

Autoreferat

dr n. rolniczych w dyscyplinie weterynaria

Agata Mikołajczyk-Martinez

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 2023

1. Imię i nazwisko.

Agata Mikołajczyk-Martinez

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

21.02.2012 – tytuł lekarza weterynarii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

28.06.2022 – stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Rola fimbrii typu 1 w adhezji i inwazji oraz przeżywalności i cytotoksyczności pałeczek *Salmonella Gallinarum* i *Salmonella Enteritidis* wobec kurzych linii komórkowych”.

Promotor: prof. dr hab. Maciej Ugorski

Recenzenci:

Prof. dr hab. Beata Sobieszcańska

Prof. dr hab. Andrzej Koncicki

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

01.10.2022 – do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska

01.09.2022 – do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu (aktualnie przebywam na urlopie naukowym)

01.10.2014– 31.08.2022 – asystent w Katedrze Biochemii i Biologii Molekularnej

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:

„Eksperymentalne terapie nowotworów otrzewnej na modelach komórkowych oraz modelu zwierzęcym świni domowej (*Sus scrofa domestica*)”

Cykl obejmuje 4 oryginalne prace opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 12,968 a łączna liczba punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki to 240.

4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

P1. Mikolajczyk, A.; Khosrawipour, V.; Schubert, J.; Grzesiak, J.; Chaudhry, H.; Khosrawipour, T. Effect of Liposomal Doxorubicin in Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Journal of Cancer* **2018**, 9, 5. doi: 10.7150/jca.26860 (IF=3,182; 30 pkt. MNiSW)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam współautorem koncepcji badawczej, byłam odpowiedzialna za pozyskanie tkanek do badań, opracowałam układ eksperymentalny oraz wykonałam zaplanowane eksperymenty. Dokonałam analizy większości wyników, pisałam część manuskryptu.

P2. Mikolajczyk, A.; Khosrawipour, T.; Kulas, J.; Migdal, P.; Arafkas, M.; Nicpon, J.; Khosrawipour, V. The Structural Effect of High Intensity Ultrasound on Peritoneal Tissue: A Potential Vehicle for Targeting Peritoneal Metastases. *BMC Cancer* **2020**, 20, 481, doi:10.1186/s12885-020-06981-4. (IF=4,430; 100pkt. MNiSW)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam współautorem koncepcji badawczej, byłam odpowiedzialna za pozyskanie tkanek do badań, opracowałam układ eksperymentalny oraz wykonałam zaplanowane eksperymenty. Dokonałam analizy wyników, pisałam część manuskryptu.

P3. Mikolajczyk, A.; Khosrawipour, V.; Lau, H.; Li, S.; Migdal, P.; Labbé, M.K.; Kielan, W.; Nicpon, J.; Stieglitz, S.; Khosrawipour, T. Exploring the Potential of Taurolidine in Inducing Mobilization and Detachment of Colon Cancer Cells: A Preliminary in-Vitro Study. *BMC Pharmacol Toxicol* **2022**, 23, 38, doi:10.1186/s40360-022-00572-8. (IF=2,605; 70pkt. MEiN)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam współautorem koncepcji badawczej, opracowałam układ eksperymentalny oraz wykonałam zaplanowane eksperymenty. Dokonałam analizy wyników, pisałam część manuskryptu.

P4. Thelen, S.; **Mikolajczyk-Martinez, A.**; Diakun, A.; Khosrawipour, T.; Zielinski, K.; Nicpoń, J.; Kielbowicz, Z.; Prządka, P.; Liszka, B.; Kuroпка, P.; Li, S.; Lau, H.; Kielan, W.; Khosrawipour, V. Evaluating the Concept of Gas-based Intraperitoneal Hyperthermia beyond 43°C in the Treatment of Peritoneal Metastasis: A Pilot Study. *Experimental and Therapeutic Medicine* **2022**, 24 (6), 1–9. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11687>. (IF=2,75; 40pkt. MEiN)

Udział własny: W niniejszej publikacji byłam współautorem koncepcji badawczej, byłam odpowiedzialna za uzyskanie zgody komisji bioetycznej, współprojektowałam badania, koordynowałam pracę zespołu wykonującego eksperymenty na świniaach oraz współwykonywałam i uczestniczyłam w eksperymentach. Wykonywałam wszystkie eksperymenty in vitro. Dokonałam analizy części wyników z badań in vivo i wszystkich wyników z części in vitro, pisałam część manuskryptu.

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie:

Śródotrzewnowy rozsiew nowotworów jest obecnie dużym problemem w medycynie ludzkiej a w medycynie weterynaryjnej stanowi coraz częściej diagnozowaną jednostkę chorobową [1–3]. Szacuje się, że śmieć 30-50% psów i kotów jest wynikiem choroby nowotworowej. Z kolei postępujący rozwój w naukach medycyny weterynaryjnej, sprawia, że coraz więcej zwierząt dożywa swojej fizjologicznej starości [4]. Dlatego też istnieje duże prawdopodobieństwo, że nowotwory będą coraz częściej wykrywanymi jednostkami chorobowymi, a co za tym idzie zwiększy się również ilość rozpoznawanych nowotworów otrzewnej. W przypadku psów i kotów opisano rozsiewy nowotworowe w postaci rakowatości oraz mięsakowatości otrzewnej, które powstały w wyniku przerzutowania nowotworów pierwotnych z: jelit, nerek, śledziony, trzustki, tarczycy, płuc, jajnika, naczyń oraz kości [5], rzadziej występują nowotwory pierwotne w postaci międzybłoniaka otrzewnej [6]. Obecnie nie ma w medycynie weterynaryjnej ustandaryzowanego protokołu leczenia tego typu nowotworów, ani systemowego ani zależnego od lokalizacji guza pierwotnego. Ze względu na złe rokowania pacjenci często poddawani są eutanazji [2,7], natomiast w przypadku podjęcia leczenia, stosuje się chirurgiczne usuwanie guzów, chemioterapię systemową oraz chemioterapię dootrzewnową, co prowadzi do wydłużenia przeżycia zwierząt nawet do 3 lat [6,8].

U ludzi ta jednostka chorobowa jest głównie wynikiem przerzutowania nowotworów przewodu pokarmowego oraz żeńskich narządów płciowych, natomiast rzadziej odnotowuje się nowotwory pierwotne otrzewnej (międzybłoniak, śluzak rzekomy). Leczenie rakowatości otrzewnej stanowi aktualny problem w onkologii człowieka, a grupa pacjentów jest stosunkowo

liczna i obejmuje około 15% chorych na raka jelita grubego i około 40% chorych na raka żołądka oraz nawet do 70% kobiet chorych na raka jajnika [9–11]. Pacjenci z rozpoznaniem tej jednostki chorobowej mają złe rokowania i statystycznie nie przeżywają pierwszego roku po postawieniu diagnozy ze względu na szybką progresję nowotworu oraz komplikacje, które temu towarzyszą [12,13]. Należy podkreślić, że dostępne metody terapeutyczne wciąż są mało skuteczne i obciążone wieloma komplikacjami. Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń leczenia tego typu nowotworów jest brak skutecznej chemioterapii systemowej wynikającej z wchłaniania się chemioterapeutyku w trakcie obiegu w organizmie, a przez to braku możliwości osiągnięcia terapeutycznego stężenia leku w otrzewnej [14,15]. W związku z tym, w latach 80. XX wieku podjęto próby leczenia miejscowego, poprzez zastosowanie chemioterapii wewnątrzotrzewnowej, która umożliwiła zwiększenie biodostępności chemioterapeutyku do guzów nowotworowych. Takie leczenie często połączone jest z zabiegiem chirurgicznym cytoredukcji oraz chemioterapią systemową [16–18]. W dalszym rozwoju metod terapeutycznych zaczęto stosowanie chemioterapeutyków o temperaturze wyższej, od temperatury fizjologicznej ciała i opracowano metodę chemioterapii dootrzewnowej w hipertermii wraz z zabiegiem cytoredukcji (**Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy; CRS+HIPEC**) [19–21]. Metoda ta łączy chirurgiczne usuwanie guzów nowotworowych rozsianych w otrzewnej z chemioterapią bezpośrednią stosowaną wewnątrzotrzewnowo, w której stosowany chemioterapeutyk podgrzewany jest do temperatury 41–43°C. Może ona prowadzić do długotrwałej kontroli choroby i wydłużyć czas przeżyć u chorych. Jednakże odsetek pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem otrzewnej, którzy kwalifikują się do zabiegu CRS+HIPEC jest bardzo niewielki. Wnika to z faktu, iż pacjenci muszą spełnić szereg wymagań zdrowotnych, aby móc być poddany tej terapii, a wykluczenia obejmują: przerzuty pozaotrzewnowe, wyniszczenie, zaburzenia białkowo-elektrolitowe, obciążenia kardiologiczne, niewydolność nerek, niewydolność wątroby, wiek pacjenta powyżej 60 r.ż., otyłość i in. [22–24]. Ponadto zabieg HIPEC, ze względu na swoją inwazyjność jest obciążony wieloma powikłaniami i wysoką śmiertelnością po zabiegu. Stąd chorzy, którzy nie kwalifikowali się do zabiegu CRS+HIPEC nie mieli dostępnej, skutecznej alternatywy leczenia. Dlatego poszukiwano nowych rozwiązań terapeutycznych dla tej grupy pacjentów, co spowodowało opracowanie i wprowadzenie nowej metody terapeutycznej: PIPAC (**Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy; PIPAC**), czyli wewnątrzotrzewnowej podciśnieniowej chemoterapii w aerozolu. Stanowi ona połączenie technik laparoskopii z nowoczesnym sposobem wewnątrzotrzewnowego dostarczania chemioterapeutyku do jamy otrzewnej. Leczenie tą metodą zastosowano po raz pierwszy w

Niemczech w 2001 roku (pierwsze zastosowanie metody w Polsce w 2017 roku) i do tej pory jest ona udoskonalana i stosowana w wielu ośrodkach (ponad 100) na świecie [25–27]. Wskazaniem do podjęcia terapii tą metodą jest wieloogniskowy rozsiew nowotworowy w obrębie jamy otrzewnej, przy którym pacjent nie kwalifikuje się do zabiegu CRS+HIPEC, czyli jako terapia paliatywna. Ostatnio również zaczęto ją stosować jako terapię neoadjuwantową, umożliwiającą, po częściowej remisji nowotworu, zastosowanie w drugiej kolejności zabiegu CRS+HIPAC [28–30]. PIPAC wykazał również inne korzyści w porównaniu ze standardową chemioterapią wewnątrzotrzewną (Intraperitoneal chemotherapy; IPC) lub HIPEC, takie jak: zmniejszenie dawki chemioterapeutyku [27] i lepszą dystrybucję w jamie otrzewnej [31]. Niemniej jednak dystrybucja w jamie otrzewnej oraz stopień penetracji chemioterapeutyku w głąb tkanki, przy zastosowaniu tej terapii, nadal nie jest optymalny [31,32]. Dlatego niezbędne jest testowanie i analiza możliwości wykorzystania nowych technik, które pokonają te bariery, umożliwiając tym samym większą wyleczalność wśród pacjentów dotkniętych rakowatością otrzewnej. Dotychczas, tak jak już wcześniej wspomniano, główne metody terapeutyczne w leczeniu tej jednostki chorobowej to: chemioterapia systemowa, wewnątrzotrzewnowa chemioterapia bezpośrednia, chemioterapia w hipertermii (HIPAC) oraz wewnątrzotrzewnowa podciśnieniowa chemioterapia w aerozolu (PIPAC). Coraz częściej podejmowane są próby udoskonalania i modyfikacji powyższych metod oraz wprowadzania nowych procedur, które stosowane w leczeniu innych schorzeń nowotworowych, mogą być również skuteczne w terapii rozsianych nowotworów powierzchni otrzewnej.

Niniejsze opracowanie zawiera w sobie elementy medycyny translacyjnej, które mają potencjał dwukierunkowy:

- (1) Od ludzi do zwierząt – terapia, leki i procedury stosowane w medycynie ludzkiej mogą z powodzeniem zostać przetestowane i zastosowane w medycynie weterynaryjnej.
- (2) Od zwierząt do ludzi - zastosowanie modelu świńskiego w badaniach przedklinicznych na potrzeby medycyny ludzkiej.

Ad.1. Biorąc po uwagę zbieżność części nowotworów pierwotnych, które mogą podobnie przerzutować do otrzewnej u ludzi oraz u psów i kotów jak również brak efektywnego leczenia i ustandaryzowanych protokołów terapeutycznych w medycynie weterynaryjnej a także powyżej opisane ograniczenia w medycynie ludzkiej, niniejsze opracowanie ma realny potencjał do translacji badań w kierunku medycyny weterynaryjnej. Również fakt, iż przy

leczeniu psów i kotów, stosowane terapie są tożsame z terapią stosowaną u ludzi, świadczy o wysokim potencjale translacji badań nad nowotworami otrzewnej.

Ad.2. Pomimo rozlicznych modeli nowotworów ludzkich na myszach oraz naczelnych innych niż człowiek (non-human primates; NHP), odnotowuje się 18,1% niepowodzeń w badaniach klinicznych pierwszej fazy. Jedną z głównych przyczyn niepowodzeń badań klinicznych pierwszej fazy są komplikacje, których nie zaobserwowano w badaniach przedklinicznych. Wynika to m.in. z niemożności dokładnego przewidzenia skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowych u ludzi, przy użyciu obecnie dostępnych modeli nowotworów na małych zwierzętach w fazie badań przedklinicznych. Ta krytyczna kwestia wspiera potrzebę tworzenia nowych modeli nowotworów, na dużych zwierzętach takich jak świnie. Może to poprawić przewidywalność skuteczności terapii oraz efektów ubocznych, jakie mogą wystąpić przy proponowanym leczeniu u ludzi. Świnie, ze względu na ich anatomiczne, fizjologiczne, immunologiczne, metaboliczne i genetyczne podobieństwo do ludzi, są istotnymi zwierzętami modelowymi do badań chorób ludzkich. Świnie są również szeroko wykorzystywane w opracowywaniu i testowaniu urządzeń medycznych do różnych zastosowań klinicznych, w tym w terapiach regionalnych nowotworów pod kontrolą radiologii interwencyjnej, a także są powszechnym modelem w terapii bezpośredniej nowotworów otrzewnej. W rakowatości otrzewnej kluczową kwestią jest uwzględnienie objętości i powierzchni jamy brzusznej, lokalizacji guzów nowotworowych oraz możliwości użycia i sprawdzenia skuteczności urządzeń do ich terapii. Dodatkowo, w przypadku stosowania terapii hipertermicznej w jamie otrzewnej zachodzą procesy absorpcji energii, jej wymiany, termoregulacji poprzez unaczynienie otrzewnej i jej narządów, które to procesy są zależne od wielkości, masy i metabolizmu danego zwierzęcia. Dlatego wprowadzenie modelu świnie w badaniach nad rakowatością otrzewnej jest jedyną możliwością jak najbliższego oddania specyfiki tej choroby i jej leczenia, przybliżoną do ludzkiej

W przedstawionym przeze mnie dokonaniu oceniłam możliwość zastosowania oraz stabilność i fizyczne właściwości nanocząsteczek liposomalnych zawierających doksorubicynę, **(P1)**; Możliwość zastosowania i korzyści, jakie może przynieść implementacja ultradźwięków w leczeniu nowotworów otrzewnej **(P2)**; Ponadto odkryłam, że lek, taurolidyna, który znany jest z działania przeciwbakteryjnego, a cieszy się coraz większym zainteresowaniem jako lek przeciwnowotworowy, może potencjalnie prowadzić do zwiększenia przerzutowania komórek nowotworu ludzkiego raka jelita grubego **(P3)** oraz dokonałam oceny koncepcji dootrzewnowego podania hipertermii gazowej powyżej 43°C **(P4)**

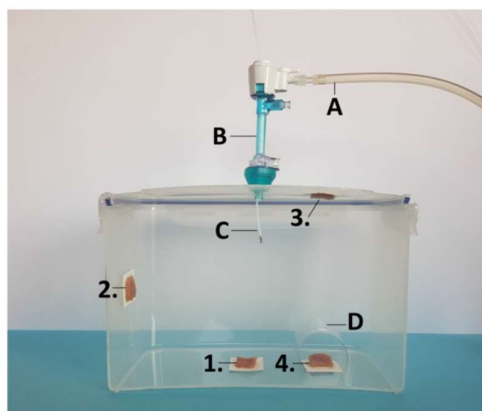
4.3.2. Omówienie wyników osiągnięcia.

