania dotyczące oceny biologii i zmian molekularnych m.in. w rakach szyjki macicy, endometrium oraz jajnika. W wyniku realizacji niniejszej współpracy powstały publikacje naukowe: Maciejewska J., Walentowicz M., **Bodnar M** i wsp. Przegl. Lek. 2010: 67, s. 847-849; Jabłonowska D., Marszałek A, **Bodnar M.** Przegl. Lek.: 2012: 69, s. 740-743; Sadłecki P., **Bodnar M i wsp.** BioMed Res. Int. 2014: 2014, s. 1-11; Walentowicz-Sadłecka M., Sadłecki P., **Bodnar M. i wsp.** PLoS ONE, 2014: 9, s. e84629; Sadłecki P., Walentowicz P., **Bodnar** M., i wsp. Tumor Biol. 2017: 39, s. 1-8.

Dodatkowo w 2009 roku rozpoczęłam współpracę **z Katedrą i Kliniką Urologii, Zakładem Inżynierii Tkankowej oraz Zakładem Medycyny Regeneracyjnej Bank Komórek i Tkanek CM UMK**, która kontynuowana jest do dzisiaj i została udokumentowana licznymi publikacjami i doniesieniami zjazdowymi (szczegółowy wykaz w załączniku nr 4). Ponadto wyniki badań w ramach powyższej współpracy naukowej zostały licznie nagradzane na kongresach naukowych, zarówno krajowych i międzynarodowych. Uzyskaliśmy **Pierwszą Nagrodę W Kategorii Karl Storz Tissue Engineering of the Urinary Bladder**: za pracę pt.: "*Trophic effect of mesenchymal stem cells in reconstruction of the rat bladder wall*" przyznaną przez komitet naukowy podczas EAU 4th North Eastern European Meeting - NEEM, 10-11 wrzesień 2010 Riga, Latvia. Ponadto otrzymaliśmy **Wyróżnienie za Najlepszą Pracę w Sesji Nauk Podstawowych i Inżynierii Tkankowej Tissue Engineering of the Urinary Bladder**: za pracę pt: "*Trophic effect of mesenchymal stem cells in reconstruction of the rat bladder wall*". 2011, przyznaną podczas 26th Annual EAU Congress18-22.03.2011 w Wiedniu. W wyniku badań prowadzonych w ramach współpracy realizowałam także liczne projektu badawcze: *Poznanie procesu gojenia pęcherza moczowego drogą do jego regeneracji*, NCN, 2012/07/D/NZ1/00854; *Rola komórek macierzystych tkanki tłuszczowej w regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego świni.* MNiSW Juventus Plus IV.

Jednym z głównych obszarów moich badań prowadzonych w ramach **współpracy z Katedrą i Kliniką Urologii, Zakładem Inżynierii Tkankowej oraz Zakładem Medycyny Regeneracyjnej Bank Komórek i Tkanek CM UMK** była ocena morfologii i immunofenotypu wyizolowanych komórek macierzystych, pod względem ich przydatności w regeneracji tkanek i narządów. Szczególnym wyzwaniem dla technik z zakresu inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej jest uzyskanie właściwych, zdolnych do różnicowania komórek macierzystych oraz ich właściwa charakterystyka. Głównym zagadnieniem prowadzonych przeze mnie badań było porównanie i ocena potencjału wyizolowanych mezenchymalnych komórek macierzystych m.in. ze szpiku kostnego, z płynu owodniowego, tkanki tłuszczowej, a także z łożyska czy miazgi zębowej. A także m.in. ocena morfologiczna po różnicowaniu komórek macierzystych w komórki produkujące insulinę oraz ocena wpływu diety na czynność izolowanych wysp trzustkowych (Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Arch Immunol Ther Ex, 2013, 61, s. 149-58; Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Arch Immunol Ther Exp, 2015, 63, s. 377-384, Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Pancreas, 2014:

