



Autoreferat
dr Beata Orzechowska

Laboratorium Wirusologii, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

Wrocław, wrzesień 2023

1. Imię i nazwisko

Beata Urszula Orzechowska

<https://orcid.org/0000-0002-5125-8947>

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

- Stopień doktora nauk biologicznych:

nadany przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w dniu **28.06.2001**; Tytuł rozprawy doktorskiej: „Znaczenie wybranych cytokin w naturalnej przeciwwirusowej odporności ludzkich leukocytów krwi obwodowej”.

Promotor: prof. dr hab. Zofia Błach-Olszewska

- Tytuł magistra biologii:

nadany przez Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, w dniu **14.06.1995**. Tytuł pracy magisterskiej: „Terapia PADMA 28 i jej wpływ na fagocytozę *Staphylococcus aureus* 209 P przez neutrofile u dzieci cierpiących na nawracające infekcje dróg oddechowych”.

- Wykształcenie uzupełniające:

2015-2016: studia podyplomowe: Badania klinicznej-metodologia, organizacja i zarządzanie (Medyczne Centrum Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków).

Kursy i szkolenia:

23.05.2023: Warsztaty Terapii Komórkowej, Biotechnologiczny ośrodek szkoleniowy Leiden, Holandia.

16-20.11.2015: Szkolenie Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych, PolLASA, Wrocław.

2014: Uzyskanie tytułu Diagnosty Laboratoryjnego (nr wpisu 16729) z Prawem wykonywania Zawodu Diagnosty Laboratoryjnego o numerze: 14425; potwierdzonym przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych.

2013: Uzyskanie tytułu Europejskiego Specjalisty Chemii klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej – Registered European Clinical Chemist (EurClinChem), nadanego przez Konfederację Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej Wspólnoty Europejskiej EC4 (The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) (dawniej EFCC).

2011: Uzyskanie tytułu Międzynarodowego Technologa w zakresie biologii molekularnej (International Technologist in Molecular Biology **MB(ASCPi)^{CM}, ID:25419951** nadanego przez ASCP (American Society for Clinical Pathology) i Board of Certification -BOC) (od 2011 –obecnie)

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

- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Wirusologii,
od 25.10.1994 – do dzisiaj

na stanowiskach: adiunkta (01.04.2013 - do dzisiaj)

asystenta (15.11.1995 - 31.03.2013)

- Katedra Fizjologii i Neurobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego,

na stanowisku: adiunkta (1.04.2019 – 30.09.2019)

4. Osiągnięciem w myśl ustawy (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.)) jest wskazany poniżej cykl publikacji powiązanych tematycznie, dołączony do dokumentacji jako załącznik nr 3.

a. tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego Cykl 8 publikacji pod wspólnym tytułem:

Opracowanie modeli badań doświadczalnych wybranych strategii terapii przeciwnowotworowych

b. Łączna wartość wskaźników bibliometrycznych prac składających się na osiągnięcie naukowe:

IF = **32,788**

Łączna liczba cytowań według Scopus – **215**

Łączna liczba cytowań według Scopus bez autocytowań – **205**

Liczba punktów ministerialnych prac włączonych do cyklu – **273**

c. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Na cykl publikacji wchodzący w skład osiągnięcia naukowego składa się z 8 prac. Dwie pierwsze publikacje (poz 1 i poz 2) powstały w wyniku prac badawczych przeprowadzonych podczas stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Oregońskim (OHSU - Oregon Health & Science University), gdzie uczestniczyłam w opracowaniu **zwierzęcego modelu** na potrzeby badań nowotworów wywołanych infekcjami wirusowymi. Kolejne prace dotyczą opracowań **modeli badawczych służących do oceny terapii przeciwnowotworowych**. Dwie publikacje (poz 3 i poz 4) dotyczą opracowania modelu zakażeń wirusem VSV (Vesicular Stomatitis Virus), badań jego właściwości onkolitycznych i potencjalnym zastosowaniem w terapii nowotworów. W następnych 4 pracach (poz 5, 6, 7, 8) ocenie zostały poddane przeciwnowotworowe **właściwości wybranych substancji pochodzenia naturalnego** takich jak bajkalina, betulina i nanoemulsje.

1. **Orzechowska BU**, Powers MF, Sprague J, Li H, Yen B, Searles RP, Axthelm MK, Wong SW ✉.: Rhesus macaque rhadinovirus-associated non-Hodgkin lymphoma: animal model for KSHV-associated malignancies.; Blood. 2008 Nov 15;112(10):4227-34. doi: 10.1182/blood-2008-04-151498.

IF=10,432 (24 punkty MNiSW) (60 cyt. – Web of Science, 65 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: Wiodący udział w przygotowaniu hipotezy badawczej i planu badań, analiza infekcji wirusowej w tkankach nowotworowych na poziomie DNA/ RNA i białek wirusowych; wykonanie i analiza eksperymentów immunohistochemicznych (IHC), hybrydyzacji in situ (in situ hybridization-ISH), immunofluorescencji, analiz mikroskopowych, wykonanie zdjęć; wykonanie i analiza ekspresji genów z użyciem PCR w czasie rzeczywistym (Real Time PCR), udział w analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu. Doświadczenia zostały sfinansowane przez Public Health Service, grant „Rhesus HHV-8 homologue in AIDS-related Malignancies (5R01CA075922-12), National Institutes of Health (NIH).

2. **Orzechowska BU**, Manoharan M, Sprague J, Estep RD, Axthelm MK, Wong SW ✉.: Viral interleukin-6 encoded by rhesus macaque rhadinovirus is associated with lymphoproliferative disorder (LPD).; J Med Primatol. 2009 Oct;38 Suppl 1: 2-7. doi: 10.1111/j.1600-0684.2009.00369.

IF: 1,107 (24 punkty MNiSW) (7 cyt. – Web of Science, 9 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: wiodący udział w przygotowaniu koncepcji i planowaniu badań, ocena obecności wirusowego DNA w wycinkach tkanek nowotworowych; wykonanie eksperymentów immunohistochemicznych (IHC): przygotowanie tkanek, przeprowadzenie hybrydyzacji in situ (ISH), badań immunofluorescencji, analiz mikroskopowych, wykonanie zdjęć, napisanie manuskryptu. Eksperymenty zostały sfinansowane w ramach projektów przyznanych przez Public Health Service: RR00163 and CA 75922 (SFW).

3. **Orzechowska BU ✉**, Jędryka M, Zwolińska K, Matkowski R.: VSV based virotherapy in ovarian cancer: the past, the present and ...future?; J Cancer. 2017 Jul 22;8(12):2369-2383. doi: 10.7150/jca.19473.; IF=3,249

IF=3,249 (30 punktów MNiSW) (autor korespondencyjny) (8 cyt. – Web of Science, 9 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: przygotowanie koncepcji i planu pracy, danych literaturowych, w przygotowanie manuskryptu w wersji pierwotnej i ostatecznej oraz odpowiedzi na recenzje. Publikacja pracy została wsparta finansowo przez Wrocławskie Centrum Biotechnologii, program Krajowy Ośrodek Badań Wiodących (KNOW) na lata 2014-2018 (49/2018/KNOW/IITD)

4. Tomczyk T, Wróbel G, Chaber R, Siemieniec I, Piasecki E, Krzystek-Korpacka M, **Orzechowska BU** ✉.: Immune Consequences of in vitro Infection of Human Peripheral Blood Leukocytes with Vesicular Stomatitis Virus.; J Innate Immun. 2018;10(2):131-144. doi: 10.1159/000485143.