Publikacja 1. Mikołajczyk, A.; Khosrawipour, V.; Schubert, J.; Grzesiak, J.; Chaudhry, H.; Khosrawipour, T. Effect of Liposomal Doxorubicin in Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Journal of Cancer* 2018, 9, 5. doi: 10.7150/jca.

Stosowanie chemioterapii dootrzewnowej stało się powszechną praktyką dostarczania leków przy zmianach nowotworowych zlokalizowanych w jamie otrzewnej, a jej celem jest zwiększenie dostępności, a przez to wnikania chemioterapeutyku, z jamy otrzewnej, w głąb komórek nowotworowych [16,17,33]. Skomplikowany mechanizm transportu przez otrzewną oraz odmienna dyfuzja leków w głąb otrzewnej prawidłowej, w stosunku do transportu leków do guzków nowotworowych powierzchni otrzewnej, sprawiają, że wciąż poszukiwane są najbardziej efektywne formy dostarczania leków przeciwnowotworowych w trakcie terapii. [34–36]. Szybkie wchłanianie się drobnocząsteczkowych chemioterapeutyków do krwiobiegu, jest powodem niemożności dłuższego ich działania i osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego w jamie otrzewnej [37]. Dlatego jednym z wyzwań jest zastosowanie takiej postaci leku, który charakteryzowałby się wydłużonym działaniem w jamie brzusznej, tym samym wolniejszym wchłanianiu do krwiobiegu i mniejszą toksycznością wobec pozostałych tkanek, a dodatkowo był selektywny wobec komórek nowotworowych i miał możliwość wnikania do nich [38,39]. Stąd pojawiła się koncepcja dostarczania leków z nośnikami w postaci nanocząsteczek, które mogą mieć postać polimerów, lipidów, metali i węgla. Na szczególną uwagę zasługują cząsteczki liposomalne, ze względu na dobrą biokompatybilność, unikalną strukturę pozwalającą na zamykanie w swojej otoczce zarówno leków hydrofilowych jak i hydrofobowych oraz możliwość kontrolowanego uwalniania z nich substancji terapeutycznej [35]. Istnieją doniesienia o stosowaniu liposomalnej doksorubicyny w procedurze CRS + HIPAC, które wykazały dobrą tolerancję leku przez pacjentów, z zachęcającym wskaźnikiem przeżyć a ich farmakokinetyka wskazuje na możliwość przedłużonego działania takiej postaci leku w jamie otrzewnej [40,41]. Nie było natomiast do tej pory żadnych badań, które testowałyby możliwość wykorzystania liposomalnej doksorubicyny (LD) w procedurze PIPAC.

Celem przedstawionej przeze mnie pracy była ocena możliwości zastosowania liposomalnej doksorubicyny (LD) w procedurze PIPAC. Dokonałam tego poprzez analizę stabilności cząsteczek LD w trakcie wykonywania tej procedury oraz pomiar głębokości ich wnikania w otrzewną, przeprowadzoną na modelu *ex vivo* z wykorzystaniem tkanek świni.

Badanie zostało przeprowadzone na świeżej tkance otrzewnej świni, która została podzielona na 12 próbek o wymiarach: 4,0×4,0×0,5 cm. Próbki zostały umieszczone w czterech różnych pozycjach, w plastikowym pojemniku, o pojemności 3,5L, który stanowi model jamy brzusznej (**Ryc.1.**). W środkowej części pokrywy pojemnika, poprzez otwór wprowadzono trokar o średnicy 5mm, przez który wprowadzono mikrokateter (MC, PW-205V Olympus Surgical Technologies Europe), zatwierdzony przez amerykańską agencję żywności i leków (FDA).



Ryc.1. Model ex-vivo jamy brzusznej, w którym zostały umieszczone próbki otrzewnej w różnej lokalizacji: 1. - dolna część; 2 - część boczna; 3 – część górna; 4 – część dolna przysłonięta. A. tuba doprowadzająca gaz; B. - trocar; C. - mikrokateter

Eksperyment obejmował dwie grupy badane: grupę A, na której zastosowano procedurę PIPAC przy użyciu wodnego roztworu chlorowodoru doksorubicyny (PFS®, 2mg/ml, Pfizer Europe), natomiast grupa B została potraktowana preparatem doksorubicyny liposomalnej (Caelyx®, Janssen-Cilag, BHZ0V00). Preparaty zarówno wodnej doksorubicyny jak i liposomalnej (LD), rozpuszczono w 50ml 0,9% roztworu NaCl, w ilości 3mg. Tak przygotowane roztwory aerolizowano poprzez MC, wprowadzając je przy użyciu strzykawki. Następnie rozpylone roztwory doksorubicyny pozostawiano na tkankach jeszcze przez 0,5 godziny, po czym próbki zbierano, przemywano 0,9% r-rem NaCl w celu usunięcia chemioterapeutyku pozostającego na powierzchni tkanek. Kolejno tkanki zanurzano w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do czasu dalszego przygotowywania skrawków histologicznych do analizy na mikroskopie fluorescencyjnym. Natomiast próbki przeznaczone do obrazowania przy użyciu mikroskopu elektronowego, umieszczano w 2,5% glutaraldehydzie. Skrawki histologiczne przygotowywano na kriostacie i zatapiano w preparacie Vecta Shield, zawierającym 1,5 µg/ml 4',6-diamidyno-2-fenyloindol (DAPI), w celu obrazowania jąder komórkowych. Doksorubicyna ma

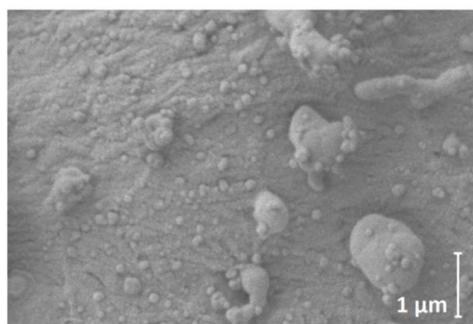
właściwości fluorescencyjne, więc jej obrazowanie nie wymagało dodatkowego barwienia. Głębokość wnikania była mierzona przy pomocy analizy na mikroskopie fluorescencyjnym. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego były przygotowywane i analizowane przy użyciu kriogenicznego, skaningowego mikroskopu elektronowego (Cryo-SEM).

Analiza wyników wykazała, że dokсорubicyna w liposomalnej formulacji, w każdej lokalizacji, tylko w niewielkim stopniu penetruje tkankę w porównaniu do jej roztworu wodnego, co zostało przedstawione w **tabeli 1**.

Lokalizacja	Głębokość penetracji wodnego r-ru dokсорubicyny (μm)	Głębokość penetracji liposomalnego r-ru dokсорubicyny (μm)
Dolna	$325 \pm 51 \mu\text{m}$	10 ± 12
Boczna	152 ± 54	2 ± 4
Górna	81 ± 38	Niemierzalna
Dolna przysłonięta	$71 \mu\text{m} \pm 37$	Niemierzalna

Tabela 1. Porównanie głębokości penetracji wodnego r-ru dokсорubicyny z dokсорubicyną liposomalną, w poszczególnych lokalizacjach modelu ex-vivo.

Analiza przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazała, iż kapsuły liposomalne zachowują swoją integralność pomimo zastosowanego stresu mechanicznego, jaki występuje w trakcie procedury PIPAC. Cząsteczki zobrazowanej liposomalnej dokсорubicyny miały średnicę $71 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$, a niektóre z nich tworzyły większe konglomeraty o wielkości od $0,5 \mu\text{m}$ do $5 \mu\text{m}$. **(Ryc.2.)**



Ryc.2. Nanocząsteczki i konglomeraty mikrocząsteczek LD zobrazowane za pomocą kriogenicznego skaningowego mikroskopu elektronowego.

Należy zaznaczyć, że były to pierwsze badania, które obrazowały sposób zachowania się cząsteczek liposomalnych w trakcie przeprowadzania procedury PIPAC oraz analizowały ich stopień wnikania, w porównaniu do roztworu wodnej dokсорubicyny.

Wyniki te niosą ze sobą istotne informacje:

1. Liposomalna doksorubicyna zachowuje swoją integralność w trakcie przeprowadzania procedury PIPAC
2. Wnikanie doksorubicyny zamkniętej w kapsułach liposomalnych w głąb tkanki otrzewnej jest bardzo ograniczona.

Biorąc pod uwagę ograniczone działanie chemioterapeutyków drobnocząsteczkowych w jamie brzusznej, ze względu na ich szybkie wchłanianie do krwiobiegu, informacja o braku dezintegracji LD, sugeruje możliwość jej użycia w postaci zdeponowanej, z dalszą możliwością ich uwolnienia przy użyciu np. ultradźwięków, co udowodniłam w innej publikacji (P11), bądź innych czynników fizycznych. Ponadto, ograniczenie penetracji LD może nieść za sobą korzyści w postaci mniejszej cytotoksyczności wobec tkanek prawidłowych, a uwalnianie może następować w sposób kontrolowany, w miejscach zmienionych nowotworowo.

Publikacja 2. Mikolajczyk, A.; Khosrawipour, T.; Kulas, J.; Migdal, P.; Arafkas, M.; Nicpon, J.; Khosrawipour, V. The Structural Effect of High Intensity Ultrasound on Peritoneal Tissue: A Potential Vehicle for Targeting Peritoneal Metastases. *BMC Cancer* 2020, 20, 481, doi:10.1186/s12885-020-06981-4.

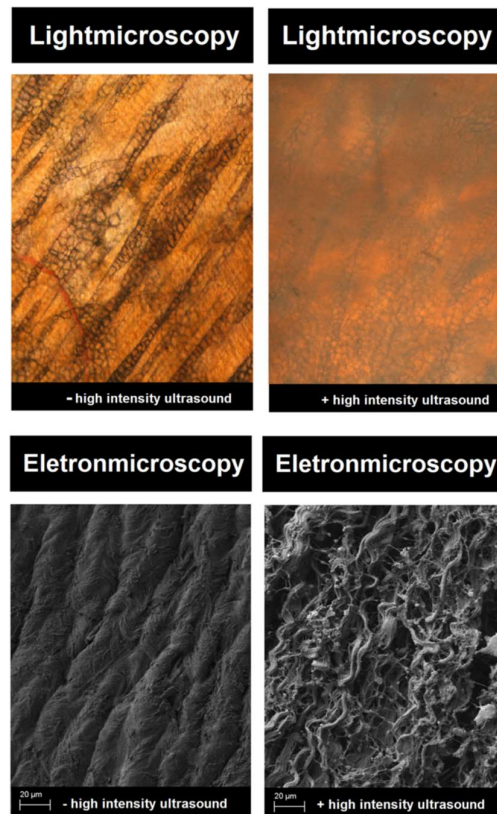
Ultradźwięki o wysokim natężeniu (**High Intensity Ultrasounds; HIUS**) już od ponad 20 lat są przedmiotem badań nad ich wykorzystaniem w terapii nowotworów, ze względu na ich nekrotyczny efekt względem tkanek [42]. Sprawdzano i opisano pozytywne rezultaty wykorzystania takiej terapii w nowotworach: trzustki, wątroby, nerek, piersi oraz prostaty [43–46]. Znane i dobrze opisane jest również ich zastosowanie w zwiększeniu efektywności dostarczania chemioterapeutyków, białek i materiału genetycznego [47]. Nekroza w tkankach poddanych działaniu HIUS jest wynikiem hipertermii i mechanicznego uszkodzenia tkanek. Mechaniczne uszkodzenie z kolei wiąże się ze zjawiskiem kawitacji, które jest gwałtownym procesem akumulacji energii pochodzącej z ultradźwięków w niewielkiej objętości. Skutkuje to powstaniem mikropęcherzyków gazu, które scalają się ze sobą a następnie rozpadają tworząc strumień, który może powodować uszkodzenie powierzchni znajdującej się w pobliżu tego procesu. W przypadku komórek, dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej [48,49].

Jak już wspomniano we wprowadzeniu, jednym z ograniczeń wewnątrzotrzewnowej chemioterapii jest ograniczony stopień penetracji tkanek przez chemioterapeutyk, który osiąga kilkaset mikrometrów, nie przekraczając jednego milimetra [32,50]. Wiadomo również, że zwiększenie penetracji leku, wykazuje silniejsze działanie przeciwnowotworowe [51]. Dlatego szukanie sposobów na zwiększenie wnikania chemioterapeutyków w głąb tkanki jest jednym z ważniejszych wyzwań leczenia nowotworów otrzewnej.

Celem przedstawionej pracy była analiza zmian w strukturze otrzewnej po zastosowaniu ultradźwięków, które mogą ułatwić wnikanie chemioterapeutyków w głąb otrzewnej, w trakcie stosowania chemioterapii bezpośredniej.

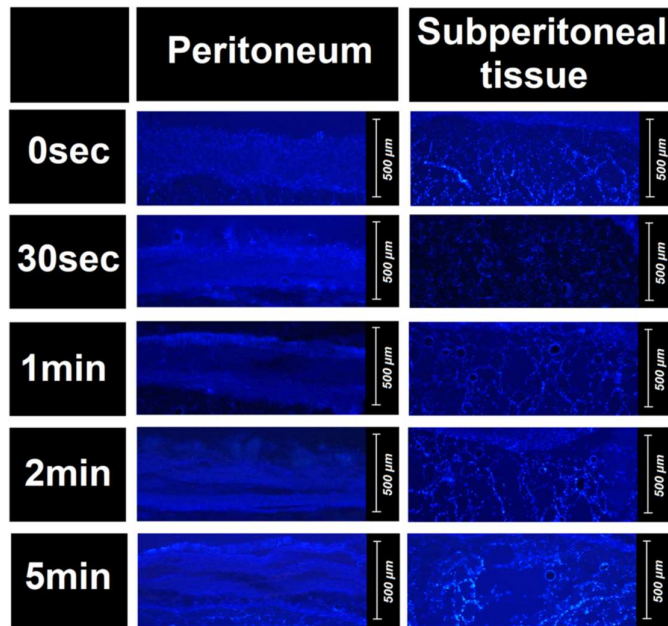
W badaniu posłużono się modelem *ex-vivo*, w którym świeżą tkankę otrzewnej świni, o wymiarach 3 cm x 3 cm x 0,5 cm, umieszczono w szalce Petriego, a następnie dodano 0,9% r-r NaCl, tak aby przykrywał tkankę. Kolejno do próbki przyłożono w bardzo bliskiej odległości (około 3 mm), końcówkę sonikatora, przez którą zastosowano ultradźwięki o mocy 70 W i częstotliwości 20kHz. W zależności od grupy badanej, wiązka ultradźwięków była przykładana na czas: 30, 60, 120 bądź 300 sekund. Grupa kontrolna nie otrzymała wiązki ultradźwięków, a była jedynie zanurzona w roztworze NaCl. Kolejno przeprowadzono analizę przy użyciu mikroskopu świetlnego, mikroskopu fluorescencyjnego, z barwieniem jąder roztworem 1,5 µg/ml 4',6-diamidyno-2-fenyloindolu (DAPI) oraz kriogenicznego skaningowego mikroskopu elektronowego (cryo-SEM).

Analiza przy użyciu mikroskopu świetlnego, wykazała, że w porównaniu do grupy kontrolnej, grupa, która otrzymała wiązkę ultradźwięków wykazywała zmianę powierzchni otrzewnej w postaci powstania białej błony o zmienionej konsystencji, co widoczne jest na ryc. 3. Analiza przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazała dezintegrację struktury otrzewnej, z rozdzielonymi wiązkami, natomiast próba kontrolna charakteryzowała się gładką, nienaruszoną, zwartą strukturą (**Ryc.3.;** część dolna).



Ryc. 3. Wizualizacja tkanki otrzewnej świni przy użyciu mikroskopu świetlnego (górną część) oraz mikroskopu elektronowego (dolną część). Strona prawa obrazuje próby kontrolne, natomiast strona lewa przedstawia tkankę poddaną działaniu ultradźwięków i widoczne zmiany w strukturze tkanki.

Obrazowanie przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego wykazało, że stopień rozwarstwienia tkanki zależny jest od czasu działania wiązki ultradźwiękowej oraz, że różne zmiany obserwowane są w zależności od warstwy otrzewnej. W przypadku mezotelium wraz z tkanką łączną, dezintegracja okazała się przebiegać w postaci poziomych rozszczelnień tkanki, tworzących swoiste “tunele” pomiędzy włóknami przy działaniu wiązki w czasie 120 sekund i dłużej. Z kolei w części podotrzewnowej, w warstwie mięśni, rozwarstwienia mają charakter pionowy i występują w postaci “jam”. Głębokość dezintegracji struktur zależy od czasu działania ultradźwięków i przy 30 sekundach sięga około 500 μm i wzrasta w momencie wydłużenia czasu działania wiązki HIUS, przy 300 sekundach zmiany sięgają około 800 μm (**Ryc.4.**).