43, s. 801-808). Ponadto przeprowadzałam analizę przydatności nowych biomateriałów (sztucznych: poli-laktydo-ko-kaprolaktonu (PLCL); podśluzówki jelita cienkiego, kompozytu biomateriału naturalnego i sztucznego) służących do regeneracji rekonstruowanej ściany pęcherza moczowego. Głównym celem tych badań była ocena regeneracji mięśni gładkich, ale także ocena gęstości mikrounaczynienia, ocena intensywności stanu zapalnego poprzez ocenę białkowym markerów. Ponadto prowadzone przeze mnie analizy miały na celu analizę ekspresji białek w pęcherzach gojących się poprzez regenerację i naprawę, które były rekonstruowane przy pomocy matryc pokrytych komórkami macierzystymi lub samymi matrycami. Spośród licznych publikacji można wymienić m.in.: Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. PLoS ONE: 2014: 9, s. e105295; Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Biol. Proced. Online, 2016: 18, s. 1-15; Pokrywczyńska M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Cell Transplant. 2017: 26, s. 1780-1791. Szczegółowy wykaz publikacji i doniesień konferencyjnych znajduje się w załączniku nr 4. Kolejne badania obejmowały szerokie zastosowanie komórek macierzystych oraz biomateriałów w ocenie rekonstrukcji powłok brzusznych i wykorzystaniu komórek macierzystych do stymulacji procesu gojenia ran (Nowacki M., ..., **Bodnar M.** i wsp. BioMed Res. Int. 2015: 2015, s. 1-8.). Natomiast najnowsze badania dotyczyły wykorzystania ich w medycynie estetycznej i chirurgii plastycznej, jako nowych wypełniaczy zbogaconych w komórki macierzyste (Nowacki M., ..., **Bodnar M.** i wsp. Aesthet. Surg. J. 2014: 34, s. 1261-1269; Kozłowska J., ..., **Bodnar M.** i wsp. Mater. Lett. 2018: 221, s. 74-76). Uczestniczyłam także w ocenie optymalizacji metody izolacji i hodowli komórek macierzystych izolowanych z mieszków włosowych szczura oraz ocenie ich potencjalnego zastosowania w rekonstrukcji pęcherza moczowego poprzez ocenę ich cech morfologicznych (Drewa T., ..., **Bodnar M. i wsp.** Int. J. Urol. 2013: 20, s. 537-542).

Innymi realizowanymi przeze mnie badaniami była ocena obecności komórek macierzystych w jajowodzie kurzym, które realizowałam we współpracy z Katedrą Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (nr projektu 2011.03/N/N29/03814), którego uczestniczyłam w badaniach. Natomiast współpraca ta, została udokumentowana publikacjami i doniesieniami zjazdowymi (Stadnicka K, ..., **Bodnar M.**, i wsp. Folia Biol, 2014, 62: s. 179-185; Stadnicka K, **Bodnar M.**, i wsp. Folia Biol, 2016, 64: 37-46).

Moje najnowsze badania dotyczą oceny biologii nowotworzenia na poziomie molekularnym i markerów proteomicznych w nowotworach ślinianek. Nowotwory ślinianek stanowią niezmiernie heterogenną grupę nowotworów. Moje badania dotyczyły oceny mutacji w genie *BRAF*, ponieważ zwróciłam uwagę, iż w literaturze dostępnych jest niewiele doniesień dotyczących tego zagadnienia w nowotworach ślinianek (**Bodnar M i wsp.** J. Oral Pathol. Med. 2017: 46, 340-345). Kolejne badania będą dotyczyły oceny mechanizmu procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego, w celu doboru

odpowiedniego postępowania terapeutycznego z uwzględnieniem możliwie jak najszerzej przeprowadzanej diagnostyki i dobranie celowanych/spersonalizowanych strategii terapeutycznych.