IF=4,085 (35 punktów MNiSW) (autor korespondencyjny) (14 cyt. – Web of Science, 14 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: wiodący udział w opracowaniu koncepcji i hipotezy badania, protokołów eksperymentów, nadzór i konsultacje w trakcie przebiegu doświadczeń wykonywanych przez doktoranta Tomasza Tomczyka i technika Iwonę Siemieniec, udział w analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu w wersji pierwotnej i ostatecznej;*

**habilitant był promotorem pomocniczym przewodu doktorskiego dr Tomasza Tomczyka. Prace eksperymentalne zostały wykonane z udziałem funduszy KNOW (14/2018/KNOW/IITD) oraz Fundacji (GR8/F/2015), Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.*

5. **Orzechowska B** ✉, Chaber R, Wiśniewska A, Pajtasz-Piasecka E, Jatczak B, Siemieniec I, Gulanowski B, Chybicka A, Błach-Olszewska Z.: Baicalin from the extract of *Scutellaria baicalensis* affects the innate immunity and apoptosis in leukocytes of children with acute lymphocytic leukemia.; Int Immunopharmacol. 2014 Dec;23(2):558-67. doi: 10.1016/j.intimp.2014.10.005.

IF=2,472 (30 punktów MNiSW) (autor korespondencyjny) (44 cyt. – Web of Science, 48 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: opracowanie koncepcji i hipotezy znacznej części badań, bezpośredni udział we wszystkich procedurach eksperymentalnych i nadzór nad pracą techników Agnieszki Wiśniewskiej, Iwony Siemieniec i Bogny Jatczak,, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu w wersji pierwotnej i ostatecznej oraz odpowiedzi na recenzje. Praca została sfinansowana z grantu nr. N N407 081439 uzyskanego z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

6. **Orzechowska BU** ✉, Wróbel G, Turlej E, Jatczak B, Sochocka M, Chaber R.: Antitumor effect of baicalin from the *Scutellaria baicalensis* radix extract in B-acute lymphoblastic leukemia with different chromosomal rearrangements.; Int Immunopharmacol. 2020 Feb;79:106114. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106114.

IF=4,932 (70 punktów MNiSW) (autor korespondencyjny) (20 cyt. – Web of Science, 21 cyt. Scopus)

Wkład habilitanta: wiodący udział w przygotowaniu koncepcji i hipotezy badań, udział w prowadzeniu eksperymentów, nadzór nad pracą technika Bogny Jateczak, analiza danych, przygotowanie manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje. Prace eksperymentalne i publikacja zostały finansowo wsparte przez Fundację „Na ratunek dzieciom z chorobą nowotworową” (GR8/F/2015), Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

7. Bębenek E✉, Jastrzębska M, Kadela-Tomanek M, Chrobak E, **Orzechowska B**, Zwolińska K, Latocha M, Mertas A, Czuba Z, Boryczka S.: Novel Triazole Hybrids of Betulin: Synthesis and Biological Activity Profile.; *Molecules*. 2017 Nov 1;22(11):1876. doi: 10.3390/molecules22111876.

IF=3,098 (30 punktów MNiSW) (40 cyt. – *Web of Science*, 41 cyt. *Scopus*)

Wkład habilitanta: opracowanie koncepcji, hipotezy i wykonanie badań wpływu badanych związków na proliferację linii nowotworowej, nadzór i konsultacje przebiegu eksperymentów dotyczących właściwości przeciwwirusowych preparatów. Praca została sfinansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach. Grant nr KNW-1-015/K/7/O i KNW-2-011/N/7/N.

8. **Orzechowska BU**, Kukowska-Latallo JF, Coulter AD, Szabo Z, Gamian A, Myc A✉.: Nanoemulsion-based mucosal adjuvant induces apoptosis in human epithelial cells.; *Vaccine*. 2015 May 5;33(19):2289-2296. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.002

IF=3,413 (30 punktów MNiSW) (8 cyt. – *Web of Science*, 8 cyt. *Scopus*)

Wkład habilitanta: udział w przygotowaniu koncepcji, hipotezy i planowaniu badań, udział w prowadzeniu eksperymentów tj.: zaprojektowaniu i wykonaniu doświadczeń dotyczących cytotoksyczności nanoemulsji, oceny zdolności różnych nanoemulsji do indukcji apoptozy w komórkach linii nowotworowych (pomiar apoptozy przy użyciu cytometrii przepływowej, oznaczanie aktywacji kaspaz 1, 3/7, 6, 8 i 9), nadzorze nad pracą laborantów, przeprowadzenie analizy wyników, oraz opisie części metodyki. Badania zostały sfinansowane z grantu nr HHSN272200900031C (Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych, NIH) oraz przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ w ramach projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne – BioMed” (POIG 01.01.02-02 -003/08-00) finansowany z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, 1.1.2)

Inspiracją do podjęcia opisanych poniżej badań były wyniki uzyskane zarówno w trakcie mojej pracy doktorskiej, jak i stażu naukowego który odbyłam na Uniwersytecie Oregońskim (Oregon Health and Science University, (OHSU), w Instytucie Szczepionek i Terapii Genowej (Vaccine and Gene Therapy Institute VGTI, w USA. Moja praca doktorska dotyczyła określania poziomu naturalnej, wrodzonej odporności przeciwwirusowej ludzkiego organizmu, w której wykorzystyłam opracowany przeze mnie model zakażenia ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (Peripheral Blood Leukocytes- PBLs) wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (Vesicular Stomatitis Virus -VSV)^{1,2}. Wyniki moich badań wykazywały, że zasadne jest postawienie nowej hipotezy, zgodnie z którą niektóre subpopulacje leukocytów mogłyby różnić się między sobą pod względem wrażliwości na zakażenie w modelu

badawczym z zastosowaniem wirusa VSV. Co więcej, zidentyfikowanie właściwości onkolitycznych tego wirusa było przyczyną do rozpoczęcia badań tropizmu VSV w kontekście potencjalnych terapii przeciwnowotworowych.

Podczas staży zagranicznych pogłębiłam swoją wiedzę odnośnie mechanizmów, przez które wirusy mogą wpływać na procesy nowotworowe, którą wykorzystałam w swoich kolejnych pracach badawczych.

Przedstawione w autoreferacie osiągnięcia wiążą się z następującymi nurtami badawczymi:

1. Opracowanie modelu zakażenia makaków królewskich wirusami SIV lub RRV jako strategii badawczej patogenezy wirusowych zakażeń u ludzi