Ryc.4. Zmiany w strukturze otrzewnej obserwowane po zastosowaniu ultradźwięków o wysokim natężeniu, w warstwie mezotelimu i tkanki łącznej (lewa strona) oraz w warstwie mięśni (prawa strona) obrazowane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego,

Uzyskane dane sugerują, że HIUS może stanowić znaczące ulepszenie w leczeniu nowotworów otrzewnej. Przedstawione badania dają pierwszy wgląd w mikroskopowe zmiany w strukturze otrzewnej, przy zastosowaniu HIUS. Praca ta stanowi wyjaśnienie obserwacji o zwiększonym wnikaniu doksorubicyny przy tej metodzie, opisane zarówno przez inne grupy badawcze, na modelu nowotworu trzustki [52], jak i badań własnych. W przytoczonych badaniach własnych (P10, P11) udowodniłam, że obserwowane zmiany opisane w powyższym manuskrypcie mają bezpośrednie przełożenie na głębokość penetracji doksorubicyny, zarówno wodnego jej roztworu jak i doksorubicyny liposomalnej, zwiększając znacząco wnikanie do tkanek traktowanych wcześniej ultradźwiękami o wysokim natężeniu. Dodatkowo nasza grupa badawcza opublikowała również koncept możliwości zastosowania tej metody w praktyce klinicznej, bazując na modelu świni post-mortem (P13). Wykazaliśmy również możliwość zwiększonej penetracji w głąb tkanek cząsteczek o większych rozmiarach, przy zastosowaniu wiązki ultradźwięków, co rozszerza możliwości zastosowania w.w. metody do większych struktur, takich jak białka, czy inne nośniki (P12).

Publikacja 3. Mikolajczyk, A.; Khosrawipour, V.; Lau, H.; Li, S.; Migdal, P.; Labbé, M.K.; Kielan, W.; Nicpon, J.; Stieglitz, S.; Khosrawipour, T. Exploring the Potential of Taurolidine in Inducing Mobilization and Detachment of Colon Cancer Cells: A Preliminary in-Vitro Study. *BMC Pharmacol Toxicol* **2022**, *23*, 38, doi:10.1186/s40360-022-00572-8

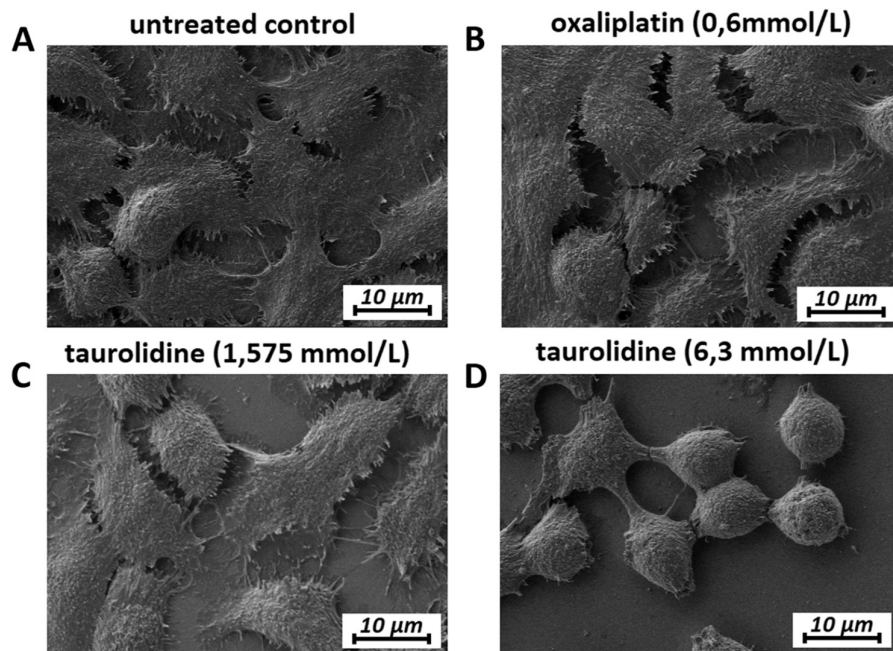
Taurolidyna jest związkiem syntetycznym, będącym pochodną tauryny [53]. Związek ten charakteryzuje się szerokim działaniem przeciwbakteryjnym, zarówno wobec drobnoustrojów tlenowych jak i beztlenowców, przy jednoczesnym braku ogólnoustrojowej cytotoksyczności [54]. W związku z tym jest powszechnie stosowanym środkiem przeciw powstawaniu biofilmów bakteryjnych przy długotrwałym stosowaniu cewników oraz przy leczeniu zapalenia otrzewnej [55–57]. Pojawiają się również doniesienia o możliwości stosowania taurolidyny w terapii przeciwnowotworowej, gdzie wykazano cytotoksyczność związku wobec kilku linii nowotworowych *in vitro* oraz postulowano skuteczność działania przeciwnowotworowego *in vivo* [58,59]. Działanie to ma mieć związek z indukcją apoptozy [60] oraz właściwościami przeciwwzapalnymi [61] i przeciwadhezyjnymi [62]. Dlatego początkowe założenie opierało się na sprawdzeniu cytotoksycznego działania taurolidyny w zależności od jej stężenia, wobec ludzkiej linii nowotworu jelita grubego – HT-29, jako badania wstępnego przed zastosowaniem związku *in vivo*. Jednak już na wstępie, zaobserwowana zmiana morfologii komórek skłoniła mnie do zmiany kierunku eksperymentu i sprawdzenia wpływu taurolidyny na możliwość indukcji przerzutów. Ponadto, oprócz wspomnianych prac wspierających użycie tego związku jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, można znaleźć doniesienia, gdzie udowodniono nasilenie przerzutowania kostniakomięsaka po stosowaniu tej pochodnej tauryny, w badaniu *in vivo* na modelu mysim [63].

Celem powyższej pracy była analiza wpływu taurolidyny na morfologię, mobilizację i potencjał przerzutowania linii komórek ludzkiego raka jelita grubego – HT-29.

Komórki ludzkiego nowotworu jelita grubego linii HT-29 traktowano różnymi stężeniami roztworu taurolidyny w preparacie Taurolin (Ringer, Berlin-Chemie AG, Germany). Analizowano następujące stężenia taurolidyny: 0.045%, 0.06%, 0.09%, 0.135% oraz 0.18%. Kontrolę pozytywną stanowiły komórki traktowane roztworem oksaliplatyny o stężeniu 0,24mg/ml rozpuszczonym w 5% roztworze glukozy, natomiast kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane tylko w pełnym medium komórkowym, tj. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM—high glucose, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), suplementowanym 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Poland) oraz 2 mmol/L glutaminą, 100 IU/mL penicyliną oraz 100 µg/mL streptomycyną (wszystkie suplementy Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Komórki wysiane na 24-dółkową płytkę, po 48-godzinnej hodowli traktowane były przez 1 godzinę powyższymi

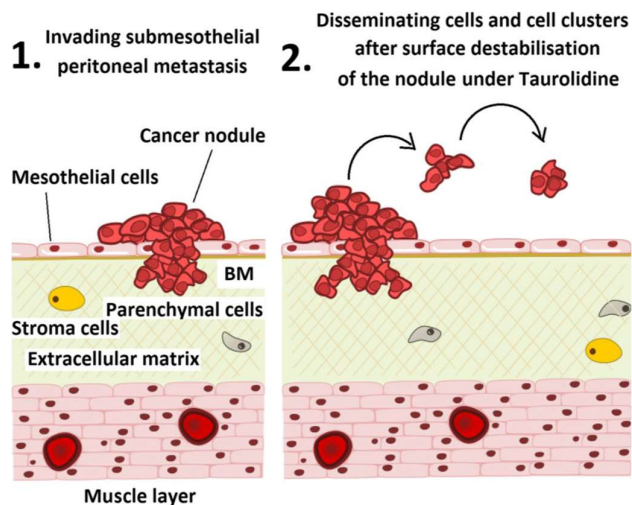
stężeniami roztworu tauroolidyny oraz roztworem oksaliplatyny. Kolejno, komórki hodowano w medium pełnym przez następne 24 godziny. Po tym czasie komórki poddawano wytrząsaniu o prędkości 300 rpm przez 2 minuty, po czym aspirowano medium z dołków, w którym znajdowały się potencjalnie oderwane komórki i przenoszono je do dołków nowej płytki 24-ro dołkowej, a do komórek z uprzedniej hodowli dodawano 1 ml świeżego medium. Hodowlę na płytce początkowej kontynuowano przez kolejne 24 godziny, natomiast na płytce po transferze komórek po wytrząsaniu przez kolejne 48 godzin, po czym przeprowadzano analizę żywotności komórek z obu hodowli. W tym celu przeprowadzono test proliferacji komórek (MTS - CellTiter 96®Aqueous One Solution assay, Promega, Poland) oraz test wykluczania błękitu trypanu (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Analizę komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego oraz mikroskopu elektronowego przeprowadzono po 24 godzinach od traktowania komórek tauroolidyną o koncentracji 0,045% oraz 0,18%.

Analiza żywotności wykazała, że w dołkach płytki z hodowli początkowej po wytrząsaniu, wraz ze wzrostem stężenia tauroolidyny zmniejsza się istotnie statystycznie żywotność komórek, przy najmniejszej żywotności dla kontroli pozytywnej traktowanej oksaliplatyną. Z kolei w dołkach płytki po transferze oderwanych komórek największą żywotność obserwuje się w dołkach z komórkami traktowanymi tauroolidyną i rośnie ona wraz ze wzrostem jej stężenia, jednak tylko do stężeń 0,06% i 0,09%, przy których jest najwyższa i znacząco spada dla stężenia 0,135% oraz 0,18%, przy najniższej żywotności dla komórek kontroli pozytywnej. Test wykluczenia błękitu trypanu w dużej mierze odzwierciedla wyniki proliferacji, wskazując na większą ilość oderwanych komórek, które mogą przeżyć i proliferować, po traktowaniu komórek roztworem tauroolidyny. Analiza przy użyciu mikroskopu świetlnego wykazała, że po ekspozycji na tauroolidynę oraz po wytrząsaniu, widocznie więcej komórek było oderwanych, wraz ze wzrostem stężenia tauroolidyny, natomiast niewielka ilość oderwanych komórek widoczna była w próbie kontrolnej oraz po traktowaniu oksaliplatyną. Ponadto widoczna była zmiana kształtu i przylegania względem siebie i podłoża komórek, tj. komórki kontrolne charakteryzują się wielobocznym, spłaszczonym kształtem, które w większości przylegają ściśle do siebie i do podłoża. Natomiast komórki traktowane tauroolidyną przybierają postać sferyczną, ułożone są w pewnej odległości względem siebie i mają mniejszą powierzchnię styczną z podłożem. Analiza przy użyciu mikroskopu elektronowego potwierdziła obserwacje z mikroskopu świetlnego, wykazując znaczną zmianę kształtu i interakcji międzykomórkowych oraz przylegania do podłoża, w stosunku do kontroli negatywnej oraz pozytywnej oraz niskiego stężenia tauroolidyny (**Ryc. 5**).



Ryc. 5. Zmiany w kształcie komórek i interakcji międzykomórkowych oraz względem podłoża komórek traktowanych wysokim stężeniem taurolidyny (D) w stosunku do kontroli negatywnej (A), kontroli pozytywnej (B) oraz komórek traktowanych niskim stężeniem taurolidyny (C)

Podsumowując, w swojej pracy wykazałam, że komórki traktowane taurolidyną zmieniają kształt oraz interakcje międzykomórkowe oraz interakcje względem podłoża. Ponadto wraz ze wzrostem stężenia roztworu taurolidyny, komórki mają większą tendencję do odrywania się od pierwotnej hodowli komórkowej i jednocześnie oderwane komórki mają możliwość ponownego przylegania do podłoża i proliferacji. Istotną informacją w kontekście leczenia przeciwnowotworowego z wykorzystaniem taurolidyny jest to, że przy określonym stężeniu, tj. 0,06%-0,09%, taurolidyna nie jest na tyle cytotoksyczna aby skutecznie zabić komórki, ale jest to wystarczające stężenie do mobilizacji komórek z hodowli pierwotnej (potencjalnie ogniska pierwotnego nowotworu), które to komórki mogą zostać przetransportowane w inne miejsce, z możliwością wtórnej adhezji i proliferacji. W związku z tym, że moje dokonanie dotyczy poszukiwania innowacyjnych metod leczenia nowotworów otrzewnej, a opisany związek cieszy się rosnącym zainteresowaniem w terapii nowotworów otrzewnej powyższa praca niesie ze sobą niezwykle istotne informacje, które muszą być brane pod uwagę przy decyzji o stosowaniu taurolidyny w leczeniu omawianej jednostki chorobowej. Zaproponowany po raz pierwszy w niniejszej pracy mechanizm (**Ryc. 6**) może tłumaczyć wcześniejsze doniesienia o zwiększonym przerzutowaniu kostaniakomięsa u myszy, po zastosowaniu tej pochodnej tauryny.



Ryc.6. Schemat obrazujący możliwość odrywania komórek nowotworowych od ogniska nowotworu i ich rozsiewanie.

Publikacja 4. Thelen, S.*; Mikolajczyk-Martinez, A.*; Diakun, A.; Khosrawipour, T.; Zielinski, K.; Nicpoń, J.; Kielbowicz, Z.; Prządka, P.; Liszka, B.; Kuropka, P.; et al. Evaluating the Concept of Gas-based Intraperitoneal Hyperthermia beyond 43°C in the Treatment of Peritoneal Metastasis: A Pilot Study. *Experimental and Therapeutic Medicine* **2022**, *24*, 1–9, doi:10.3892/etm.2022.11687. (IF=2,75; 40pkt. MEiN)

* równorzędny udział

Hipertermia jest jedną z metod terapeutycznych w leczeniu nowotworów, która polega na podniesieniu temperatury tkanek powyżej jej wartości fizjologicznej (37°C) poprzez dostarczenie ciepła ze źródeł zewnętrznych [66]. Efekt terapeutyczny hipertermii opiera się na bezpośrednim zabijaniu komórek nowotworowych oraz ich uwrażliwianiu na radioterapię, chemioterapię, terapię genową i immunoterapię, bez uszkodzenia lub przy minimalnym uszkodzeniu zdrowych tkanek. Zostało także udowodnione, że zastosowanie hipertermii o temperaturze 50-55°C wobec mysiego modelu czerniaka, efektywnie stymuluje odpowiedź immunologiczną w myszach a w trakcie jej stosowania tworzona jest przeciwnowotworowa pamięć immunologiczną [67]. Głównym celem hipertermii na poziomie molekularnym jest denaturacja białek komórkowych, co odpowiada za destabilizację błony komórkowej, cytoszkieletu czy enzymów, a także powoduje zaburzenie funkcjonowanie jądra komórkowego poprzez zakłócanie systemów naprawczych DNA [66]. Hipertermię w większości przypadków stosuje się jako terapię adjuwantową (uzupełnienie terapii zasadniczej), np. zostało opisane, że stosowanie hipertermii wraz z radioterapią w leczeniu czerniaków daje szybszą regresję

nowotworu niż sama radioterapia [68]. Jak już przedstawiono we wstępie, najskuteczniejszą dotychczas metodą terapii nowotworów otrzewnej jest procedura CRS wraz z HIPEC, w której zwiększona skuteczność opiera się na stosowaniu chemioterapeutyków o podniesionej temperaturze, co daje lepsze rezultaty, niż w przypadku metody chemioterapii bezpośredniej, w której temperatura roztworu leku przeciwnowotworowego zbliżona jest do temperatury ciała. Skuteczniejsze działanie chemioterapii skojarzonej z hipertermią, w tym przypadku opiera się na lepszej penetracji chemioterapeutyku do komórek nowotworowych, wolniejszym ich usuwaniu z jamy otrzewnej oraz zwiększonej cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych [21]. W opisanej metodzie, zadawany płyn chemioterapeutyczny ma temperaturę 42-43°C. Jednym z aspektów bezpieczeństwa pacjenta jest konieczność ciągłego monitorowania i nieprzekraczania zadanej temperatury płynu, gdyż jego podniesienie groziłoby zwiększeniem temperatury głębokiej ciała, co stanowi zagrożenie dla zdrowia i życia pacjenta. Ta niezdolność do dalszego zwiększania temperatury stosowanej w wewnątrzotrzewnowej chemioterapii jest jednym z kluczowych ograniczeń w podejściu HIPEC. Ze względu na właściwości fizyczne, zastosowanie hipertermicznych roztworów cieczy na bazie wody jest ograniczone. Woda ma pojemność cieplną 4,186 kJ / liter, co stanowi największą pojemność cieplną spośród wszystkich powszechnie znanych substancji. Oznacza to, że duża ilość energii jest przenoszona na każdy stykający się obiekt, powodując szybki wzrost temperatury otoczenia. Natomiast powietrze ma pojemność cieplną 0,00081 kJ / liter przy gęstości 1,127 kg / m³, w temperaturze 40°C, przy ciśnieniu atmosferycznym, co znacznie ogranicza zdolność transferu energii do głębszych partii ciała [69–71]. W rozsianych nowotworach powierzchni otrzewnej, komórki nowotworowe infiltrują w głąb otrzewnej jedynie na kilka milimetrów [72,73]. Dlatego wprowadzenie hipertermii gazowej, która wpływa jedynie na powierzchniową warstwę komórek jest bardzo korzystne z punktu widzenia bezpieczeństwa pacjenta.