Podsumowaniem mojej pracy naukowej było otrzymanie **nagrody zespołowej II° Rektora UMK w Toruniu** za osiągnięcia uzyskane **w dziedzinie naukowo-badawczej** w 2015 roku oraz **Indywidualnego Stypendium Naukowego przyznanego przez JM Rektora CM UMK za wybitne osiągniecia naukowo-badawcze dla Młodego Naukowca w 2018.**

PODSUMOWANIE			
	Liczba prac	Punktacja IF	punktacja KBN/MNiSW
Prace oryginalne:			
Publikacje z IF	48	112,359	1199
Publikacje bez IF	13	-	80
Prace poglądowe	1	-	6
Patent	1	-	30
razem	62	112,359	1315
Komunikaty naukowe:	118		
na zjazdach ogólnokrajowych	68		
na zjazdach międzynarodowych	50		

	WoS	Scopus	Google Scholar
Lliczba cytowań	292	343	498
Indeks Hirscha	9	11	13

5.2. Działalność dydaktyczno- wychowawcza i organizacyjna

1) Rozpoczynając pracę jako asystent w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej CM UMK od **podstaw opracowałam i przygotowałam autorski program ćwiczeń laboratoryjnych** z zakresu patomorfologii i cytologii dla studentów II, III roku analityki medycznej, studentów II, III, IV roku kierunku lekarskiego, słuchaczy podyplomowych studiów z zakresu analityki medycznej oraz studentów interdyscyplinarnych studiów kierunku inżynieria biomedyczna (studia interdyscyplinarne, Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy oraz Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy) z zakresu Elementów diagnostyki laboratoryjnej.

Opracowane przeze mnie tematy ćwiczeń obejmowały najnowszą wiedzę i umiejętności z zakresu przygotowania i opracowania materiału histopatologicznego do badań; histochemicznych metod barwień; badań immunohistochemicznych; metod fluorescencyjnych stosowanych podczas rutynowej diagnostyki materiału histologicznego; metod z zakresu biologii molekularnej stosowanych

w zakładach patomorfologii, które obejmowały techniki hybrydyzacji *in situ* (fluorescencyjnej oraz z wykorzystaniem chromogenów), NGS, PCR, RT-PCR, WB. Ponadto w zakresie cytologii klinicznej tematyka zajęć dotyczyła nowoczesnych technik przygotowania i opracowania materiału cytologicznego do badań cytopatologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem zabezpieczenia materiału (tworzenie tzw. cell-block'ów) do badań z zakresu technik specjalnych (IHC, FISH). Wprowadziłam zagadnienia dotyczące cytologii na podłożu płynnym (LBC) z zakresu przygotowania i opracowania materiału cytologicznego. Ponadto dysponując biblioteką preparatów LBC i konwencjonalnych rozmazów cytologii ginekologicznej i nieginekologicznej przedstawiam studentom pracę cytomorfologów klinicznych w zakładach patomorfologii.

2) W 2015 od podstaw stworzyłam **autorski program** oraz autorski sylabus ogólnouczelnianych **wykładów fakultatywnych** pt.: *Nowoczesne technologie wykorzystania materiału tkankowego*, których byłam osobą odpowiedzialną za realizację przedmiotu.

3) Od **podstaw przygotowałam i opracowałam tematy ćwiczeń laboratoryjnych** dla studentów II, III, IV roku kierunku lekarskiego **studiów anglojęzycznych**, organizowanych przez Centrum Kształcenia w Języku Angielskim Collegium Medicum UMK.

4) Opracowałam i przygotowałam **autorskie wykłady** dla studentów II, III roku kierunku analityka medyczna oraz II i III roku kierunku lekarskiego.

5) Od 2008 roku jestem odpowiedzialna za organizację oraz przygotowanie zajęć dla kierunku analityka medyczna z zakresu Patomorfologii oraz Cytologii Klinicznej. **Opracowałam i przygotowałam wewnętrzne programy nauczania Patomorfologii, Cytologii Klinicznej** oraz wewnętrzne Regulaminy Dydaktyczne Studiów, sylabusy, karty umiejętności kształcenia studentów, regulaminy zajęć dla studentów z zakresu Patomorfologii, Cytologii dla kierunku analityka medyczna oraz kierunku lekarskiego (studia polsko i angielskojęzyczne). Przygotowałam Karty Umiejętności praktycznych na wszystkich przedmiotach prowadzonych na kierunku lekarskim w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej CM UMK. Ponadto jestem osobą odpowiedzialną za planowanie i rozliczanie godzin dydaktycznych w uniwersyteckim systemie UFI.