Podczas stażu w VGTI OSHU byłam przede wszystkim zaangażowana w prace badawczo-rozwojowe w celu opracowania zwierzęcego modelu badawczego - kluczowego dla pełniejszego zrozumienia procesów rozwoju nowotworów wywoływanych infekcjami wirusowymi oraz identyfikacji potencjalnych czynników istotnych w rozwoju chłoniaków nieziarniczych (NHL, Non-Hodgkin Lymphoma). Chłoniaki nieziarnicze zaliczane do złośliwych chorób limfoproliferacyjnych, stanowią heterogenną grupę pod względem epidemiologicznym, histopatologicznym i klinicznym i występują stosunkowo często u osób z upośledzoną odpornością lub zakażonych wirusem ludzkiego nabytego niedoboru odporności (Human Immunodeficiency Virus- HIV) i dodatkowo innymi wirusami, w tym ludzkim wirusem opryszczki typu 8 (Human Herpesvirus 8- HHV-8) znanym także w nomenklaturze jako wirus mięsaka Kaposiego (Kaposi sarcoma-associated herpesvirus –KSHV)³. Zakażenie KSHV/HHV-8 jest ponadto powszechnie uznawane za jeden z podstawowych czynników etiologicznych układowej choroby Castelmanna (HHV8-associated multicentric Castelman disease-HHV8-MCD) oraz chłoniaków B-komórkowych, w tym pierwotnego chłoniaka wysiękowego (PEL, Primary Effusion Lymphoma)³. W swoich badaniach posługiwałam się opracowanym przeze mnie modelem badawczym wykorzystującym makaki królewskie (*Macaca mulatta*) oraz wirusy zwierzęce, tj. małpi wirus niedoboru odporności SIV (Simian Immunodeficiency Virus) oraz rhadinowirus (Rhesus rhadinovirus -RRV). SIV, podobnie jak HIV należy do rodziny *Retroviridae* i wykazuje genetyczne i strukturalne pokrewieństwo z HIV. W wyniku zakażenia tym wirusem u makaków rozwija się małpia forma AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności. Rhesus rhadinovirus jest natomiast spokrewniony z KSHV/HHV8 i podobnie jak KSHV, należy do podrodziny *Gammaherpesvirinae*. Analiza sekwencji DNA potwierdziła, że genom RRV jest w zasadzie kolinearny z KSHV i koduje wiele unikatowych ramek odczytu, potencjalnie powiązanych z postępem choroby. Z wykorzystaniem powyższego modelu badawczego udowodniłam, że koinfekcja makaków królewskich wirusami SIV i RRV może prowadzić do rozwoju objawów chorobowych podobnych do zaobserwowanych u pacjentów zakażonych wirusami HIV i KSHV co zostało przedstawione w opublikowanej pracy pt.: **”Rhesus macaque rhadinovirus-associated non-Hodgkin lymphoma: animal model for KSHV-8 associated malignancies”** (Blood 2008; Nov 15;112 (10):4227-34).

Publikacja ta zyskała wyjątkowe uznanie i wciąż budzi duże zainteresowanie. Ponadto jest nadal aktualna, czego potwierdzeniem jest 60 cytowań oraz ciągle odniesienia w literaturze naukowej.

Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem opracowanego przeze mnie modelu badawczego potwierdziła, że eksperymentalne zakażenie makaków wirusami SIV i RRV prowadziło do hiperplazji limfocytów B, limfadenopatii i przewlekłej wiremii RRV, a w konsekwencji nasilonych objawów klinicznych. Ogółem, około 20-30% zakażonych zwierząt rozwijało chłoniaki, proliferacyjne zmiany mezenchymalne określane jako włókniakowatość zaotrzewnowa (Retroperitoneal fibromatosis, RF) lub systemową chorobę Castlemana, co pozostaje zgodne z szacunkami odsetka ludzi zakażonych HIV i KSHV, którzy rozwijają mięsaki Kaposiego, chorobę Castlemana, pierwotne chłoniaki opłucnej lub chłoniaki niezłośliwe. Ponadto, w analizach molekularnych potwierdziłam obecność RRV w zmianach nowotworowych u eksperymentalnie zakażonych makaków. Badania samej ekspresji wybranych genów RRV z wykorzystaniem techniki RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR, reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją) w komórkach chłoniaka obejmujących fragmenty ramek odczytu: ORF-R2, ORF-71, ORF-72 i ORF-73, wykazały wytwarzanie istotnych dla etiopatogenezy białek wirusowych. ORF-R2 koduje strukturalny i funkcjonalny homolog małpiej interleukiny-6 (IL-6). RRV vIL-6, podobnie jak IL-6, jest zdolna do indukcji proliferacji limfocytów B. Z kolei, RRV ORF-71 koduje wirusowe białko vFLIP (viral FLICE-Like Inhibitory Protein), które pełni podobną rolę jak komórkowe FLICE (FADD - like IL-1 β -converting enzyme), tj. hamuje programowaną śmierć komórek (apoptozę). ORF-72 koduje białko zwane v-cyclin, które jest odpowiednikiem komórkowego białka zwanych cyklina D, biorącego udział w regulacji cyklu komórkowego, a ORF-73 - białko o nazwie LANA (Latency-Associated Nuclear Antigen), które jest związane z utrzymaniem stanu latencji w komórkach gospodarza i kontroli replikacji wirusa. Za pomocą analizy molekularnej wykazałam ekspresję w/w ramek odczytu i tzw. białek powiązanych w komórkach chłoniaka, co potwierdza istotną rolę RRV w ich wytwarzaniu, a tym samym nasilaniu rozwoju choroby. Ekspresja w/w ramek odczytu RRV komórek chłoniaka u zakażonych zwierząt była podobna do komórek chłoniaka pozyskanych z jamy ciała od pacjentów zakażonych KSHV/HIV. Uzyskane rezultaty opracowanego modelu badawczego wskazują na wysoki potencjał i zasadność wykorzystania makaków do eksperymentalnego zakażenia SIV/RRV jako cennej strategii badań mechanizmów patogenetycznych związanych z zakażeniem HIV/KSHV u ludzi.

W kolejnym etapie moich badań skoncentrowałam się głównie na roli wirusowej interleukiny 6 (vIL-6) kodowanej przez RRV w rozwoju proliferacyjnych zmian u makaków zakażonych SIV i RRV. Sekwencja aminokwasowa vIL-6 jest w 17,8% identyczna z IL-6 małp, dlatego vIL-6 jest biologicznie aktywna i wywołuje indukcję określonych szlaków odpowiedzi immunologicznej podobnych do komórkowej IL-6. W publikacji pt.: **“Viral interleukin-6 encoded by rhesus macaque rhadinovirus is associated with lymphoproliferative disorder (LPD)”**; **J Med Primatol. 2009 Oct; 38 1: 2-7** przedstawiłam wyniki moich badań oceny histopatologicznej wykrytych zmian limfoproliferacyjnych, które potwierdziły obecność RRV obserwowanych w szpiku kostnym zakażonych zwierząt. Ponadto przeprowadziłam dodatkową analizę zmian proliferacyjnych określaną jako włóknienie zaotrzewnowe (Retroperitoneal fibromatosis-RF). RF jest rzadkim schorzeniem, którego istotę stanowi proliferacja patologicznej tkanki łącznej w przestrzeni zaotrzewnowej w postaci szybko rosnących zmian wypełniających jamę brzuszną i otaczających jelita oraz narządy wewnętrzne⁴. Wykryte zmiany RF zostały zidentyfikowane jako naczyniowe, nowotworowe proliferacje tkanki

łączonej, silnie przypominające mięsaka Kaposiego (Kaposi Sarcoma, KS) u ludzi. Mięsak Kaposiego jest nowotworem naczyniowym, pochodzącym od komórek mezenchymy zdolnych do wielokierunkowego różnicowania. Obecnie występowanie KS najczęściej jest powiązane z zespołem AIDS lub współistniejącą infekcją ludzkim wirusem opryszczki typu 8 (KSHV/HHV-8)^{5,6}. W moich badaniach potwierdziłam ekspresję CD117 (c-kit) i aktywny gładkomięśniowej (smooth muscle actin - SMA) w komórkach RF. C-kit stanowi receptor glikoproteinowy odgrywający kluczową rolę w wielu funkcjach komórkowych takich jak proliferacja, adhezja międzykomórkowa i tworzenie wrzeciona komórkowego. Jego ekspresja jest wykrywana w różnych epidemiologicznych i histologicznych formach KS⁷. Natomiast antygen SMA jest markerem stosowanym do różnicowej diagnozy wielu nowotworów. Jego nadmierna ekspresja jest obserwowana w niektórych guzach mezenchymalnych⁷. Po potwierdzeniu nowotworowego charakteru obserwowanych zmian RF, badaniom poddałam ekspresję vIL-6 w zmienionych nowotworowo tkankach. Analiza immunofluorescencyjna różnego typu chłoniaków i zmian RF potwierdziła obecność markera vIL-6, udowadniając, że kodowana przez RRV vIL-6 może bezpośrednio przyczyniać się do postępu choroby. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na wysoką użyteczność opracowanego modelu zwierzęcego makaków zakażonych RRV/SIV jako udoskonalonej strategii badań patogenezy zakażeń HIV/KSHV.