Stąd **celem** przedstawionych badań było sprawdzenie możliwości zastosowania hipertermii gazowej powyżej 43°C, jako potencjalnej metody leczenia nowotworów otrzewnej.

Eksperyment obejmował część *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo*. W badaniu *in vitro* komórki ludzkiego nowotworu jelita grubego HT-29 wysiewano w ilości 2x10⁵ komórek na dołek 24-dołkowej płytki i hodowano przez 48 godzin. Po tym czasie przeprowadzano eksperyment krótkiej ekspozycji na hipertermiczny płyn, tj. medium hodowlane aspirowano a w zamian umieszczano na 10 sekund medium podgrzane do następujących temperatur: 37°C (kontrola negatywna), 42°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C. Po tym czasie do komórek dodawano świeże medium hodowlane o temperaturze 37°C i hodowano przez kolejne 24h. Kontrolę

pozytywną stanowiły komórki traktowane roztworem oksaliplatyny o stężeniu 1,2 mg/ml rozpuszczonym w 5% roztworze glukozy przez 1 godzinę, po czym hodowane w pełnym medium hodowlanym przez kolejne 23 godziny. Po tym czasie żywotność komórek kontrolnych oraz prób badanych oceniana była przy użyciu testu proliferacji komórek (colorimetric CellTiter 96® AQueous One Solution assay, Promega, Poland), natomiast cytotoksyczne działanie temperatury na komórki mierzone było przy użyciu testu uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit; Thermo Scientific).

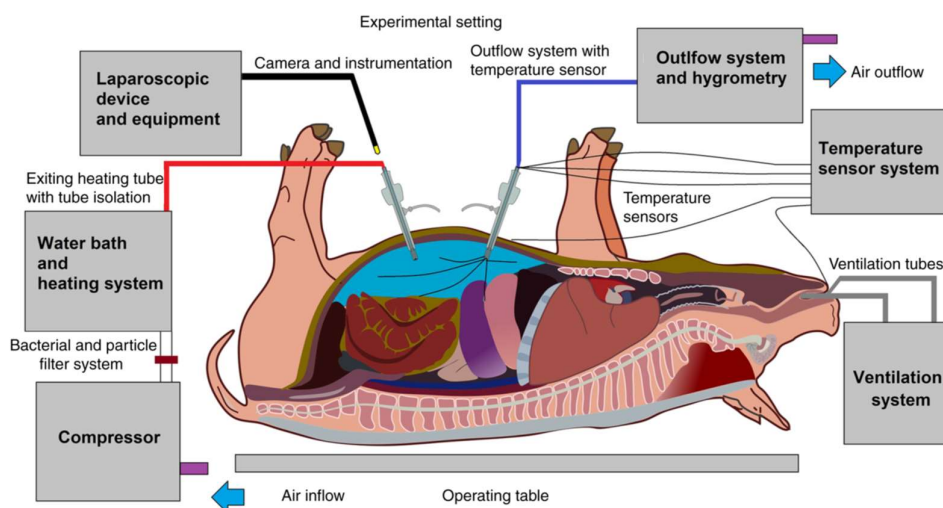
W części *ex vivo*, komercyjne skrawki świńskiej otrzewnej ściennej, o wymiarach 5 cm x 5 cm x 8 cm, umieszczono w zamkniętym, plastikowym pudełku, izolowanym styropianem i folią pęcherzykową. W pudełku zostały umieszczone dwa trokary: na ścianie bocznej i górnej, przez które umieszczone były próbniki temperatur oraz dostarczane było ogrzane powietrze o temperaturze: 47°C, 50°C, 60°C, 66°C oraz 69°C. Tak przygotowany model umieszczony został w podgrzewanej łaźni wodnej, a podgrzane powietrze dostarczane było w sposób ciągły przez 1h, z prędkością 15 L/min. Pomiar temperatury obejmował około 5 mm nad powierzchnią tkanki, oraz na głębokości 2 mm oraz 5 mm w głąb tkanki. W podobny sposób umieszczono 12 cm odcinek jelita cienkiego, w którego świetle umieszczono czujnik temperatury, następnie światło jelita zamknięto z obu stron, a tkankę traktowano ogrzaniem powietrzem o temperaturze 70°C bądź ogrzaniem roztworem 0,9% NaCl o temperaturze 68°C, 70°C i 72°C przez 50 sekund.

Eksperyment *in vivo* i dane przedstawione w powyższej publikacji stanowił część obszernego eksperymentu na modelu świni, dotyczącego możliwości wykorzystania hipertermii gazowej i dehydratacji w leczeniu nowotworów powierzchni otrzewnej. Ta część eksperymentu obejmowała 3, 65-dniowe świnię o wadze około 50 kg. Zwierzęta poddano zabiegowi laparoskopii w pełnym znieczuleniu wziewnym, a w powłokach jamy brzusznej umieszczono 5 trokarów laparoskopowych. W pierwszym trokarze umieszczona została plastikowa tuba doprowadzająca ogrzane powietrze, trokar drugi stanowił odprowadzenie wprowadzanego powietrza, natomiast poprzez 3 pozostałe trokary zostały umieszczone czujniki temperatury. Ogrzane powietrze (48°C; 49°C; 50°C) tłoczono do jamy brzusznej przez 45 minut a przepływ wynosił 15 L/min. Temperaturę stale odczytywano z 9 czujników temperatury umieszczonych w różnych miejscach w przestrzeni jamy brzusznej, bezpośrednio na otrzewnej ściennej, na wątrobie, na skórze i wewnątrzprzełykowo, a także w świetle wlotowym i wylotowym rury doprowadzającej i odprowadzającej ogrzane powietrze (**Ryc. 7.**). Po zabiegu świnię były poddane obserwacji przez 7 dni, po czym poddano je eutanazji i pobrano próbki do analizy histopatologicznej.

W badaniach *in vitro*, przy stosowaniu krótkiej, 10-cio sekundowej hipertermii cieczonej, wykazano, że żywotność komórek ludzkiego raka jelita grubego spada w stosunku do kontroli negatywnej dopiero przy zastosowaniu temperatury 65°C o około 18%, a większe spadki, tj. o około 40%, 78% i 85%, przy temperaturach odpowiednio 70°C, 75°C i 80°C. Wyniki testu na cytotoxycznosc odzwierciedlają test na żywotność, gdyż niewielką, ok. 5% cytotoxycznosc zaczynamy obserwować przy temperaturze 65°C, która znacząco wzrasta do ponad 60% dla temperatur 75°C i 80°C. W obu testach, dwie najwyższe temperatury przekraczają efekt zmniejszenia żywotności oraz cytotoxycznosci notowany dla oksaliplatyny. W badaniach *ex-vivo* wykazano największy wzrost temperatury, przekraczający 45°C przy tłoczeniu powietrza o temperaturze 69°C, gdy pomiaru dokonywano nad tkanką. Sensor, umieszczony na głębokości 2 mm w głąb tkanki odnotował już tylko osiągnięcie maksimum 45°C przy tłoczeniu w.w. temperatury, a na głębokość 5 mm, temperatura wzrastała maksymalnie do 42°C. Z kolei przy pomiarze temperatury wewnątrz światła jelit, wzrost temperatury obserwujemy nawet do 70°C, gdy fragment narządu otoczony jest podgrzany do 70°C roztworem 0,9% NaCl, natomiast przy działaniu powietrza o takiej samej temperaturze, temperatura wewnątrz światła jelit przekraczała nieznacznie 37°C. W eksperymencie *in vivo* na modelu świni, zaobserwowano znaczną różnicę temperatur mierzonych sensorami na wlocie ogrzewanego powietrza oraz na wylocie ogrzewanego powietrza. Temperatura wlotowa była na poziomie 48°C, 49°C i 50°C, czyli osiągała poziom przez nas zadawany, natomiast temperatura wylotowa ze wszystkich trzech temperatur oscylowała wokół 36°C. Sensory umieszczone wewnątrz jamy brzusznej również nie odnotowywały temperatur wyższych niż 40°C, przy czym najwyższą temperaturę wskazywał czujnik umieszczony na powierzchni wątroby – około 38°C. Świnie przez cały 7 – dniowy okres obserwacji nie przejawiały zachowań, które mogłyby świadczyć o naruszeniu homeostazy ich organizmu (pobór pokarmu adekwatny do wieku, regularne oddawanie moczu i kału, temperatura ciała w normie, interakcje ze zwierzętami w tym samym boksie zachowane), co oznacza, że procedura ta była dobrze przez nie tolerowana. Badania histopatologiczne, przeprowadzone po okresie obserwacji wykazały zmiany w obrębie otrzewnej, w postaci zwiększenia grubości otrzewnej oraz zwiększonej infiltracji tkanki przez krwinki białe (neutrofile).

Podsumowując, przedstawione badania dają pierwszy wgląd w możliwość zastosowania klinicznego hipertermii gazowej w postaci wtłaczania ogrzanego powietrza do jamy brzusznej. Badania *in vitro* wskazały górną granicę zastosowanych temperatur, badania *ex-vivo* umożliwiły prześledzenie zakresu przekazywanego ciepła w głąb tkanki a badanie *in vivo*

udowodniło wykonalność i bezpieczeństwo zabiegu, wskazało zakresy temperatur osiągnane w różnych punktach jamy brzusznej w trakcie wykonywanego zabiegu oraz dało wgląd w zmiany histopatologiczne otrzewnej po zastosowaniu hipertermii gazowej.



Ryc.7. Schemat obrazujący wykonanie zabiegu hipertermii gazowej na modelu świńskim

4.3.3. Podsumowanie osiągnięcia naukowego

Wyniki moich badań zaprezentowanych w cyklu czterech publikacji mogą podsumować następująco:

1. Wykazałam, iż liposomalna doksorubicyna nie ulega rozkładowi w trakcie przeprowadzania procedury PIPAC, natomiast akumuluje się na powierzchni otrzewnej w postaci pojedynczych cząsteczek liposomów bądź też ich konglomeratów.
2. Wykazałam, iż penetracja liposomalnej doksorubicyny w głąb tkanki otrzewnej, jest bardzo ograniczona, tj. w stosunku do wodnego roztworu doksorubicyny penetruje około 30-krotnie słabiej, na głębokość około 10 μm w najbardziej dostępnej lokalizacji.
3. Wykazałam, że zastosowanie ultradźwięków o wysokiej częstotliwości powoduje dezintegrację struktury zarówno powierzchniowej warstwy mezotelium z tkanką łączną jak i warstwy mięśni pod otrzewną, przy czym charakter zmian zależy od głębokości ich lokalizacji.
4. Wykazałam, że komórki traktowane taurolidyną zmieniają kształt oraz rozluźniają interakcje międzykomórkowe oraz interakcje z podłożem.
5. Traktowanie komórek taurolidyną zmniejsza ich adhezję w hodowlach pierwotnych umożliwiając adhezję i proliferację w nowym miejscu.

6. Wskazałam górną granicę temperatury bezpiecznej dla przeżycia komórek
7. Wykazałam, iż możliwe jest z technicznego punktu widzenia i bezpieczne dla zwierzęcia przeprowadzenie wewnątrztrzewnowej hipertermii gazowej o temperaturze do 50°C na modelu świni domowej.
8. Wykazałam, że zmiany histopatologiczne w obrębie otrzewnej ściennej, w postaci zwiększenia grubości mezotelium wraz z tkanką łączną oraz nacieku neutrofilów, występują w jej powierzchniowej warstwie, bez zmian w strukturze warstwy mięśni.

Podsumowując, wyniki omawiane w przedstawionych pracach znacznie rozszerzają dostępną wiedzę na temat możliwości zastosowania innowacyjnych metod w leczeniu nowotworów otrzewnej zarówno ludzi i zwierząt oraz mają duży potencjał wdrożenia omawianych metod do zastosowania klinicznego.

4.3.4. Piśmiennictwo

1. Monteiro, C.B.; O'Brien, R.T. A Retrospective Study on the Sonographic Findings of Abdominal Carcinomatosis in 14 Cats. *Vet Radiol Ultrasound* **2004**, *45*, 559–564, doi:10.1111/j.1740-8261.2004.04096.x.
2. Moore, A.R.; Coffey, E.; Leavell, S.E.; Krafsur, G.; Duncan, C.; Dowers, K.; Santangelo, K.S. Canine Bicavitary Carcinomatosis with Transient Needle Tract Metastasis Diagnosed by Multiplex Immunocytochemistry. *Vet Clin Pathol* **2016**, *45*, 495–500, doi:10.1111/vcp.12394.
3. Gebbie, R.C.; Hardcastle, M.R.; Hunter, S.A.; Hartman, A.C. Transcoelomic Spread and Metastasis of a Squamous Cell Carcinoma of Presumed Pancreatic Duct Origin in a Cat. *N Z Vet J* **2012**, *60*, 154–159, doi:10.1080/00480169.2011.639056.
4. Gośliński, J. Nowotwór u psa i kota - objawy i diagnostyka. *Zwrotnikraka.pl* 2022.
5. Weston, P.J.; Baines, S.J.; Finotello, R.; Mortier, J.R. Clinical, CT, and Ultrasonographic Features of Canine and Feline Pleural and Peritoneal Carcinomatosis and Sarcomatosis. *Veterinary Radiology & Ultrasound* **2021**, *62*, 331–341, doi:10.1111/vru.12951.
6. Lajoinie, M.; Chavalle, T.; Floch, F.; Sayag, D.; Lanore, D.; Ponce, F.; Chamel, G. Outcome of Dogs Treated with Chemotherapy for Mesothelioma: A Retrospective Clinical Study on 40 Cases and a Literature Review. *Vet Comp Oncol* **2022**, *20*, 825–835, doi:10.1111/vco.12843.
7. Petterino, C.; Modesto, P.; Ratto, A. A Bilateral Ovarian Psammomatous Papillary Cystic Adenocarcinoma in a German Shepherd Bitch. *Comp Clin Pathol* **2010**, *19*, 389–395, doi:10.1007/s00580-009-0887-7.
8. Best, M.P.; Frimberger, A.E. Ovarian Carcinomatosis in a Dog Managed with Surgery and Intraperitoneal, Systemic, and Intrapleural Chemotherapy Utilizing Indwelling Pleural Access Ports. *Can Vet J* **2017**, *58*, 493–497.
9. Ovarian Cancer Statistics | How Common Is Ovarian Cancer Available online: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html> (accessed on 3 June 2022).