6) Od 2014 roku jestem **opiekunem naukowym Studenckiego Koła Naukowego w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Klinicznej CM MK** (studentów analityki medycznej oraz biotechnologii). W ramach działalności koła studenckiego, wyniki uzyskane w ramach prowadzonych w 2015 roku badań zostały wygłoszone na konferencjach naukowych dla studentów i młodych naukowców (II Ogólnopolska Konferencja Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów Wschodząca Diagnostyka" Białystok, 18.04.2015; III Konferencja LTSAM.

I Ogólnopolskie Symulacje Diagnostyczne. Lublin, 30-31.05.2015.). Ponadto na II Ogólnopolskiej Konferencji Studentów Medycyny Laboratoryjnej i Młodych Diagnostów "Wschodząca Diagnostyka" w Białystoku, studentka Adrianna Czyżnikiewicz zdobyła **I miejsce wśród najlepszych prac studenckich**, za pracę pt.: Ocena ekspresji białek Hsp27 i Hsp70 w raku płaskonabłonkowym krtani", **której byłam promotorem**. Ponadto byłam opiekunem realizowanego grantu studenckiego pt: „*Wykrywanie rakowych komórek macierzystych (CSC) w raku pęcherza moczowego*".

7) W ramach **współpracy z zagranicą**, w latach 2011 – 2015, byłam **opiekunem naukowym gości z zagranicy**: lek med. Tatiana Tadeushevena Shtabinskaya, dr Andrei Vasilievich Shulha z Akademii Medycznej w Grodnie, Zakładu Anatomii Patologicznej. W ramach tej współpracy byłam **opiekunem naukowym badań** prowadzonych przez lek med. Tatiana Tadeushevena Shtabinskaya, dr Andrei Vasilievich Shulha. Ponadto wyniki badań uzyskane w ramach prowadzonych projektów naukowych stały się **podstawą rozprawy doktorskiej** lek med. Tatiana Tadeushevena Shtabinskaya oraz były publikowane w czasopismach naukowych.

Ponadto w 2015 roku zostałam zaproszona do Akademii Medycznej w Grodnie, w celu przeprowadzenia szkolenia z zakresu nowoczesnych technik histopatologicznych, immunohistochemicznych oraz zaprezentowania wyników badań naukowych podczas konferencji pt.:" Hereditary Disorders Of The Connective Tissue" w Educational Institution Grodno State Medical University" 21-24.10.2015, Grodno, Białoruś

8) Jestem **opiekunem pomocniczym dwóch rozpraw doktorskich**:

1. lek. Natalia Skoczylas-Makowska, 2015-aktualnie, Rozprawa doktorska pt: *Ekspresja i rola wybranych białek szoku cieplnego w raku płaskonabłonkowym krtani-badania morfologiczne.* Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu, promotor pomocniczy
2. lek. Ewelina Bartkowiak, 2019 – aktualnie, Rozprawa doktorska pt.: „*Analiza kliniczna i molekularna guzów złośliwych dużych gruczołów ślinowych na przestrzeni 22lat w materiale Kliniki Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu*" Katedra i Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Uniwersytet im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, promotor pomocniczy

9) Od 2017 **jestem członkiem Zespołu Redakcyjnego *Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, The Journals Frontiers in Surgery**. Ponadto jestem **czynnym recenzentem w pięciu międzynarodowych czasopismach naukowych** (Journal of Oral Pathology & Medicine; Cancer Medicine; Cancer Immunology; Frontiers in Cell and Developmental Biology, Clinical Otolaryngology).

10) Od 2008 roku jestem członkiem: Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Oddział Bydgoszcz oraz Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajduje się w załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Magdalena Bodka