2. Opracowywanie strategii ogólnoustrojowego dostarczania wirusów onkolitycznych o potencjale onkoterapeutycznym poprzez określenie immunologicznych mechanizmów w odpowiedzi na infekcję VSV

W kolejnych etapach pracy badawczo-naukowej skupiłam się na analizach onkolitycznego potencjału wirusa VSV i potencjalnym zastosowaniem w terapii nowotworów. Według Światowej Organizacji Zdrowia nowotwory złośliwe są drugą najczęstszą przyczyną zgonów na świecie. W 2020 r. zanotowano blisko 10 milionów zgonów spowodowanych chorobą nowotworową (dane WHO, 2021)⁸. Szacuje się, że istnieje ponad 100 typów nowotworów zlokalizowanych w różnych narządach i tkankach oraz wywodzących się z różnych typów komórek^{9,10}. Pomimo tej złożoności i zmienności, większość rodzajów raka jest dotychczas leczona z wykorzystaniem podobnych terapii. Główną przyczyną ograniczonej skuteczności leczenia chorób nowotworowych jest niska biodostępność oraz brak specyficzności konwencjonalnych chemioterapeutyków, co przyczynia się do niszczenia nie tylko komórek nowotworowych, ale również komórek prawidłowych. Z tych względów istnieje pilna potrzeba opracowania nowych i bardziej skutecznych terapii przeciwnowotworowych. Wirusy onkolityczne stanowią obiecujący model w opracowywaniu nowych strategii leczenia raka. W literaturze zostały opisane przypadki remisji różnych nowotworów pod wpływem zakażenia wirusowego¹¹. Modelowa terapia onkolityczna, oparta jest na wykorzystaniu naturalnej zdolności niektórych wirusów do selektywnej identyfikacji, zakażenia, replikacji oraz ostatecznie lizy komórek nowotworowych. Wirus VSV jest patogenem ssaków kopytnych, w tym zwierząt hodowlanych. Do tej pory udokumentowano niewiele przypadków zakażeń VSV wśród ludzi, które zwykle cechowały się łagodnymi i grypopodobnymi objawami¹². VSV należy do tzw. „naturalnych wirusów onkolitycznych”, który preferencyjnie zakaża i niszczy komórki nowotworowe, wykazujące często defekty w produkcji endogennego interferonu^{13,14}. Na świecie trwają badania nad opracowaniem rozmaitych strategii, które z jednej strony mają

na celu zwiększenie potencjału VSV do selektywnego zakażenia i niszczenia komórek nowotworowych, a z drugiej strony wpływają na poprawę bezpieczeństwa stosowania terapii. W przypadku zastosowania modelu VSV strategię te polegają m.in. na translokacji genów wirusa, mutacjach w genach białek wirusowych M lub G, zastąpieniu genu kodującego glikoproteinę powierzchniową VSV genem kodującym białka innego wirusa lub insercji genów kodujących różne białka immunomodulujące¹⁵. Dlatego zrozumienie przebiegu infekcji i patogenezы VSV w populacjach ludzkich PBL stanowiła niezwykle ważną kwestię, szczególnie w kontekście wyodrębnienia subpopulacji PBL odpowiedzialnej za replikację VSV w komórkach ludzkiej krwi. Określenie tropizmu tego wirusa posiadało istotne znaczenie nie tylko w kwestii zwiększenia wydajności wektorów wirusowych wykorzystujących VSV, ale też w dużym stopniu mogło wpłynąć na bezpieczeństwo terapii

Celem przeprowadzonych w tym zakresie moich badań była ocena wpływu wirusa onkolitycznego VSV na organizm ludzki podczas wiroterapii, a następnie charakterystyka efektów wywołanych zakażeniem w opracowanym przeze mnie modelu badawczym *in vitro*. Przed kontynuacją tej tematyki dokonałam podsumowania stanu wiedzy na temat potencjalnego zastosowania wirusa VSV w terapii raka jajnika. W publikacji pt.: „**VSV based virotherapy in ovarian cancer: the past, the present and...future?**”; *J Cancer*. 2017 Jul 22;8(12):2369-2383 szczegółowo przeanalizowałam kluczowe szlaki genetycznej i immunologicznej odpowiedzi zaangażowanej w powstawanie nowotworów z zastosowaniem modelu raka jajnika, które mogą być celem aktywności onkolitycznej VSV. Nabłonkowy rak jajnika EOC (Epithelial Ovarian Carcinoma) zajmuje piąte miejsce wśród śmiertelnych nowotworów wśród kobiet, odpowiadając za więcej zgonów niż jakikolwiek inny rak żeńskich narządów płciowych¹⁶. W raku jajnika, przerzuty komórek nowotworowych z guza pierwotnego są uwalniane do jamy otrzewnej w postaci trójwymiarowych wielokomórkowych sferoidów. Komórki w obrębie sferoidu wykazują podwyższoną ekspresję markerów komórek macierzystych raka (CSCs - Cancer Stem Cells). Podczas chemioterapii większość zróżnicowanych komórek raka jajnika jest początkowo chemiowrażliwa i eliminowana, przy czym standardowe terapie nie są w stanie całkowicie wyeliminować CSCs, ze względu na rozwój chemooporności¹⁷. W publikacji przedstawiłam perspektywę tzw. celowania zakażeniem wirusem VSV w macierzyste komórki nowotworowe (CSCs), w szczególności przez wykonanie analiz szlaku sygnałowego PI3K/AKT/mTOR. W naturalnych warunkach fosfataza PTEN (Phosphatase and TENsin Homolog deleted on Chromosome 10- produkt genu supresorowego nowotworów) hamuje aktywność szlaku proliferacji komórkowej związanego z kinazą AKT. Utrata aktywności PTEN prowadzi do nadmiernej aktywacji szlaku AKT/mTOR, co wiąże się z niekontrolowanym wzrostem, proliferacją i przeżywalnością komórek. Utrata PTEN może także prowadzić do rozwoju CSCs¹⁸. Utrata aktywności PTEN z jednoczasową aktywacją sygnalizacji AKT i mTOR była obserwowana w ludzkich rakach jajnika¹⁹. Jednocześnie w badaniach z wykorzystaniem modelu mysiego - brak aktywności (dysfunkcja) PTEN wpływała na upośledzenie produkcji interferonu typu I oraz zwiększenie ekspresji receptora LDLR, stanowiącego receptor dla VSV, co tym samym skutkowało zwiększeniem replikacji VSV^{20,21}. Biorąc pod uwagę powyżej omówione wyniki badań, potencjalna terapia wirusem VSV komórek nowotworowych ze zmienioną funkcją PTEN jest wyjątkowo obiecująca i może stanowić potencjalną strategię innowacyjnej terapii wirusem VSV w przyszłości.