10. Rutkowski, P.; Śpiewankiewicz, B.; Herman, K.; Jastrzębski, T.; Kładny, J.; Kojs, Z.; Krzakowski, M.; Polkowski, W.; Wyrwicz, L.; Wysocki, P.; et al. Zasady stosowania dootrzewnowej chemioterapii w hipertermii (HIPEC) w leczeniu nowotworów złośliwych powierzchni otrzewnej w połączeniu z zabiegami cytoredukcyjnymi: zalecenia krajowe. *Current Gynecologic Oncology* **2014**, *12*, 86–97.
11. Ovarian Cancer Metastasis: A Unique Mechanism of Dissemination | IntechOpen Available online: <https://www.intechopen.com/chapters/51874> (accessed on 7 June 2022).
12. Heaney, R.M.; Shields, C.; Mulsow, J. Outcome Following Incomplete Surgical Cytoreduction Combined with Intraperitoneal Chemotherapy for Colorectal Peritoneal Metastases. *World J Gastrointest Oncol* **2015**, *7*, 445–454, doi:10.4251/wjgo.v7.i12.445.
13. Paul Olson, T.J.; Pinkerton, C.; Brasel, K.J.; Schwarze, M.L. Palliative Surgery for Malignant Bowel Obstruction from Carcinomatosis: A Systematic Review. *JAMA Surg* **2014**, *149*, 383–392, doi:10.1001/jamasurg.2013.4059.
14. Verwaal, V.J.; van Ruth, S.; de Bree, E.; van Sloothen, G.W.; van Tinteren, H.; Boot, H.; Zoetmulder, F.A.N. Randomized Trial of Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy versus Systemic Chemotherapy and Palliative Surgery in Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* **2003**, *21*, 3737–3743, doi:10.1200/JCO.2003.04.187.
15. Walker, J.L.; Brady, M.F.; Wenzel, L.; Fleming, G.F.; Huang, H.Q.; DiSilvestro, P.A.; Fujiwara, K.; Alberts, D.S.; Zheng, W.; Tewari, K.S.; et al. Randomized Trial of Intravenous Versus Intraperitoneal Chemotherapy Plus Bevacizumab in Advanced Ovarian Carcinoma: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **2019**, *37*, 1380–1390, doi:10.1200/JCO.18.01568.
16. Dedrick, R.L.; Myers, C.E.; Bungay, P.M.; DeVita, V.T. Pharmacokinetic Rationale for Peritoneal Drug Administration in the Treatment of Ovarian Cancer. *Cancer Treat Rep* **1978**, *62*, 1–11.
17. Jones, R.B.; Myers, C.E.; Guarino, A.M.; Dedrick, R.L.; Hubbard, S.M.; DeVita, V.T. High Volume Intraperitoneal Chemotherapy (“belly Bath”) for Ovarian Cancer. Pharmacologic Basis and Early Results. *Cancer Chemother Pharmacol* **1978**, *1*, 161–166, doi:10.1007/BF00253116.
18. Walker, J.L. Intraperitoneal Chemotherapy Requires Expertise and Should Be the Standard of Care for Optimally Surgically Resected Epithelial Ovarian Cancer Patients. *Ann Oncol* **2013**, *24 Suppl 10*, x41-45, doi:10.1093/annonc/mdt469.
19. Jost, E.; Mack, L.A.; Sideris, L.; Dube, P.; Temple, W.; Bouchard-Fortier, A. Evaluation of Repeat Cytoreductive Surgery and Heated Intraperitoneal Chemotherapy for Patients with Recurrent Peritoneal Carcinomatosis from Appendiceal and Colorectal Cancers: A Multicentre Canadian Study. *Can J Surg* **2020**, *63*, E71–E79, doi:10.1503/cjs.002519.
20. Sugarbaker, P.H.; Ryan, D.P. Cytoreductive Surgery plus Hyperthermic Perioperative Chemotherapy to Treat Peritoneal Metastases from Colorectal Cancer: Standard of Care or an Experimental Approach? *Lancet Oncol* **2012**, *13*, e362-369, doi:10.1016/S1470-2045(12)70210-3.
21. Sugarbaker, P.H. Laboratory and Clinical Basis for Hyperthermia as a Component of Intracavitary Chemotherapy. *Int J Hyperthermia* **2007**, *23*, 431–442, doi:10.1080/02656730701455318.
22. Aoyagi, T.; Terracina, K.P.; Raza, A.; Takabe, K. Current Treatment Options for Colon Cancer Peritoneal Carcinomatosis. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 12493–12500, doi:10.3748/wjg.v20.i35.12493.
23. Jastrzębski, T.; Richter, P.; Zegarski, W.; Dziki, A.; Wallner, G.; Jeziorski, A.; Wysocki, W.; Jackowski, M.; Bębenek, M.; Olesiński, T.; et al. Guidelines of the Association of Polish Surgeons and the Polish Society of Surgical Oncology on the Accreditation of

- Healthcare Centers Providing Cytoreductive Surgery and HIPEC for Primary and Secondary Peritoneal Cancers. *Pol Przegl Chir* **2020**, *92*, 47–53.
24. Morano, W.F.; Khalili, M.; Chi, D.S.; Bowne, W.B.; Esquivel, J. Clinical Studies in CRS and HIPEC: Trials, Tribulations, and Future Directions-A Systematic Review. *J Surg Oncol* **2018**, *117*, 245–259, doi:10.1002/jso.24813.
 25. Nowacki, M.; Zegarski, W. The Scientific Report from the First Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) Procedures Performed in the Eastern Part of Central Europe. *J Int Med Res* **2018**, *46*, 3748–3758, doi:10.1177/0300060518778637.
 26. Grass, F.; Vuagniaux, A.; Teixeira-Farinha, H.; Lehmann, K.; Demartines, N.; Hübner, M. Systematic Review of Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy for the Treatment of Advanced Peritoneal Carcinomatosis. *Br J Surg* **2017**, *104*, 669–678, doi:10.1002/bjs.10521.
 27. Solass, W.; Kerb, R.; Mürdter, T.; Giger-Pabst, U.; Strumberg, D.; Tempfer, C.; Zieren, J.; Schwab, M.; Reymond, M.A. Intraperitoneal Chemotherapy of Peritoneal Carcinomatosis Using Pressurized Aerosol as an Alternative to Liquid Solution: First Evidence for Efficacy. *Ann Surg Oncol* **2014**, *21*, 553–559, doi:10.1245/s10434-013-3213-1.
 28. Yonemura, Y. A New Bidirectional Intraperitoneal and Systemic Induction Chemotherapy (BISIC) for the Peritoneal Metastasis from Gastric Cancer in Neoadjuvant Setting. *Integr Cancer Sci Therap* **2014**, *1*, doi:10.15761/ICST.1000106.
 29. Alyami, M.; Mercier, F.; Siebert, M.; Bonnot, P.-E.; Laplace, N.; Villeneuve, L.; Passot, G.; Glehen, O.; Bakrin, N.; Kepenekian, V. Unresectable Peritoneal Metastasis Treated by Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) Leading to Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* **2021**, *47*, 128–133, doi:10.1016/j.ejso.2019.06.028.
 30. Teixeira Farinha, H.; Mattille, D.; Mantziari, S.; Demartines, N.; Hübner, M. Early Postoperative Outcomes of Staging Laparoscopy for Peritoneal Metastases with or without Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *BMC Surg* **2022**, *22*, 122, doi:10.1186/s12893-022-01572-5.
 31. Khosrawipour, V.; Khosrawipour, T.; Falkenstein, T.A.; Diaz-Carballo, D.; Förster, E.; Osmá, A.; Adamietz, I.A.; Zieren, J.; Fakhrian, K. Evaluating the Effect of Micropump® Position, Internal Pressure and Doxorubicin Dosage on Efficacy of Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) in an Ex Vivo Model. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 4595–4600, doi:10.21873/anticancer.11008.
 32. Khosrawipour, V.; Khosrawipour, T.; Diaz-Carballo, D.; Förster, E.; Zieren, J.; Giger-Pabst, U. Exploring the Spatial Drug Distribution Pattern of Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Annals of Surgical Oncology* **2016**, *23*, 1220–1224, doi:10.1245/s10434-015-4954-9.
 33. Coccolini, F.; Gheza, F.; Lotti, M.; Virzi, S.; Iusco, D.; Ghermandi, C.; Melotti, R.; Baiocchi, G.; Giulini, S.M.; Ansaloni, L.; et al. Peritoneal Carcinomatosis. *World J Gastroenterol* **2013**, *19*, 6979–6994, doi:10.3748/wjg.v19.i41.6979.
 34. Flessner, M.F. The Transport Barrier in Intraperitoneal Therapy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**, *288*, F433–442, doi:10.1152/ajprenal.00313.2004.
 35. Nowacki, M.; Peterson, M.; Kloskowski, T.; McCabe, E.; Guiral, D.C.; Polom, K.; Pietkun, K.; Zegarska, B.; Pokrywczynska, M.; Drewa, T.; et al. Nanoparticle as a Novel Tool in Hyperthermic Intraperitoneal and Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy to Treat Patients with Peritoneal Carcinomatosis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78208–78224, doi:10.18632/oncotarget.20596.
 36. Flessner, M.F.; Choi, J.; Credit, K.; Deverkadra, R.; Henderson, K. Resistance of Tumor Interstitial Pressure to the Penetration of Intraperitoneally Delivered Antibodies into

- Metastatic Ovarian Tumors. *Clinical Cancer Research* **2005**, *11*, 3117–3125, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2332.
37. Dedrick, R.L.; Flessner, M.F. Pharmacokinetic Problems in Peritoneal Drug Administration: Tissue Penetration and Surface Exposure. *J Natl Cancer Inst* **1997**, *89*, 480–487, doi:10.1093/jnci/89.7.480.
 38. Flessner, M.F. Pharmacokinetic Problems in Peritoneal Drug Administration: An Update after 20 Years. *Pleura Peritoneum* **2016**, *1*, 183–191, doi:10.1515/pp-2016-0022.
 39. Dakwar, G.R.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; Ceelen, W.; De Smedt, S.C.; Remaut, K. Disregarded Effect of Biological Fluids in SiRNA Delivery: Human Ascites Fluid Severely Restricts Cellular Uptake of Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *7*, 24322–24329, doi:10.1021/acsami.5b08805.
 40. Harrison, L.E.; Bryan, M.; Pliner, L.; Saunders, T. Phase I Trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Patients Undergoing Cytoreduction for Advanced Intra-Abdominal Malignancy. *Ann. Surg. Oncol.* **2008**, *15*, 1407–1413, doi:10.1245/s10434-007-9718-8.
 41. Salvatorelli, E.; De Tursi, M.; Menna, P.; Carella, C.; Massari, R.; Colasante, A.; Iacobelli, S.; Minotti, G. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Administered by Intraoperative Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy to Patients with Advanced Ovarian Cancer and Peritoneal Carcinomatosis. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 2365–2373, doi:10.1124/dmd.112.047480.
 42. Dubinsky, T.J.; Cuevas, C.; Dighe, M.K.; Kolokythas, O.; Hwang, J.H. High-Intensity Focused Ultrasound: Current Potential and Oncologic Applications. *American Journal of Roentgenology* **2008**, *190*, 191–199, doi:10.2214/AJR.07.2671.
 43. Huang, L.; Zhou, K.; Zhang, J.; Ma, Y.; Yang, W.; Ran, L.; Jin, C.; Dimitrov, D.D.; Zhu, H. Efficacy and Safety of High-Intensity Focused Ultrasound Ablation for Hepatocellular Carcinoma by Changing the Acoustic Environment: Microbubble Contrast Agent (SonoVue) and Transcatheter Arterial Chemoembolization. *International Journal of Hyperthermia* **2019**, *36*, 244–252, doi:10.1080/02656736.2018.1558290.
 44. de Senneville, B.D.; Moonen, C.; Ries, M. MRI-Guided HIFU Methods for the Ablation of Liver and Renal Cancers. In *Therapeutic Ultrasound*; Escoffre, J.-M., Bouakaz, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; Vol. 880, pp. 43–63 ISBN 978-3-319-22535-7.
 45. Mortezaei, A.; Krauter, J.; Gu, D.A.; Sonderer, J.; Bruhin, J.; Reeve, K.A.; Held, L.; Donati, O.F.; Rupp, N.J.; Moch, H.; et al. Extensive Histological Sampling Following Focal Therapy of Clinically Significant Prostate Cancer with High-Intensity Focused Ultrasound. *J. Urol.* **2019**, 101097JU0000000000000298, doi:10.1097/JU.0000000000000298.
 46. Merckel, L.G.; Knüttel, F.M.; Deckers, R.; van Dalen, T.; Schubert, G.; Peters, N.H.G.M.; Weits, T.; van Diest, P.J.; Mali, W.P.Th.M.; Vaessen, P.H.H.B.; et al. First Clinical Experience with a Dedicated MRI-Guided High-Intensity Focused Ultrasound System for Breast Cancer Ablation. *Eur Radiol* **2016**, *26*, 4037–4046, doi:10.1007/s00330-016-4222-9.
 47. Pitt, W.G.; Hussein, G.A.; Staples, B.J. Ultrasonic Drug Delivery – A General Review. *Expert Opin Drug Deliv* **2004**, *1*, 37–56, doi:10.1517/17425247.1.1.37.
 48. Coleman, A.J.; Saunders, J.E.; Crum, L.A.; Dyson, M. Acoustic Cavitation Generated by an Extracorporeal Shockwave Lithotripter. *Ultrasound Med Biol* **1987**, *13*, 69–76, doi:10.1016/0301-5629(87)90076-7.
 49. Marmottant, P.; Hilgenfeldt, S. Controlled Vesicle Deformation and Lysis by Single Oscillating Bubbles. *Nature* **2003**, *423*, 153–156, doi:10.1038/nature01613.

50. Khosrawipour, V.; Khosrawipour, T.; Kern, A.J.P.; Osma, A.; Kabakci, B.; Diaz-Carballo, D.; Förster, E.; Zieren, J.; Fakhrian, K. Distribution Pattern and Penetration Depth of Doxorubicin after Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) in a Postmortem Swine Model. *J Cancer Res Clin Oncol* **2016**, *142*, 2275–2280, doi:10.1007/s00432-016-2234-0.
51. Ceelen, W.P.; Pählman, L.; Mahteme, H. Pharmacodynamic Aspects of Intraperitoneal Cytotoxic Therapy. *Cancer Treat. Res.* **2007**, *134*, 195–214.
52. Li, T.; Chen, H.; Khokhlova, T.; Wang, Y.-N.; Kreider, W.; He, X.; Hwang, J.H. Passive Cavitation Detection during Pulsed HIFU Exposures of Ex Vivo Tissues and *In vivo* Mouse Pancreatic Tumors. *Ultrasound in Medicine & Biology* **2014**, *40*, 1523–1534, doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2014.01.007.
53. Knight, B.I.; Skellern, G.G.; Smail, G.A.; Browne, M.K.; Pfirrmann, R.W. NMR Studies and GC Analysis of the Antibacterial Agent Taurolidine. *J Pharm Sci* **1983**, *72*, 705–707, doi:10.1002/jps.2600720630.
54. Shah, C.B.; Mittelman, M.W.; Costerton, J.W.; Parenteau, S.; Pelak, M.; Arsenault, R.; Mermel, L.A. Antimicrobial Activity of a Novel Catheter Lock Solution. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 1674–1679, doi:10.1128/AAC.46.6.1674-1679.2002.
55. Rosenblatt, J.; Reitzel, R.A.; Vargas-Cruz, N.; Chaftari, A.-M.; Hachem, R.; Raad, I.I. Comparative Efficacies of Antimicrobial Catheter Lock Solutions for Fungal Biofilm Eradication in an in Vitro Model of Catheter-Related Fungemia. *J Fungi (Basel)* **2017**, *3*, 7, doi:10.3390/jof3010007.
56. Schneider, A.; Sack, U.; Rothe, K.; Bennek, J. Peritoneal Taurolidine Lavage in Children with Localised Peritonitis Due to Appendicitis. *Ped Surgery Int* **2005**, *21*, 445–448, doi:10.1007/s00383-005-1428-3.
57. Sosa Barrios, R.H.; Álvarez Nadal, M.; Burguera Vion, V.; Campillo Trapero, C.; López Melero, E.; Fernández Lucas, M.; Rivera Gorrín, M.E. Relapsing Peritonitis and Taurolidine Peritoneal Catheter Lock: One Center Experience. *J Vasc Access* **2021**, *22*, 261–265, doi:10.1177/1129729820937099.
58. Buchholz, M.; Majchrzak-Stiller, B.; Hahn, S.; Vangala, D.; Pfirrmann, R.W.; Uhl, W.; Braumann, C.; Chromik, A.M. Innovative Substance 2250 as a Highly Promising Anti-Neoplastic Agent in Malignant Pancreatic Carcinoma - *in vitro* and in Vivo. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 216, doi:10.1186/s12885-017-3204-x.
59. Chromik, A.M.; Hahn, S.A.; Daigeler, A.; Flier, A.; Bulut, D.; May, C.; Harati, K.; Roschinsky, J.; Sülberg, D.; Weyhe, D.; et al. Gene Expression Analysis of Cell Death Induction by Taurolidine in Different Malignant Cell Lines. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 595, doi:10.1186/1471-2407-10-595.
60. Rodak, R.; Kubota, H.; Ishihara, H.; Eugster, H.-P.; Könü, D.; Möhler, H.; Yonekawa, Y.; Frei, K. Induction of Reactive Oxygen Intermediates-Dependent Programmed Cell Death in Human Malignant Ex Vivo Glioma Cells and Inhibition of the Vascular Endothelial Growth Factor Production by Taurolidine. *J Neurosurg* **2005**, *102*, 1055–1068, doi:10.3171/jns.2005.102.6.1055.
61. Bedrosian, I.; Sofia, R.D.; Wolff, S.M.; Dinarello, C.A. Taurolidine, an Analogue of the Amino Acid Taurine, Suppresses Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor Synthesis in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Cytokine* **1991**, *3*, 568–575, doi:10.1016/1043-4666(91)90483-t.
62. Erpek, H.; Tuncyurek, P.; Soyder, A.; Boylu, S. Hyaluronic Acid/Carboxymethylcellulose Membrane Barrier versus Taurolidine for the Prevention of Adhesions to Polypropylene Mesh. *Eur Surg Res* **2006**, *38*, 414–417, doi:10.1159/000094748.
63. Arlt, M.J.E.; Walters, D.K.; Banke, I.J.; Steinmann, P.; Puskas, G.J.; Bertz, J.; Rentsch, K.M.; Ehrensperger, F.; Born, W.; Fuchs, B. The Antineoplastic Antibiotic Taurolidine

- Promotes Lung and Liver Metastasis in Two Syngeneic Osteosarcoma Mouse Models and Exhibits Severe Liver Toxicity. *International Journal of Cancer* **2012**, *131*, E804–E812, doi:10.1002/ijc.27378.
64. Arlt, M.J.E.; Walters, D.K.; Banke, I.J.; Steinmann, P.; Puskas, G.J.; Bertz, J.; Rentsch, K.M.; Ehrensperger, F.; Born, W.; Fuchs, B. The Antineoplastic Antibiotic Taurolidine Promotes Lung and Liver Metastasis in Two Syngeneic Osteosarcoma Mouse Models and Exhibits Severe Liver Toxicity. *Int J Cancer* **2012**, *131*, E804-812, doi:10.1002/ijc.27378.
 65. Fahrner, R.; Möller, A.; Press, A.T.; Kortgen, A.; Kiehnopf, M.; Rauchfuss, F.; Settmacher, U.; Mosig, A.S. Short-Term Treatment with Taurolidine Is Associated with Liver Injury. *BMC Pharmacol Toxicol* **2017**, *18*, 61, doi:10.1186/s40360-017-0168-z.
 66. Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M. Hyperthermia – Description of a Method and a Review of Clinical Applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* **2007**, *12*, 267–275, doi:10.1016/S1507-1367(10)60065-X.
 67. Li, D.Y.; Tang, Y.P.; Zhao, L.Y.; Geng, C.Y.; Tang, J.T. Antitumor Effect and Immune Response Induced by Local Hyperthermia in B16 Murine Melanoma: Effect of Thermal Dose. *Oncol Lett* **2012**, *4*, 711–718, doi:10.3892/ol.2012.804.
 68. Kim, J.H.; Hahn, E.W.; Ahmed, S.A. Combination Hyperthermia and Radiation Therapy for Malignant Melanoma. *Cancer* **1982**, *50*, 478–482, doi:10.1002/1097-0142(19820801)50:3<478::aid-cnrcr2820500316>3.0.co;2-6.
 69. 31. ICAO, Manual of the International Civil Aviation Organisation. Standart Atmosphere, Doc 7488-CD, Third Edition, 1993. - Search Results Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=31.%09ICAO%2C+Manual+of++the+International+Civil+Aviation+Organisation.+Standart+Atmosphere%2C+Doc+7488-CD%2C+Third+Edition%2C+1993.&sort=date> (accessed on 6 April 2021).
 70. Grigorie, T.L.; Dinca, L.; Corcau, J.-I.; Grigorie, O. Aircrafts' Altitude Measurement Using Pressure Information: Barometric Altitude and Density Altitude. *WSEAS Trans. Cir. and Sys.* **2010**, *9*, 503–512.
 71. Picard, A.; Davis, R.S.; Gläser, M.; Fujii, K. Revised Formula for the Density of Moist Air (CIPM-2007). *Metrologia* **2008**, *45*, 149–155, doi:10.1088/0026-1394/45/2/004.
 72. Lemoine, L.; Sugarbaker, P.; Van der Speeten, K. Pathophysiology of Colorectal Peritoneal Carcinomatosis: Role of the Peritoneum. *World J Gastroenterol* **2016**, *22*, 7692–7707, doi:10.3748/wjg.v22.i34.7692.
 73. van Baal, J.O.A.M.; van Noorden, C.J.F.; Nieuwland, R.; Van de Vijver, K.K.; Sturk, A.; van Driel, W.J.; Kenter, G.G.; Lok, C.A.R. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J Histochem Cytochem* **2018**, *66*, 67–83, doi:10.1369/0022155417742897.

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

5.1. 01.07. – 31.08. 2016 Zagraniczny staż badawczy

Kierownik Naukowy : Profesor Peter Schierack

Miejsce: Faculty of Natural Sciences, Brandenburg University of Technology Cottbus,

Senftenberg, Niemcy,

Temat: Testowanie i optymalizacja metody negatywnej selekcji do mutagenyzy pałeczek *Salmonella*

Badania na temat roli fimbrii typu 1 pałeczek *Salmonella* spp. we wczesnym etapie patogenezы zakażeń ludzi i zwierząt, które są jednymi z badań statutowych Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej realizowałam również w ramach w.w. stażu naukowego. *Salmonella* spp. mają zdolność do ekspresji fimbrii typu 1 (T1F), które są włókienkowatymi, powierzchniowymi strukturami, będącymi jednym z czynników wirulencji bakterii. Struktury te odpowiedzialne są za adhezję do nabłonka m.in. jelit w trakcie zakażenia. Większość serowarów, w tym serowar *S. Enteritidis* (SE), ekspresjonuje T1F, które mają zdolność do wiązania glikoprotein bogatych w mannozę, dzięki białku FimH, znajdującym się na szczycie T1F. Adhezyna FimH odpowiada za bezpośrednie wiązanie do ligandów bogatych w mannozę. Natomiast serowar *S. Gallinarum* (SG) ekspresjonuje T1F, które posiadają wariant alleliczny białka FimH, z substytucją jednego aminokwasu (T78I), co w konsekwencji prowadzi do utraty zdolności wiązania reszt bogatomannozowych. W rezultacie serowar SG ma obniżoną zdolność do adhezji komórek nabłonkowych. Celem stażu było otrzymanie wariantu pałeczek SE, z ekspresją mannozoopornych T1F, poprzez zamianę sekwencji genu *fimH* szczepu dzikiego, na sekwencję genu *fimH* pochodzącego od SG. Model ten miał służyć do badania roli mannozozależnych fimbrii typu pierwszego w adhezji, inwazji przeżywalności i cytotoksyczności wobec kurzych linii komórkowych. Otrzymanie tego mutantu bakteryjnego przeprowadzane było metodą negatywnej selekcji. Metoda ta jest stosunkowo nowa (Khetrapal et al., 2015r.) i niezbędne było jej zwalidowanie. W ramach w/w stażu zwalidowałam metodę oraz otrzymałam wariant bakterii *Salmonella* Enteritidis z mannozoopornym białkiem FimH pochodzącym od *Salmonelli* Gallinarum. Otrzymałam także konstrukt białka FimH z substytucją jednego nukleotydu, co skutkuje zmianą jednego aminokwasu w białku FimH (Thr78Ile), która jak wcześniej wspomniano, jest przyczyną utraty właściwości wiązania reszt mannozy przez fimbrie typu 1 pochodzące od pałeczek *Salmonella*. Dokonałam tego metodą ukierunkowanej mutagenyzy. Konstruktem w.w. białka, wprowadzonego do plazmidu pET22b+ transformowane następnie zostały bakterie E.coli BL21, co umożliwia produkcję białka FimH, a następnie oczyszczanie przy użyciu złoża NiNTA, dzięki metce histydynowej (6HisTag), zawartej w konstrukcie białka. Tak oczyszczone białko umożliwia badanie m.in. jego oddziaływań z potencjalnymi ligandami. Podsumowując, staż ten zaowocował stworzeniem narzędzi badawczych, umożliwiających kontynuowanie i pogłębienie badań dotyczących patogenezы pałeczek *Salmonella*, co jest jednym ze statutowych tematów badań

Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej. Wyniki badań powstałe w trakcie tego stażu zostały również przedstawione na konferencji: **29.08. – 01.09.2016**; 5th American Society for Microbiology (ASM) Conference on Salmonella, Postdam, Niemcy. **Plakat:** Automated enumeration of Salmonella spp. in cell line infection assays and screening of cell line infectivity among various *Salmonella* isolates; **Autorzy:** Michał Burdukiewicz, **Agata Mikołajczyk**, Istvan Szabo, Jörg Nitschke, Alexander Böhm, Peter Schierack, Rafał Kolenda

5.2. Staż podoktorski:

01.10.2022r – do chwili obecnej (pobyt planowany do 31.03.2024r.)

Aktualnie prowadzę badania dotyczące specyficzności substratowej enzymu deaminazy peptydyloargininowej w ramach stażu podoktorskiego w renomowanej jednostce, jaką jest Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Politechniki Wrocławskiej, której kierownikiem jest prof. dr hab. Marcin Drąg. Wygrałam konkurs na stanowisko adiunkta badawczego i zostałam zatrudniona w międzynarodowym grancie GRIEG, pt.: „Novel mechanisms of PAD activity regulation. Substrate specificity and activation of peptidyl arginine deiminase in the context of rheumatoid arthritis”. Jest to współpraca Uniwersytetu Jagiellońskiego, Uniwersytetu w Bergen (Norwegia) oraz Politechniki Wrocławskiej. Dzięki obecności w tej jednostce, pod superwizją dr hab. Marcina Poręby, prof. uczelni, zgłębiłam molekularne podstawy prozapalnej śmierci komórkowej, która ma kluczowe znaczenie w przypadku zarówno procesów nowotworowych jak i chorób autoimmunologicznych. Oprócz prowadzenia badań nad specyficznością substratową enzymu: deaminazy peptydyloargininowej (PAD), zoptymalizowałam aktywację i wizualizację aktywności enzymu proteolitycznego kalpajny-1, który jest jednym z enzymów biorących udział w prozapalnej śmierci komórkowej jaką jest pyroptoza oraz prowadzę charakterystykę ludzkich makrofagopodobnych linii komórkowej THP-1 pozbawionych genów biorących udział w tej pro-zapalnej śmierci komórkowej, tj. kaspazy-1 oraz gadermidny D. Badania te są częścią manuskryptu, który jest w trakcie przygotowywania. Wiedza i doświadczenie, które zdobywam w trakcie pobytu w tej jednostce mają na celu rozszerzenie mojego warsztatu badawczego o wiedzy dotyczącej molekularnych podstaw prozapalnej śmierci komórkowej, którą chcę wykorzystać w dalszych badaniach dotyczących molekularnych podstaw roli sygnalizacji prozapalnej w przebiegu rozsianych nowotworów powierzchni otrzewnej.

5.3. 2018 - do chwili obecnej - stała współpraca zagraniczna

W 2018r. rozpoczęłam współpracę z dr hab. Verią Khosrawipour oraz dr hab. Tanją Khosrawipour z Heinrich Heine-University and University Hospital Duesseldorf, Duesseldorf, Niemcy. Współpraca rozpoczęła się projektem: „Testowanie nowoczesnych technik chemioterapii bezpośredniej, w oparciu o metodę podciśnieniowej wewnątrztrzewnowej chemioterapii w aerozolu, w leczeniu nowotworów otrzewnej”. Zostałam kierownikiem tego projektu po stronie Polskiej, w którym zaangażowane były następujące jednostki: Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta oraz Centrum Diagnostyki Eksperymentalnej i Innowacyjnych Technologii Biomedycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W trakcie jego trwania kierowałam pracami dotyczącymi potencjału i ograniczeń metody podciśnieniowej, wewnątrztrzewnowej chemioterapii w aerozolu (Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy; PIPAC). Część z prac powstałych w wyniku tego projektu wchodzi w skład cyklu 4 tematycznie powiązanych artykułów naukowych stanowiących podstawę tego wniosku habilitacyjnego i zostały one opisane w rozdziale 4. Pozostałe prace, nie wchodzące w skład cyklu a stanowiące efekt w.w. projektu:

- P5. Khosrawipour, T.; Schubert, J.; Khosrawipour, V.; Chaudhry, H.; Grzesiak, J.; Arafkas, M.; **Mikolajczyk, A.** Particle Stability and Structure on the Peritoneal Surface in Pressurized Intra-peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) Analysed by Electron Microscopy: First Evidence of a New Physical Concept for PIPAC. *Oncology Letters* **2019**, *17*, 4921–4927, doi:10.3892/ol.2019.10162.
- P6. Khosrawipour, V.; **Mikolajczyk, A.**; Schubert, J.; Khosrawipour, T. Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) via Endoscopic Microcatheter System. *Anticancer Research* **2018**, *38*, 3447–3452, doi:10.21873/anticancer.12613.
- P7. **Mikolajczyk, A.**; Khosrawipour, V.; Schubert, J.; Chaudhry, H.; Pigazzi, A.; Khosrawipour, T. Particle Stability During Pressurized Intra-Peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Anticancer Res* **2018**, *38*, 4645–4649, doi:10.21873/anticancer.12769.
- P8. **Mikolajczyk, A.**; Khosrawipour, V.; Schubert, J.; Plociennik, M.; Nowak, K.; Fahr, C.; Chaudhry, H.; Khosrawipour, T. Feasibility and Characteristics of Pressurized Aerosol Chemotherapy (PAC) in the Bladder as a Therapeutical Option in Early-Stage Urinary
- P9. Khosrawipour, V.; **Mikolajczyk, A.**; Paslawski, R.; Plociennik, M.; Nowak, K.; Kulas, J.; Arafkas, M.; Khosrawipour, T. Intrathoracic Aerosol Chemotherapy via Spray-Catheter. *Mol Clin Oncol* **2020**, *12*, 350–354, doi:10.3892/mco.2020.1999.
- P10. Khosrawipour, V.; Reinhard, S.; Martino, A.; Khosrawipour, T.; Arafkas, M.; **Mikolajczyk, A.** Increased Tissue Penetration of Doxorubicin in Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) after High-Intensity Ultrasound (HIUS). *Int J Surg Oncol* **2019**, *2019*, 6185313, doi:10.1155/2019/6185313.
- P11. **Mikolajczyk, A.**; Khosrawipour, V.; Kulas, J.; Kocielek, K.; Migdal, P.; Arafkas, M.; Khosrawipour, T. Release of Doxorubicin from Its Liposomal Coating via High Intensity Ultrasound. *Mol Clin Oncol* **2019**, *11*, 483–487, doi:10.3892/mco.2019.1917.

- P12. **Mikolajczyk, A.**; Khosrawipour, T.; Martino, A.; Kulas, J.; Pieczka, M.; Zacharski, M.; Nicpon, J.; Khosrawipour, V. Enabling Microparticle Imprinting to Achieve Penetration and Local Endurance in the Peritoneum via High-Intensity Ultrasound (HIUS) for the Treatment of Peritoneal Metastasis. *Int J Surg Oncol* **2020**, *2020*, 9679385, doi:10.1155/2020/9679385.
- P13. Lau, H.; Khosrawipour, T.; **Mikolajczyk, A.**; Frelkiewicz, P.; Nicpon, J.; Arafkas, M.; Pigazzi, A.; Knoefel, W.T.; Khosrawipour, V. Intraperitoneal Chemotherapy of the Peritoneal Surface Using High-Intensity Ultrasound (HIUS): Investigation of Technical Feasibility, Safety and Possible Limitations. *J Cancer* **2020**, *11*, 7209–7215, doi:10.7150/jca.48519.
- P14. Lau, H.; Khosrawipour, T.; Alexander, M.; Li, S.; **Mikolajczyk, A.**; Nicpon, J.; Schubert, J.; Bania, J.; Lakey, J.R.T.; Khosrawipour, V. Islet Transplantation in the Lung via Endoscopic Aerosolization: Investigation of Feasibility, Islet Cluster Cell Vitality, and Structural Integrity. *Cell Transplant* **2020**, *29*, 096368972094924, doi:10.1177/0963689720949244.