Pomimo że, badania kliniczne z wykorzystaniem modelu VSV jako wirusa onkolitycznego wskazują na wysoki potencjał tej strategii na potrzeby samej terapii, należy wziąć pod uwagę neurotropizm u doświadczalnie zakażanych zwierząt laboratoryjnych oraz zmienną wrażliwość nowotworów złośliwych na onkoterapię VSV^{12,15}. Jednym z najnowszych wyzwań w opracowaniu strategii modelowych terapii jest sposób dostarczenia wirusów do miejsca docelowego, tj. bezpośrednie wstrzyknięcie do guza, wstrzyknięcie dożylnie lub inhalację. W swoich badaniach analizom poddałam efektywność dożylną terapii VSV, z oceną populacji komórek podatnych na zakażenie VSV i skutków w organizmie, co zostało przedstawione w publikacji pt.: **“Immune consequences of in vitro infection of human peripheral blood leukocytes with vesicular stomatitis virus (VSV)”**: J Innate Immun 2018;10:131–144. W pierwszym etapie badań potwierdzono zróżnicowaną podatność ludzkich leukocytów krwi obwodowej na zakażenie VSV, co pozwoliło na wyróżnienie dwóch grup wśród badanej populacji - tj. na osoby tzw. słabo i silnie podatne na zakażenie. Grupy zostały podzielone także po uwzględnieniu miana VSV uzyskanych w nadsączach po przeprowadzeniu eksperymentalnego zakażenia. Miano wirusa określono przez wyznaczenie standardowego wskaźnika TCID₅₀ próbki, przy czym, kiedy nie obserwowano replikacji lub miano wirusa w próbach nie przekraczało 10¹ TCID₅₀/ml, dawców materiału zakwalifikowano do tzw. osób słabo podatnych na zakażenie; natomiast kiedy miano wirusa w próbkach było wyższe niż 10¹ TCID₅₀/ml dawców materiału sklasyfikowano jako osoby silnie podatne na zakażenie. W zebranych nadsączach komórek, z podziałem na w/w grupy, określono poziom wytwarzanych cytokin: czynnika martwicy nowotworów alfa (tumor necrosis factor- α , TNF- α), interferonu gamma (IFN- γ) i interleukiny 10 (IL-10), co pozwoliło na zróżnicowanie leukocytów pochodzących od osób słabo i silnie podatnych na zakażenie VSV w zależności od ilości spontanicznie wytwarzanego TNF- α wraz ze statystyczną oceną znamienności podwyższonego stężenia TNF- α w próbkach pochodzących od osób silnie podatnych na zakażenie.

Następnie, ocenie poddano wpływ zakażenia VSV na ekspresję genów powiązanych bezpośrednio z rozwojem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, tj. *RIG-I* i *MDA5*, kodujących wewnątrzkomórkowe receptory RIG-I (Retinoic Acid-Inducible Gene I) i MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Gene 5), odpowiedzialne za wykrywanie dsRNA i ssRNA wirusowego w komórkach²². Równocześnie, dokonano analizy poziomu ekspresji genów, które są aktywowane przez interferony po zakażeniu VSV, zwanych "ISG" (Interferon-Stimulated Genes). tj.: *IFITM3*, *MxA*, *OAS2* i *teteryna*, jako konsekwencja uprzednio opisanych badań *in vitro* potwierdzających przeciwwirusową aktywność białek kodowanych przez w/w geny w przypadku zakażenia leukocytów, a także nowotworowych linii komórkowych różnymi wirusami, w tym VSV²³. Otrzymane wyniki badań potwierdziły, że ekspresja wszystkich wybranych i badanych genów zwiększyła się istotnie w wyniku zakażenia VSV, przy czym najsilniejszy wpływ zaobserwowano w przypadku genu kodującego białko MxA. Białka Mx należą do rodziny dużych dynamino-podobnych trójfosfataz guanozyny (GTPaz) (dynamin-like large guanosine triphosphatases, GTPases) i wykazują szerokie działanie hamujące namnażanie się wirusów²⁴. W toku dalszych doświadczeń zidentyfikowałam także populacje ludzkich leukocytów krwi obwodowej wrażliwych na zakażenie VSV- jako komórki należące do populacji HLA-DR⁺ (CD3⁺CD20⁻CD56⁻HLA-DR⁺) oraz monocyty (CD3⁺CD20⁻CD56⁻HLA-DR⁺CD14⁺), przy czym w populacji HLA-DR⁺ wykryłam zdecydowanie wyższy odsetek

komórek VSV-G+. Uzyskane wyniki jednocześnie potwierdziły, że VSV nie był zdolny do zakażenia innych populacji leukocytów, tj. limfocytów T, B oraz komórek NK. Interesującym wynikiem był statystycznie znamienne obniżony odsetek monocytów w wyniku replikacji VSV, przy czym zidentyfikowanym czynnikiem indukującym różnicowanie się monocytów do DC była aktywna replikacja VSV w monocytach. Stymulacja monocytów nadsączkami zebranymi z nad zakażonych komórek, ligandami dla TLR3 i TLR4 albo zakażeniem wirusem inaktywowanym UV, nie powodowały spadku liczby monocytów. Kolejnymi etapami badawczymi było poszukiwanie przyczyn tak znacznego obniżenia się odsetka komórek CD14⁺ po eksperymentalnym zakażeniu VSV, co mogło prawdopodobnie wynikać z potencjalnego różnicowania się monocytów do komórek dendrytycznych lub apoptozy. W wyniku przeprowadzonych badań potwierdzono, że eksperymentalne zakażenie leukocytów VSV prowadziło do istotnego różnicowania się monocytów do komórek dendrytycznych CD11c⁺CD123⁻ zidentyfikowanych jako komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego (Monocyte-Derived Dendritic Cells - MDDC) o fenotypie komórek niedojrzałych z ekspresją markerów CD40, CD83 i CD86. Ponadto po zakażeniu VSV potwierdzono istotny wzrost liczby komórek apoptotycznych wśród komórek CD14⁺ (monocytów). Przeprowadzone badania wykazały, że apoptoza przebiegała z udziałem kaspaz 3/7, a spadek ekspresji markera CD14 na monocytach w czasie zakażenia VSV był efektem nakładania się dwóch procesów - różnicowania się monocytów do komórek dendrytycznych oraz apoptozy.

Replikacja VSV w leukocytach powodowała także istotnie zwiększone wytwarzanie receptora interleukiny-2 (IL-2R) oraz interferonu alfa (IFN- α), a także obniżenie wytwarzania chemokiny RANTES. Komórki pochodzące od osób słabo podatnych na zakażenie wytwarzały istotnie mniej cytokin: IL-10, IL-12, IL-15 i IL-1 β w porównaniu do komórek niezakażonych; natomiast komórki pochodzące od osób podatnych na zakażenie wytwarzały istotnie więcej IL-2R. Zatem w/w wymienione grupy różniły się między sobą pod względem spontanicznej produkcji cytokin w przypadku: eotaksyny, IL-2, IFN- γ , IL-15 i IL1 β .

Jako pomocniczy promotor współprowadziłam nadzór merytoryczny przy realizacji pracy doktorskiej dr Tomasza Tomczyka pt.: „Immunologiczne następstwa zakażenia *in vitro* leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej”, w której przedstawiono część wyników powyżej omawianych badań. Praca doktorska została obroniona w 2018 r. z wyróżnieniem.

Wyniki moich prac badawczych dostarczają istotnych naukowych danych do opracowywania strategii ogólnoustrojowego dostarczania wirusów onkolitycznych o potencjale onkoterapeutycznym przez określenie immunologicznych mechanizmów odpowiedzi na infekcję VSV i wyjaśnienia podstaw interakcji VSV-PBL. W tym znaczeniu, opracowane modele badawcze rzutują na zwiększone możliwości ulepszonych i zoptymalizowanych strategii immunoterapeutycznych raka, w szczególności polegających na dożylnym podawaniu onkolitycznego VSV. Podsumowując wyniki omawianych badań, chciałabym podkreślić, że wyniki moich badań potwierdzają potencjał wirusów onkolitycznych stanowiąc obiecujące nowe podejście do leczenia chorób nowotworowych, przy założeniu dalszego kontynuowania prac dotyczących bezpieczeństwa ich potencjalnego zastosowania.