W **P6** badałam możliwość zastosowania innego typu urządzenia, niż dotychczasowo stosowane, do przeprowadzania zabiegu dootrzewnowej chemioterapii podciśnieniowej w aerozolu (PIPAC – *Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy*). W rozdziale 4. przedstawiłam problemy i wyzwania dotyczące leczenia rozsianych nowotworów otrzewnej oraz przedstawiłam zalety nowej metody jaką jest PIPAC. W metodzie tej roztwór zawierający chemioterapeutyk w kształcie mikrokropelek dostarczany jest za pomocą mikropompy do jamy brzusznej, po wytworzeniu odmy otrzewnowej o ciśnieniu 12 mm Hg. Do tej pory, w metodzie tej wykorzystywano głównie mikropompę (MIP®, Micropump/Capnopen, Reger Medizintechnik, Rottweil, Germany), której stosowanie napotyka ograniczenia z powodu (1) sztywnej budowy wtryskiwacza i głowicy dyszy, przez co dystrybucja chemioterapeutyku w jamie otrzewnej jest niejednorodna, (2) wysokiej ceny urządzenia, około 6 000 PLN, (3) niewielkiej ilości odpowiednio przeszkolonego personelu umiającego korzystać z takiej mikropompy. Dlatego w **P6** badałam możliwości wykorzystania w metodzie PIPAC, znanego i wcześniej już stosowanego w chirurgii, gastroenterologii i pulmonologii, urządzenia jakim jest mikrokateter (MC; PW-205V Olympus Surgical Technologies Europe, Hamburg, Germany), zatwierdzonego przez amerykańską agencję żywności i leków (FDA). Badania przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, przeprowadzone na modelu świńskiej otrzewnej, wykazały, że głębokość wnikania doksorubicyny (PFS®, 2mg/ml, Pfizer Europe) do tkanek, dostarczanej przy użyciu MC, jest na podobnym, a nawet wyższym poziomie, niż przy użyciu MIP. W związku z tym, że MC ma elastyczną końcówkę, która daje możliwość dotarcia dużo bardziej precyzyjnie do ścian jamy otrzewnej, możliwe jest pokonanie ograniczenia niejednorodnej dystrybucji chemioterapeutyku w obrębie jamy otrzewnej, jakie występuje w przypadku stosowania MIP, co w konsekwencji powinno zwiększyć efektywność

chemioterapii. Również cena MC (około 300 PLN) jest dwudziestokrotnie niższa niż MIP, a dzięki powszechności stosowania MC, stosowanie metody PIPAC powinno mieć miejsce w znacznie większej liczbie ośrodków niż było to możliwe przy użyciu MIP. Wyniki te zostały potwierdzone przez inną grupę badawczą (Toussaint L, Sautkin Y, Illing B, et al. Comparison between microcatheter and nebulizer for generating Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Surg Endosc.* 2021;35(4):1636-1643. doi:10.1007/s00464-020-07546-z).

Aktualnie na świecie prowadzonych jest szereg badań nad wykorzystaniem w bezpośredniej terapii przeciwnowotworowej różnych pod względem budowy i wielkości cząsteczek jak: aktywowane *ex-vivo* makrofagi, przeciwciała monoklonalne, czy syntetyczne mikrocząsteczki. W związku z tym, w publikacji **P5** i **P7**, badałam możliwość rozszerzenia rodzaju stosowanych substancji metodą podciśnieniowej aplikacji w aerozolu, o większej strukturze niż wodne bądź liposomalne roztwory doksorubicyny. Przeprowadziłam serię doświadczeń dających pierwszy wgląd na strukturalną integralność i stabilność nano- i mikrocząsteczek w trakcie tworzenia aerozolu przy użyciu w.w. mikrokatetera(MC). Badanymi substancjami były: roztwór bogato białkowy (surowica ludzkiej krwi), bakterie oraz komórki eukariotyczne. Analiza przy użyciu metody SDS-PAGE, szacowania liczby jednostek tworzących kolonie oraz testu żywotność komórek za pomocą błękitu trypanu, wykazała, że po przeprowadzonej procedurze profil białek z zakresu 10kDa-180kDa nie ulega zmianie, nie odnotowano także różnicy w ilości jednostek tworzących kolonie, natomiast statystycznie istotnie zmniejsza się żywotność komórek eukariotycznych, przy jednoczesnym zachowaniu znacznej przewagi komórek żywych (84%).

W publikacjach **P8**. oraz **P9**. zajęłam się możliwościami zastosowania metody podciśnieniowej terapii w aerozolu (PAC) przy podawaniu cytostatyków dopęcherzowo (**P8**), bądź doopłucnowo (**P9**). W obu badaniach posłużono się modelem świni, które post-mortem poddano procedurze cewnikowania przy użyciu wcześniej opisanego mikrokateteru (MC) – P3, bądź przeprowadzono torakotomię, a przez trokar chirurgiczny wprowadzono MC – P4. Następnie dopęcherzowo i doopłucnowo podano doksorubicynę w postaci aerozolu poprzez wprowadzony MC. Przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego, stwierdzono, że nawet pięciokrotnie wyższe stężenia doksorubicyny, niż stężenie tego cytostatyku stosowane w bezpośredniej chemioterapii dootrzewnowej, daje dwukrotnie niższą penetrację ściany pęcherza moczowego w porównaniu ze ścianą otrzewnej. Ponadto wykazano, że wnikanie doksorubicyny do opłucnej ściennej jest podobna jak do otrzewnej ściennej, natomiast penetracja do opłucnej płucnej jest około 1,5x większa niż do opłucnej ściennej. W badaniach

tych po raz pierwszy wykazano, że MC może w sposób efektywny dostarczyć chemioterapeutyki w postaci aerozolu do pęcherza moczowego i jamy opłucnej.

Kolejną fazą współpracy były dalsze badania nad sposobami leczenia nowotworów otrzewnej, w których sprawdzaliśmy możliwość zastosowania ultradźwięków w terapii tej choroby. Oprócz pracy wchodzącej w cykl 4 powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opisanej w rozdziale 4., w którym omówiono również rosnące zainteresowanie i możliwości stosowania ultradźwięków w leczeniu nowotworów, zostały opublikowane również inne prace, z tego zagadnienia, które powstały we współpracy z kolejnym ośrodkiem zagranicznym:

- 1) Division of Colorectal Surgery, Department of Surgery, University of California Irvine (UCI), California, USA.

Dokonano analizy wpływu ultradźwięków na głębokość penetracji doxorubicyny w postaci wodnego roztworu (WD) (**P10**) oraz liposomalnej doxorubicyny (LD) (**P11**) w głąb otrzewnej. Badania wykazały, że zarówno LD jak i WD zdecydowanie lepiej penetrują tkankę otrzewnej, gdy są stosowane w połączeniu z ultradźwiękami, przy czym, WD penetruje lepiej zarówno bez zastosowania ultradźwięków jak i przy ich zastosowaniu. Wiąże się to z fizycznym ograniczeniem cząsteczek LD, których średnica wynosi około 70nm, co bez użycia ultradźwięków utrudnia penetrację w głąb otrzewnej. Zastosowanie ich prowadzi z jednej strony do zniszczenia struktury liposomu, powodując uwolnienie doksorubicyny, co zostało pokazane przy użyciu mikroskopu elektronowego, a z drugiej strony do rozluźnienia struktury otrzewnej, co ułatwia penetrację cząsteczek w głąb tkanki (**P2 – rozdział 4.**). Sprawdzone również w modelu *ex vivo* możliwość wprowadzania za pomocą ultradźwięków, w głąb tkanki otrzewnej większych cząsteczek (glinianu strontu), o wielkości od 5µm - 60µm. Wykazano, że wprowadzenie nawet tak dużych cząsteczek w głąb otrzewnej jest możliwa dzięki zastosowaniu ultradźwięków (penetracja do 300µm), co otwiera nowe możliwości dotyczące rodzaju stosowanych cząsteczek jako potencjalnych nośników lub substancji terapeutycznych w leczeniu nowotworów otrzewnej bądź innych jej schorzeń (**P12**). Ponadto na modelu świńskim post mortem, przeprowadzono eksperyment, w którym analizowano makroskopowo wpływ ultradźwięków na strukturę otrzewnej ściennej oraz makroskopowo i mikroskopowo otrzewnej trzewnej jelit, w związku z tym, że ta struktura mogłaby być w szczególności narażona na potencjalne uszkodzenie, które mogłoby zagrażać zdrowiu i życiu pacjenta w trakcie takiego zabiegu. W trakcie tego eksperymentu, jama brzuszna świni została wypełniona 4L płynu fizjologicznego a końcówka sonikatora, który wytwarzał ultradźwięki, zanurzona była w płynie i umieszczona w pobliżu otrzewnej ściennej i otrzewnej trzewnej jelit, nie mając jednak z nimi bezpośredniego kontaktu. Nie wykazano zmian makroskopowych w przypadku otrzewnej

ściennej oraz otrzewnej trzewnej jelit. Wykazano natomiast znaczące zmiany mikroskopowe otrzewnej trzewnej jelit. Struktura otrzewnej (nabłonka jednowarstwowego płaskiego wraz z tkanką łączną) została zatarta i zwiększyła swoją grubość, co było wprost proporcjonalne do czasu działania ultradźwięków. Ponadto w warstwie podotrzewnowej widoczne jest uszkodzenie warstwy mięśni podłużnych, którego stopień jest wprost proporcjonalna do czasu działa ultradźwięków, jednak bez wpływu na warstwę mięśni okrężnych. Bardzo wyraźne zmiany pojawiły się również w obrębie naczyń krwionośnych występujących na granicy warstwy mięśni podłużnych i okrężnych, co przejawiało się oddzieleniem ścian naczyń od otaczającej tkanki, co najpewniej spowodowane było obecnością większej ilości pęcherzyków gazów wokół naczyń, a ich większa intensywność drgań na skutek działania ultradźwięków jest główną przyczyną uszkodzeń mechanicznych powodowanych przez ultradźwięki **(P13)**. Jedną z prac, obejmowała również możliwość użycia aerozolu do transplantacji wysp trzustkowych do pęcherzyków płucnych, które docelowo mogłyby produkować insulinę. Wyspy trzustkowe wyizolowano ze świń, które następnie hodowano przez 7 dni zanim przystąpiono do eksperymentów. Następnie porównano ich żywotność oraz zdolność do produkcji insuliny przed i po aerolizacji za pomocą wcześniej opisanego mikrokatetera (MC), w modelu ex-vivo, gdzie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Kolejno przeprowadzono zabieg aerolizacji zawiesiny wysp trzustkowych, przeztrachawicowo, do pęcherzyków płucnych po czym potwierdzono ich zagnieżdżenie histopatologicznie. Badania dają wgląd w możliwość zagnieżdżenia wysp trzustkowych w obrębie pęcherzyków płucnych, które potencjalnie mogłyby produkować insulinę **(P14)**.

Kolejno w momencie wybuchu pandemii koronawirusa SARS-CoV-2, Nasza grupa badawcza dalej kontynuowała współpracę z

2) Division of Colorectal Surgery, Department of Surgery, University of California Irvine (UCI), California, USA.

oraz rozszerzyła o kolejne ośrodki:

3) Katedra Medycyny Rodzinnej i Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, z dr n med. Piotrem Kocbachem

Z tymi grupami badawczymi powstała seria publikacji oparta na analizie statystycznej. Począwszy od dystrybucji koronawirusa w zależności od ruchu lotniczego w danych państwach **(P15)**, przez wpływ lock - down wprowadzanych w państwach i skuteczności początkowych zabezpieczeń na dalsze rozprzestrzenianie się patogenu **(P16;17;18)** po metaanalizę danych, które badają możliwość reinfekcji koronawirusowych **(P19)**. W obliczu pandemii i jej bardzo poważnych skutków społecznych w większości państw świata, każde badania prowadzące do

poznania, zrozumienia i zapobiegania rozprzestrzenianiu się patogenu i wywoływanej przez niego choroby jaką jest COVID-19 niosą bardzo dużą wartość zarówno naukową jak i społeczną.

- P15. Khosrawipour, V.; Lau, H.; Khosrawipour, T.; Kocbach, P.; Ichii, H.; Bania, J.; **Mikolajczyk, A.** Failure in Initial Stage Containment of Global COVID-19 Epicenters. *Journal of Medical Virology* **2020**, *92* (7), 863–867. <https://doi.org/10.1002/jmv.25883>.
- P16. Lau, H.; Khosrawipour, V.; Kocbach, P.; **Mikolajczyk, A.**; Ichii, H.; Schubert, J.; Bania, J.; Khosrawipour, T. Internationally Lost COVID-19 Cases. *J Microbiol Immunol Infect* **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.013>.
- P17. Lau, H.; Khosrawipour, V.; Kocbach, P.; **Mikolajczyk, A.**; Schubert, J.; Bania, J.; Khosrawipour, T. The Positive Impact of Lockdown in Wuhan on Containing the COVID-19 Outbreak in China. *J Travel Med* **2020**. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa037>.
- P18. Lau, H.; Khosrawipour, V.; Kocbach, P.; **Mikolajczyk, A.**; Ichii, H.; Zacharski, M.; Bania, J.; Khosrawipour, T. The Association between International and Domestic Air Traffic and the Coronavirus (COVID-19) Outbreak. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* **2020**, *53* (3), 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.026P13>.
- P19. Arafkas, M.; Khosrawipour, T.; Kocbach, P.; Zielinski, K.; Schubert, J.; **Mikolajczyk, A.**; Celinska, M.; Khosrawipour, V. Current Meta-Analysis Does Not Support the Possibility of COVID-19 Reinfections. *Journal of Medical Virology* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1002/jmv.26496>.

W kolejnej fazie współpracy, w której zaangażowana była również II Katedra Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej, Uniwersytetu im. Piastów Śląskich, przeprowadziliśmy serię eksperymentów, w którym sprawdzana była możliwości zastosowania i biologiczna odpowiedź na wewnątrztrzewnową hipertermię wytworzoną gazem powyżej 43°C, przeprowadzone na modelu świńskim. Jedna z prac powstała w ramach tych eksperymentów stanowi pracę wchodzącą w mój cykl prac habilitacyjnych (**P4**). Pozostałe badania zostały opisane w następujących pracach:

- P20. Diakun, A.; Khosrawipour, T.; **Mikolajczyk-Martinez, A.**; Kuropka, P.; Nicpoń, J.; Kiełbowicz, Z.; Prządka, P.; Liszka, B.; Li, S.; Lau, H.; et al. In-Vivo Thermodynamic Exploration of Gas-Based Intraperitoneal Hyperthermia. *Frontiers in Oncology* **2022**, *12*.
- P21. Diakun, A.; Khosrawipour, T.; **Mikolajczyk-Martinez, A.**; Nicpoń, J.; Thelen, S.; Kiełbowicz, Z.; Prządka, P.; Liszka, B.; Kulas, J.; Zielinski, K.; et al. Safety, Feasibility, and Application of Intraperitoneal Gas-Based Hyperthermia beyond 43°C in the Treatment of Peritoneal Metastasis: An in-Vivo Pilot Study. *Front Oncol* **2022**, *12*, 953920, doi:10.3389/fonc.2022.953920.
- P22. Diakun, A.; Khosrawipour, T.; **Mikolajczyk-Martinez, A.**; Nicpoń, J.; Kiełbowicz, Z.; Prządka, P.; Liszka, B.; Kielan, W.; Zielinski, K.; Migdal, P.; et al. The Onset of In-Vivo Dehydration in Gas -Based Intraperitoneal Hyperthermia and Its Cytotoxic Effects on Colon Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* **2022**, *12*.

Wyniki z przedstawionych badań były podstawą do dalszego rozwijania koncepcji, na bazie których napisałam i zdobyłam fundusze w ramach grantu LIDER XIII (patrz poniżej)

5.4. Udział w projektach i zadaniach badawczych

5.4.1. Projekty

2022 - 2024 – jestem wykonawcą na stanowisku adiunkta badawczego w międzynarodowym projekcie GRIEG (UMO-2019/34/H/NZ1/00674)

Tytuł: „Nowe mechanizmy regulacji aktywności PAD. Specyficzność substratowa i aktywacja deiminaz peptydyloargininy w kontekście reumatoidalnego zapalenia stawów”

Źródło finansowania: Norweski Mechanizm Finansowy 2014-2020 - GRIEG-1

Jednostki: Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków; Katedra Chemii Biologicznej i Bioobrazowania, Politechnika Wrocławska; Uniwersytet w Bergen, Norwegia

2023 – 2026 – zostałam laureatką programu LIDER XIII i będę realizowała grant jako kierownik projektu

Tytuł: Zastosowanie hipertermii i dehydratacji gazowej skojarzonej z wewnątrztrzewną podciśnieniową chemioterapią w aerozolu jako innowacyjna metoda terapii nowotworów otrzewnej. Optymalizacja procedury oraz konstrukcja prototypu urządzenia.

Źródło finansowania: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR)

Jednostka naukowa: Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

5.4.2. Zadania badawcze

2015-2016 Byłam kierownikiem zadania badawczego nr B030/0022/15 oraz B030/0023/16, **pt:** „Badanie wpływu oddziaływań pomiędzy domeną lektynową a pilinową białek FimH *Salmoenlla enterica* serowar: **Enteritidis, Typhimurium, Abortus-ovis, Choleraesuis, Dublin i Gallinarum, na ich powinowactwo do struktur oligomannozowych**”. Zadanie finansowano z dotacji na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

2018 Byłam kierownikiem zadania badawczego nr B030/0072/18, **pt:** „Określenie typu śmierci komórkowej kurzych makrofagów po ich infekcji serowarami *S. Enteritidis* i

S. Gallinarum”. Zadanie finansowano z dotacji na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich.

2019 Kierowałam zadaniem badawczym nr B030/0046/19, pt: „**Obrazowanie w czasie rzeczywistym inwazji pałeczek *Salmonella Gallinarum* wobec kurzej monocytarno-makrofagowej linii komórek HD11**” finansowane z dotacji na utrzymanie potencjału badawczego (młodzi naukowcy)

5.5. Staże szkoleniowe

30.10.-03.11.2017 “21st Century Mouse Genetics” , The Jackson Laboratory Highseas Conference Center in Bar Harbor, Maine, Stany Zjednoczone Ameryki (5 dni)

Staż szkoleniowy organizowany przez the Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA, dotyczył badań naukowych i najnowszej wiedzy dotyczącej możliwości tworzenia modeli myszy modyfikowanych genetycznie. Część teoretyczna kursu obejmowała: możliwości zastosowania myszy w badaniach genomicznych, wiedzę potrzebną do wyboru odpowiedniego modelu do badań translacyjnych na myszach oraz zasady i narzędzia genetyczne jakie można wprowadzić do własnych projektów naukowych. Część praktyczna obejmowała pracę w grupach, która dotyczyła: (1) dobrej praktyki technik laboratoryjnych używanych przy pracy z myszami laboratoryjnymi; (2) zapoznanie z techniką CRISPR Cas, tj. projektowanie i genotypowanie gRNA; (3) analizy danych RNAseq oraz (4) Praktyka indywidualna w zakresie pisania wniosków grantowych do National Healthcareer Association (NHA), które były recenzowane przez prowadzących kurs z informacją o mocnych i słabych stronach przykładowego projektu. Podsumowując, kurs ten wniósł ważne informacje dotyczące najnowszych możliwości zastosowania myszy w badaniach genomicznych i genetycznych a także rozwinął moje umiejętności z zakresu podstawowych technik laboratoryjnych w pracy z myszami. Szczególnie istotne było wprowadzenie do techniki CRISPR Cas, która jest jedną z najnowocześniejszych metod modyfikacji genetycznych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Technikę tą będę niebawem wykorzystywała w trakcie realizacji przyznanego mi grantu LIDER XIII, którego jestem kierownikiem.

20.11 - 22.11.2017 Handling and Dosing Course, Catheter Workshop, Basic Anesthesia in the Göttingen Minipig, Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Dalmose, Dania (3 dni)

Staż szkoleniowy organizowany przez firmę Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Dalmose, Dania, umożliwił mi zapoznanie się z podstawami dotyczącymi pracy ze świniami

miniaturowymi Gottingen, które są modelem dużych zwierząt do badań naukowych. Kurs obejmował część teoretyczną i część praktyczną. W części teoretycznej, której również towarzyszyło oprowadzanie po całym terenie hodowli zwierząt, zapoznano mnie z informacjami dotyczącymi ich hodowli, biologii i rozrodu. W przypadku modeli dużych zwierząt powszechnie występującym problemem jest różnorodność genetyczna i mikrobiologiczna poszczególnych osobników. W przypadku tych świń, ich genetyka i status mikrobiologiczny są zdefiniowane i niezmiennie pomiędzy osobnikami, co czyni je bardzo dobrym modelem do badań naukowych. Ponadto przedstawione zostały metody postępowania ze zwierzętami w zakresie osvajania i przeprowadzania kontroli ich stanu zdrowia i ich pielęgnacji. Omówiono także wiadomości z zakresu anatomii, anestezji i analgezji, niezbędne do przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych. Kolejno kurs obejmował część praktyczną, w której nauczyłam się postępowania przy pierwszym kontakcie ze zwierzętami i ich osvajania. Następnie nauczyłam się technik poskrabiania oraz iniekcji podskórnych i pobierania krwi z żyły usznej, odpiszczelowej i szyjnej. Kolejno pod nadzorem prowadzącego kurs wykonałam katetyzację: żyły usznej, żyły odpiszczelowej oraz żyły szyjnej. Przeprowadziłam także procedurę umieszczania kateteru w żyłę szyjną, który jest połączony z systemem do deponowania leków lokowanym na karku. System ten może być wykorzystywany przez kilka tygodni do dożylnego podawania leków bez konieczności ponownego nakłuwania zwierząt, co minimalizuje ich stres i zaoszczędza czas. Część praktyczna obejmowała również intubację dotchawiczą oraz zakładanie cewnika u samic oraz przeprowadzanie eutanazji zwierząt. Kurs ten dał mi niezwykle ważne umiejętności związane z planowaniem i wykonywaniem eksperymentów na tym gatunku zwierząt. Wykorzystałam te umiejętności przy pracy w projekcie dotyczącym leczenia nowotworów otrzewnej u ludzi, gdyż model świński, ze względu na rozmiar zwierząt, jest najlepszym modelem zwierzęcym do badań nad chorobami obejmującymi jamę brzuszną. Na bazie zdobytych doświadczeń, napisałam projekt, który dostał finansowanie w ramach programu LIDER XIII, dotyczący właśnie stworzenia modelu nowotworu otrzewnej u świni i metod jego leczenia.

28.11. - 01.12.2017 “Workshop on Surgical Techniques in the Laboratory Mouse”, The Jackson Laboratory, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curiein Paryż, Francja (4 dni)

Staż szkoleniowy na Uniwersytecie Piotra i Marii Curie w Paryżu organizowany był przez The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA, podczas którego zdobyłam praktyczną wiedzę i umiejętności z zakresu postępowania i zabiegów chirurgicznych przeprowadzanych

na modelu mysim. Szkolenie obejmowało informacje z zakresu anatomii myszy, wprowadzenie do anestezji i analgezji oraz procedur chirurgicznych wykonywanych na zwierzętach laboratoryjnych. Podczas stażu samodzielnie wykonywałam iniekcje podskórne, dootrzewnowe oraz zabiegi chirurgiczne takie jak: kastrację, wazektomię, splenektomię, adrenalalektomię, nefrektomię, tymektomię, owariektomię, transplantację jajnika, czy katetyzację żyły szyjnej. Zdobyta podczas stażu wiedza i umiejętności praktyczne zostały przeze mnie wykorzystane w celach naukowych, gdyż w późniejszej pracy badawczej nad patogenezą zakażeń pałeczkami *Salmonella*, przeprowadziłam eksperyment dotyczący roli fimbrii typu 1 pałeczek *S. Enteritidis* w indukcji zapalenia jelit na modelu mysim oraz zostanie wykorzystana przy realizacji projektu LIDER XIII, gdyż w pierwszym etapie badań będzie obejmował model myszy a dopiero, w kolejnym etapie przewidziany jest model świni.

5.6. Kursy i szkolenia

2021 Trening z podstaw cytometrii przepływowej, CheekyScientist program ExCyte, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich, Wrocław

2018 Szkolenie z zakresu dobrej praktyki laboratoryjnej; system jakości GLP – regulacje prawne i podstawowe wymagania

2015 „Planowanie i wykonywanie procedur i doświadczeń oraz uśmiercanie zwierząt”; Wrocław, Pollasa (Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych) - zapoznanie się z aktualną wiedzą i przepisami prawa z zakresu dobrostanu oraz procedur przeprowadzanych na różnych gatunkach zwierząt laboratoryjnych (ptaki, małe ssaki).

2015 Multi-omica – biologia systemów w badaniach medycznych, Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

2014 Sukces amplifikacji i analizy ilościowej –Podstawy oraz praktyczne wskazówki do zaplanowania, przeprowadzenia i oceny wyników PCR w czasie rzeczywistym

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

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne:

Od 2020 - jestem opiekunką roku na kierunku Weterynaria dla studiów niestacjonarnych

19.11.2020 - byłam członkinią komisji w sekcji nauk podstawowych na XXXVII Sejmiku Studenckich Kół Naukowych

2019 – 2020 - byłam opiekunką wolontariatu studentów:

- Klaudii Kocielek, studentki III roku studiów inżynierskich na kierunku Zootechnika na Wydziale Biologii i Hodowlii Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w okresie: od 06.2018 – 12.2018

- Marka Pieczki; studenta III roku studiów licencyjnych na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Hodowlii Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w okresie: od 06.2018r. – 09.2019r.

2019 – do teraz - zaangażowałam studentkę z kierunku weterynaria: Joannę Kulas w międzynarodowy projekt „Testowanie nowoczesnych technik chemioterapii bezpośredniej, w oparciu o metodę podciśnieniowej wewnątrztrzewnowej chemioterapii w aerozolu, w leczeniu nowotworów otrzewnej” W rezultacie jest ona współautorem w wydanych publikacjach.

od 2014 prowadzę zajęcia (ćwiczenia i seminaria) dla polskich, a od 2017 również anglojęzycznych studentów I i II roku na kierunku weterynaria, z następujących przedmiotów:

- 1) Chemia – 120 godzin/rok
- 2) Chemisty – 30 godzin/rok
- 3) Biochemia – 120 godzin/rok

Korzystam przy nauczaniu z metod kształcenia na odległość – platforma EDUWET (komunikacja ze studentami, umieszczanie materiałów dydaktycznych, przeprowadzanie testów)

6.2. Promotorstwa prac magisterskich i prac doktorskich

2022 – do chwili obecnej - Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej Asystent II Katedry Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Onkologicznej, Uniwersytetu im. Piastów Śląskich, lek.med. Agaty Diakun, pt: „Analiza możliwości zastosowania i biologicznej odpowiedzi na wewnątrztrzewnową hipertermię wytworzoną gazem powyżej 43°C”.

2022 – do chwili obecnej - Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej doktoranta Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, mgr. Marka Pieczki, pt: „Określenie różnorodności repertuaru i swoistości receptorów antygenowych limfocytów w przebiegu chłoniaków B i T komórkowych psa w celu wytworzenia szybkich testów diagnostycznych”

2019 – 2021 - Pełniłam rolę opiekuna pomocniczego pracy magisterskiej Marka Pieczki, studenta Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pt.: „Wpływ genu rfaH pałeczek *Salmonella* Gallinarum na ich agregację oraz adhezję i inwazyjność wobec kurzej monocytarno-makrofagowej linii HD11”. **Praca została obroniona z wyróżnieniem 14.07.2021r.**

6.3. Działalność popularyzatorska

2019 – 2021 - Pełniłam rolę ambasadorki start up: „Lab Twin”, który zajmował się tworzeniem aplikacji wspierającej pracę w laboratorium dla naukowców, tj. możliwość zdalnych komend głosowych dla aplikacji, która miała za zadanie odczytywać protokoły bądź je zapisywać, gromadzić informacje oraz pomóc w codziennej organizacji pracy. Moim zadaniem było udzielanie informacji, które pomogły w stworzeniu jak najbardziej funkcjonalnego i praktycznego oprogramowania oraz wspieranie promocji aplikacji.

17.04. 2015 - Przeprowadziłam lekcję pokazową z zakresu biologii molekularnej z aktywnym uczestnictwem uczniów z Zespołu Szkół Ogólnokształcących w Świebodzicach.

6.4. Działalność organizacyjna oraz przynależność do stowarzyszeń

2022 - do chwili obecnej - jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych

2022 - do chwili obecnej – jestem członkiem Międzynarodowego Stowarzyszenia Badań nad Opłucną i Otrzewną (International Society For The Study of Pleura and Peritoneum - ISSPP)

2019 Będąc na międzynarodowej konferencji w Glasgow nawiązałam współpracę oraz zaprosiłam i zorganizowałam gościnny wykład przeprowadzony przez dr Jasona Paxmana (Department of Biochemistry and Genetics, La Trobe Institute for Molecular Science La Trobe University Melbourne, Australia) pt.: „Understanding the molecular roles of non-fimbrial adhesins in bacterial infections”. Wykład odbył się 09.09.2019 na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej we Wrocławiu

2018 – do chwili obecnej – jestem Członkiem Komisji ds. sprawozdawczości i informacji o działalności badawczej przy Radzie Dyscypliny Weterynaria (POLON). Moim zadaniem jest koordynowanie działań mających na celu dokładne i sprawne przygotowanie danych do ewaluacji działalności naukowej Katedry Biochemii i Biologii Molekularnej

2016 – 2018 - pełniłam rolę członka Komisji Dziekańskiej ds. informacji o działalności naukowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

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

7.1. Nagrody:

2023 - Otrzymałam Nominację do Nagrody: „Naukowiec Przyszłości 2023 – Kobieta nauki, która zmienia świat” – przyznawaną przez Fundację Forum Inteligentnego Rozwoju

2022 – Otrzymałam Nagrodę Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, indywidualną, specjalną: „Za najwyższą liczbę cytowań”

2021 – Wg. ewaluacji Nauczycieli akademickich Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, zostałam Najlepszym Asystentem Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, za lata 2017-2020

2020 - Otrzymałam Nagrodę Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Organizacyjną, Indywidualną III stopnia: „ Za rozszerzanie współpracy międzynarodowej na rzecz podnoszenia jakości badań naukowych, prac rozwojowych.”

2016 – Zostałam wyróżniona za najlepszą pracę przedstawioną przez młodych pracowników nauki w Sekcji Nauk Podstawowych, Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych; PTNW, Lublin; Wygłosiłam **prezentację ustną, pt:** Expression, purification and analysis lectin domain of FimH protein in selected serovars of *Salmonella enterica enterica*

7.2. Recenzje i działalność edytorska

2020-2022 Przeprowadziłam 11 recenzji dla czasopism wyróżnionych w JCR, m.in.:

Journal of Infection – IF 38,637

Biology - IF 5,168

Frontiers in Pharmacology - IF 5,988

Diagnostics - IF 3,992

International Journal of Environmental Research and Public Health – IF 4,614

Infectious Disease Reports – IF 1,57

2022 -2023 Jestem Edytorem w kolekcji specjalnej, zatytuowanej: "Advancements and Challenges of Intrapleural and Peritoneal Drug Delivery"; Pharmaceutics, MDPI, IF 5,

7.3. Dane bibliometryczne

Tabela 2. Sumaryczna punktacja publikacji.

	Liczba prac	Punkty
Sumaryczny Impact factor publikacji ¹	18	86,551
Sumaryczny Impact factor prac cyklu habilitacyjnego ¹	4	12,968
Sumaryczny Impact factor po wyłączeniu prac stanowiących cykl Habilitacyjny ¹	14	73,583
Sumaryczna punktacja MNiSW publikacji ²	22	1340
Sumaryczna punktacja MNiSW prac wyróżnionych w JCR ²	18	1160
Sumaryczna punktacja MNiSW prac w czasopismach nieposiadających współczynnika IF ²	4	180
Sumaryczna punktacja MNiSW prac cyklu habilitacyjnego ²	4	240
Sumaryczna punktacja MNiSW po wyłączeniu prac stanowiących cykl habilitacyjny ²		920
Referaty z konferencji i komunikaty zjazdowe	10	-

¹Sumaryczna punktacja zawarta w tabeli 2 dotyczy publikacji zweryfikowanych przez Bibliotekę UPWr. zgodnie z wartością 2-letniego IF.

²Punktację MNiSW podano zgodnie z wykazem Ministra Edukacji i Nauki (zgodnie z wykazem MNiSW) w roku publikacji.

Liczba cytowań według bazy Scopus na dzień 09.01.2023r.: 975, bez autocytowań: 902
Liczba cytowań według bazy Web of Science Core Collection na dzień 09.01.2023r.: 957,
bez autocytowań: 891
Indeks Hirscha według bazy Web of Science: 10
Indeks Hirscha według bazy Scopus: 9

.....
(podpis wnioskodawcy)