3. Nowe strategie leczenia nowotworów z zastosowaniem związków naturalnych i syntetycznych

Równoległe z badaniami nad potencjałem wirusów onkolitycznych w moim kręgu zainteresowań znalazły się zagadnienia dotyczące poszukiwania i identyfikacji nowych związków roślinnych o właściwościach przeciwnowotworowych. Pomimo korzystnego działania proapoptycznego na komórki nowotworowe, tradycyjne terapie często wykazują znaczną toksyczność w stosunku do prawidłowych, zdrowych komórek, a jednocześnie są źródłem wielu efektów ubocznych. Dlatego poszukiwanie nowych, mniej cytotoksycznych środków leczniczych, pochodzenia naturalnego stanowi nieustannie trwający trend naukowy. Nowe leki przeciwnowotworowe stanowią obiecującą opcję uzupełniającą tradycyjne metody terapeutyczne, co może prowadzić do bardziej efektywnego zwalczania nowotworów. W swoich badaniach poszukiwałam nowych preparatów leczniczych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej (Acute Lymphoblastic Leukemia-ALL), która jest najczęściej występującą chorobą nowotworową wieku dziecięcego, stanowiącą około 30% wszystkich nowotworów rozpoznawanych w tej grupie wieku²⁵. Pomimo postępów leczenia, około 20% pacjentów z ALL zagrożonych jest wznową choroby, która pomimo wszystko wciąż pozostaje najczęstszą przyczyną niepowodzenia leczenia i wiodącą przyczyną zgonów dzieci. Przykładem takich naturalnych środków leczniczych są flawonoidy wyizolowane z korzenia tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis* Georgi) o właściwościach antyoksydacyjnych oraz proapoptycznych. Wyniki moich pierwszych badań nad flawonoidami zostały opublikowane w pracy pt.: **“Baicalin from the Extract of Scutellaria Baicalensis Affects the Innate Immunity and Apoptosis in Leukocytes of Children with Acute Lymphocytic Leukemia”**. Int. Immunopharmacol. 2014, 23, 558–67.

Rośliny należące do rodzaju *Scutellaria* mają stosunkowo długą historię stosowania w leczeniu różnych chorób w krajach orientalnych. Tarczycza bajkalska jest stosowana jako lek uzupełniający od tysięcy lat i zyskała na popularności, gdy jej właściwości zostały potwierdzone przez liczne zespoły badawcze. Lecznicze działanie tarczycy bajkalskiej wiąże się z obecnością flawonoidów, głównie bajkaliny, bajkaleiny i wogonozydu, a także terpenów, takich jak triterpeny, diterpeny i glikozydy irydoidowe²⁶

W badaniach własnych, wykazałam, że głównym, aktywnym komponentem w ekstrakcie z korzenia tarczycy (*Scutellaria Baicalensis* extract - SBE) była bajkalina. W celu potwierdzenia hipotezy o potencjalnym wpływie bajkaliny na komórki białaczkowe przeprowadzono badania, które potwierdziły, że bajkalina ma działanie apoptotyczne wobec linii komórkowych ostrej białaczki limfocytowej, chłoniaka oraz szpiczaka²⁷. Badania cytotoksyczności bajkaliny *in vitro* wykazały obniżenie żywotności leukocytów białaczkowych krwi obwodowej (blastów) uzyskanych od pacjentów z ALL, przy braku wpływu SBE na przeżywalność zdrowych, kontrolnych leukocytów. Ponadto wyniki badań potwierdziły także, że bajkalina stymulowała niespecyficzną odporność przeciwwirusową wyrażoną wrażliwością na zakażenie wirusem indykatorowym - wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej VSV. Zastosowanie ekstraktu wobec białaczkowych leukocytów istotnie obniżało miano VSV, czego nie obserwowano w grupie kontrolnych leukocytów PBL. Otrzymane wyniki bezspornie dowodziły, że obniżona replikacja wirusa po zastosowaniu ekstraktu może być związana ze zmniejszonym wydzielaniem cytokin prozapalnych przez leukocyty. Frakcja bajkaliny z SBE wykazywała zdolność modulacji układu odpornościowego przez zwiększoną produkcję IFN γ przez leukocyty pacjentów i zmniejszone wytwarzanie TNF α i IL-10 przez komórki szpiku kostnego (Bone Marrow Cells - BMC) pobrane od pacjentów z ALL. Dodatkowo, bajkalina wykazywała aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną w linii NALM-6 (linia ludzkiej białaczki limfoblastycznej pre-B-komórkowej) i leukocytach białaczkowych uzyskanych od osób chorych, przy braku indukcji apoptozy leukocytów w grupie kontrolnej osób zdrowych.

Moje kolejne prace dotyczyły przeciwnowotworowego, a ściślej przeciwbiałaczkowego działania ekstraktu tarczycy bajkalskiej, tj. wpływu na leukocyty białaczkowe (blasty) charakteryzujące się zidentyfikowanymi różnymi typami rearanżacji chromosomalnych. Obecnie, w wyniku badań genomu i określaniu profilu ekspresji genów u dzieci z ALL zidentyfikowano ponad 50 aberracji genetycznych, w większości dotyczących genów odgrywających kluczową rolę w procesach rozwoju układu limfoidalnego i leukemogenezy. Uważa się, że w/w aberracje genetyczne posiadają znaczenie nie tylko w patogenezie białaczek, ale mogą również wpływać na wrażliwość na zastosowane leczenie²⁵. Na przykład rearanżacje genu *MLL* (ang. Mixed Lineage Leukemia) są złym rokowniczo czynnikiem i wiążą się ze znacznym ryzykiem nawrotu choroby, dlatego ukierunkowane metody leczenia umożliwiające hamowanie poszczególnych szlaków molekularnych zyskują coraz większe znaczenie. Wstępne wyniki badań nad właściwościami ekstraktu z tarczycy bajkalskiej w różnych liniach białaczkowych stanowiły temat pracy magisterskiej pani mgr Pauliny Majkowskiej wykonanej pod moim kierunkiem pt.: „Ocena aktywności przeciwnowotworowej zespołu flawonów (ZF) izolowanych z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*) w białaczkowych liniach komórkowych”. Kolejne doświadczenia przyczyniły się do uzyskania wyników opublikowanych w pracy pt.: **“Antitumor effect of baicalin from the *Scutellaria baicalensis* radix extract in B-acute lymphoblastic leukemia with different chromosomal rearrangements”**. Int Immunopharmacol 2020 Feb;79:106114.

Początkowo badania wykonałam na komórkach szpiku BMC uzyskanych od pacjentów z ALL przy zastosowaniu analizy prowadzonej zgodnie ze zmodyfikowanym, dwuplatformowym protokołem ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering)²⁸. Wykonane doświadczenia potwierdziły, że proapoptotyczne działanie bajkaliny dotyczyło głównie blastów (CD45^{dim}/SSC^{low}/CD34+), a nie zdrowych limfocytów określanych jako CD45^{bright}/SSC^{low}/CD34-). W kolejnych eksperymentach działaniu bajkaliny zostały poddane linie komórkowe z określonymi różnymi aberracjami chromosomowymi. Pod uwagę zostały wzięte dwie linie komórkowe z rearanżacjami genu *MLL*: linie RS4;11 i SEM z t(4;11)(p21;q23) z fuzją genów *MLL* i *AF4* (*AF4* protoonkogen) z powstałym chimerycznym genem *MLL-AF4* i linia KOPN-8-z t(11;19)(q23;p13) z fuzją genów *MLL-ENL* (Eleven-Nineteen Leukemia). Ponadto badaniu poddano linię białaczki komórkowej z translokacją RCH-ACV- z t(1;19)(q23;p13.3) z fuzją genów *TCF3-PBX1* (Transcription Factor 3; Pre-B-cell Leukemia Homeobox 1), linię NALM-6 z t(5;12)(q33.2;p13.2) oraz limfoblastoidalną (LCL) linię kontrolną o dojrzałym fenotypie. Testy zahamowania proliferacji wykazały, że najbardziej wrażliwe na bajkalinę były linie białaczkowe, które zawierały rearanżacje genu *MLL* z fuzją *MLL-AF4* lub *MLL-ENL* oraz linia komórkowa z fuzją *TCF3-PBX1*. Bajkalina wykazywała zdolności indukcji apoptozy poprzez aktywację kaspazy 3/7 oraz obniżała aktywację kinazy syntazy glikogenu-3β (GSK-3β), która jest czynnikiem indukującym proliferację komórek białaczkowych z rearanżacjami genu *MLL* przez hamowanie jej fosforylacji Y216²⁹. Dodatkowo, poddanie działaniu komórek białaczkowych bajkaliną skutkowało podwyższeniem poziom inhibitora kinazy (CDK1) p27Kip1, który zazwyczaj powoduje zatrzymanie komórek w fazie G1 podziału komórkowego, co korelowało z wykazaniem zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Ponieważ efekt obserwowano głównie w liniach komórkowych z translokacjami *MLL*, należy założyć, że bajkalina ma istotną szansę zastosowania w spersonalizowanej formie leczenia opartego na genetycznym podłożu choroby pacjenta.

W swoich badaniach zwróciłam także uwagę na pochodne betuliny, która jest pentacyklicznym triterpenoidem występującym powszechnie w zewnętrznej korze brzozy

białej. Betulina wykazuje szerokie spektrum działania biologicznego, w tym nie tylko działanie przeciwdrobnoustrojowe, ale również przeciwnowotworowe³⁰. Niezaprzeczalną zaletą betuliny jest to, że może być stosowana jako związek wyjściowy dla innych, bardziej rozpuszczalnych substancji. W badaniach nad rolą betuliny skupiłam się przede wszystkim na przeciwnowotworowym działaniu serii nowych triazoli zawierających pierścień 1,2,3-triazolu, w stosunku do komórek raka jajnika (adenocarcinoma SKOV-3). Wyniki moich doświadczeń zostały opublikowane w: „**Novel Triazole Hybrids of Betulin: Synthesis and Biological Activity Profile**”. *Molecules*. 2017 Nov 1;22(11):1876. Dwa, spośród badanych przeze mnie nowych pochodnych betuliny hamowały proliferację komórek raka jajnika (SKOV-3 -human ovarian adenocarcinoma cell line) w sposób dawko-zależny. Jeden związek zawierał pierścień 1,2,3-triazolu podstawiony 3-hydroksypropylem, natomiast drugi zawierał grupę 3'-dezoksytymidyn-5'-ylową. Oba wykazywały wyższą aktywność antyproliferacyjną niż sama betulina, która charakteryzowała się porównywalną aktywnością do cisplatyny stosowanej w leczeniu nowotworów, natomiast pochodne betainy wykazywały niższą toksyczność niż sama wyjściowa betulina.

Poszukując nowych strategii leczenia nowotworów podjęłam badania w zakresie nanotechnologii przez wykorzystanie nanoemulsji (NE; olej/woda; wielkość kropli ~400 nm), przygotowywanych przy użyciu środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalnika, oleju sojowego i wody. NE powszechnie uznawane są za nietoksyczne dla błony śluzowej w stężeniach uznanych za biobójcze. Nanocząsteczki i nanoemulsje dotychczas z powodzeniem stosowano jako nośniki związków terapeutycznych³¹. NE mogą być również stosowane jako adiuwanty śluzówkowe po zmieszaniu z antygenami wpływając na nasilenie humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, zarówno przeciw patogenom jak i komórkom nowotworowym³². Wyniki swoich badań nad nonemulsjami opublikowałam w pracy: „**Nanoemulsion-based mucosal adjuvant induces apoptosis in human epithelial cells**”. *Vaccine*. 2015; 5,33 (19), 2289-96., w której potwierdziłam wcześniej pokazane działanie adjuwantowe nanoemulsji W805EC (NE). NE zwiększała penetrację antygeny przez błonę śluzową nosa, zwiększała wychwyty komórkowy antygenów zarówno przez komórki nabłonkowe oraz dendrytyczne, ale także przez stymulację migracji komórek dendrytycznych obciążonych antygenem do obwodowych węzłów chłonnych w ciągu 24 godzin od podania antygeny szczepionkowego³³. W naszych badaniach nanoemulsja W805EC dodatkowo aktywowała szlaki podobne zarówno do doksorubicyny i staurosporyny, a ekspozycja ludzkich, nowotworowych komórek nabłonkowych (linia komórkowa ludzkiego raka płaskonabłonkowego przegrody nosowej, FaDu oraz ludzkiego raka płaskonabłonkowego gardła HTB-43) na NE powodowała aktywację kaspaz 1, 3/7, 6, 8 i 9, ekspresję genów zaangażowanych w apoptozę, a także autofagię oraz martwicę. Uzyskane wyniki wskazywały, że NE jest w stanie indukować śmierć ludzkich komórek epitelialnych na różnych szlakach, co dodatkowo może być powiązane z pobieraniem, przetwarzaniem i prezentacją antygeny przez komórki dendrytyczne. Zwiększone przetwarzanie antygeny przez DC prowadzi z kolei do silnej i zrównoważonej śluzówkowej oraz ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej, co ma potencjalne zastosowanie w przyszłych szczepionkach przeciwnowotworowych.

Na mój dotychczasowy i przedstawiony powyżej dorobek naukowy składają się prace naukowo-badawcze oraz rozwojowe, które mogą w istotny sposób przyczynić się do opracowania zoptymalizowanych strategii pozwalających na pełniejsze zrozumienie patomechanizmów zakażeń wirusowych, a tym samym na ukierunkowanie innowacyjnych terapii przeciwnowotworowych.

Patrząc w przyszłość, jestem podekscytowana potencjałem dalszego postępu w dziedzinie terapii raka oraz odkrywania nowych substancji terapeutycznych.

W przyszłości planuję:

- Kontynuować badania nad wirusami onkolitycznymi, poszukując innowacyjnych strategii, które zwiększą ich skuteczność i zmniejszą skutki uboczne w leczeniu nowotworów. Interesuje mnie również badanie terapii skojarzonych, wykorzystujących synergiczne efekty wirusów onkolitycznych i substancji immunomodulujących.
- Rozwijać badania nad mechanizmami działania różnych związków naturalnych wobec różnych typów nowotworów.
- Prowadzić badania nad naturalnymi związkami o właściwościach przeciwwirusowych, jednocześnie badając ich mechanizmy działania wobec różnych rodzajów wirusów.
- Angażować się w mentorowanie i edukację przyszedłego pokolenia naukowców, rozwijając ich pasję do badań i udzielając wsparcia oraz wskazówek młodym badaczom.

Pismienictwo:

1. Orzechowska, B. *et al.* Cytokine production by human leukocytes with different expressions of natural antiviral immunity and the effect of antibodies against interferons and TNF-alpha. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **55**, 111–117 (2007).
2. Orzechowska, B., Antoszków, Z. & Błach-Olszewska, Z. Individual differentiation of innate antiviral immunity in humans; the role of endogenous interferons and tumor necrosis factor in the immunity of leukocytes. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **51**, 51–60 (2003).
3. Wen, K. W., Wang, L., Menke, J. R. & Damania, B. Cancers associated with human gammaherpesviruses. *FEBS J* **289**, 7631–7669 (2022).
4. Kołodziej-Spirodek, L., Rusiecka, A., Hunia-Pająk, K. & Gutkowski, K. Zmiany ogniskowe wątroby w przebiegu włóknienia zaotrzewnowego – opis przypadku i syntetyczny przegląd piśmiennictwa. *Prz Med Uniw Rzesz Inst Leków* **13**, 180–186 (2015).
5. Bishop, B. N. & Lynch, D. T. Kaposi Sarcoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
6. Dittmer, D. P. & Damania, B. Kaposi sarcoma associated herpesvirus (KSHV) Associated Disease in the AIDS Patient: An Update. *Cancer treatment and research* **177**, 63 (2019).
7. Hasby, E. A., El Mashad, N. & Eltawy, R. C-Kit, CD34 & α -SMA Immunohistochemical Features in Classic Kaposi Sarcoma and Kaposiform Hemangioendothelioma. *J Microsc Ultrastruct* **5**, 49–57 (2017).
8. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
9. Worldwide cancer data | World Cancer Research Fund International. *WCRF International* <https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/>.
10. Krzyszczuk, P. *et al.* The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment. *Technology (Singap World Sci)* **6**, 79–100 (2018).
11. Chodkowski, M., Cymerys, J., Słońska, A. & Bańbura, M. W. Oncolytic animal viruses and their applications in anti-cancer therapies. *Medycyna Weterynaryjna* **73**, 4–9 (2017).

12. LETCHWORTH, G. J., RODRIGUEZ, L. L. & DEL CBARRERA, J. Vesicular Stomatitis. *The Veterinary Journal* **157**, 239–260 (1999).
13. Balachandran, S. & Barber, G. N. Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell* **5**, 51–65 (2004).
14. Obuchi, M., Fernandez, M. & Barber, G. N. Development of Recombinant Vesicular Stomatitis Viruses That Exploit Defects in Host Defense To Augment Specific Oncolytic Activity. *J Virol* **77**, 8843–8856 (2003).
15. Zhang, Y. & Nagalo, B. M. Immunovirotherapy Based on Recombinant Vesicular Stomatitis Virus: Where Are We? *Front Immunol* **13**, 898631 (2022).
16. Hao, W. *et al.* Identification of potential markers for differentiating epithelial ovarian cancer from ovarian low malignant potential tumors through integrated bioinformatics analysis. *Journal of Ovarian Research* **14**, 46 (2021).
17. Scott, J. G. *et al.* Recasting the Cancer Stem Cell Hypothesis: Unification Using a Continuum Model of Microenvironmental Forces. *Curr Stem Cell Rep* **5**, 22–30 (2019).
18. Ciuffreda, L. *et al.* PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv Biol Regul* **56**, 66–80 (2014).
19. Martins, F. C. *et al.* Clinical and pathological associations of PTEN expression in ovarian cancer: a multicentre study from the Ovarian Tumour Tissue Analysis Consortium. *Br J Cancer* **123**, 793–802 (2020).
20. Li, S. *et al.* The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity. *Nat. Immunol.* **17**, 241–249 (2016).
21. Pampalakis, G., Politi, A.-L., Papanastasiou, A. & Sotiropoulou, G. Distinct cholesterogenic and lipidogenic gene expression patterns in ovarian cancer - a new pool of biomarkers. *Genes Cancer* **6**, 472–479 (2015).
22. Jiang, Y. *et al.* Exploiting RIG-I-like receptor pathway for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* **16**, 8 (2023).
23. Moerdyk-Schauwecker, M. *et al.* Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: role of type I interferon signaling. *Virology* **436**, 221–234 (2013).
24. Haller, O., Arnheiter, H., Pavlovic, J. & Staeheli, P. The Discovery of the Antiviral Resistance Gene Mx: A Story of Great Ideas, Great Failures, and Some Success. *Annual Review of Virology* **5**, 33–51 (2018).
25. Inaba, H., Greaves, M. & Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **381**, 10.1016/S0140-6736(12)62187-4 (2013).
26. EghbaliFeriz, S., Taleghani, A. & Tayarani-Najaran, Z. Scutellaria: Debates on the anticancer property. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **105**, 1299–1310 (2018).
27. Kumagai, T. *et al.* Scutellaria baicalensis, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk. Res.* **31**, 523–530 (2007).
28. Sutherland, D. R., Anderson, L., Keeney, M., Nayar, R. & Chin-Yee, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematother* **5**, 213–226 (1996).
29. Wang, Z. *et al.* Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* **455**, 1205–1209 (2008).
30. Hordyjewska, A., Ostapiuk, A. & Horecka, A. Betulin and betulinic acid in cancer research. *J Pre Clin Clin Res.* **12**, 72–75 (2018).
31. Błaszczak-Świątkiewicz, K., Olszewska, P. & Mikiciuk-Olasik, E. Zastosowanie nanocząsteczek w leczeniu i diagnostyce nowotworów. *NOWOTWORY Journal of Oncology* **63**, 320–330 (2013).

32. Huang, C.-H. *et al.* Nanoemulsion adjuvantation strategy of tumor-associated antigen therapy rephrases mucosal and immunotherapeutic signatures following intranasal vaccination. *J Immunother Cancer* **8**, e001022 (2020).
33. Myc, A. *et al.* Nanoemulsion nasal adjuvant W₈₀5EC induces dendritic cell engulfment of antigen-primed epithelial cells. *Vaccine* **31**, 1072–1079 (2013).

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 Staż podoktorski:

W latach od 2001 do 2011 odbyłam staż podoktorski na trzech różnych wydziałach Uniwersytetu Oregońskiego (Oregon Health and Science University -OHSU):

- **2009-2011:** Molecular Pathology, Molecular Diagnostic Center, Knight Cancer Institute, Oregon Health and Science University (OHSU), USA.
- **2003-2011:** Vaccine and Gene Therapy Institute (VGTI), Oregon Health and Science University, (OHSU), USA.
- **2001-2003:** Neurological Sciences Institute-NSI, Oregon Health and Science University, (OHSU), USA.

Podczas mojego stażu w OHSU zdobyłam szeroki zakres cennych umiejętności i doświadczeń. Poznałam zaawansowane techniki hodowli komórkowych, w tym hodowlę komórek bez surowicy; techniki wydajnego namnażania i oznaczania mian wirusów. Wykorzystałam zdobytą wiedzę do przeprowadzania transfekcji komórek oraz izolacji klonów transfekowanych komórek, co stanowi kluczowy krok w badaniach molekularnych. Zdołałam zdobyć umiejętności w dziedzinie hybrydyzacji *in situ*, co jest niezbędne do analizy ekspresji genów i lokalizacji specyficznych, wirusowych sekwencji DNA w komórkach. Praktykując zaawansowane techniki barwień immuno i histochemicznych, rozwinęłam umiejętności niezbędne w badaniach molekularnych i morfologicznych. Nauczyłam się korzystać z mikroskopii konfokalnej, umożliwiającej analizę próbek na poziomie subkomórkowym, oraz technik izolacji białek, istotnych w badaniach m.in. funkcji białek. Moje badania prowadziłam, wykorzystując różnorodne techniki biologii molekularnej, aby lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne zachodzące w badanych procesach. Stosowałam również barwienia komórek do cytometrii przepływowej i analizę na cytometrze wielokolorowym, co umożliwia analizę i sortowanie komórek na podstawie różnych parametrów. W trakcie stażu miałam także okazję prezentować wyniki moich badań na międzynarodowych konferencjach, co przyczyniło się do mojego rozwoju jako naukowca. Staż ten dostarczył mi wszechstronnej wiedzy i umiejętności, które stanowią fundament mojej kariery zawodowej w dziedzinie nauk biologicznych. Podsumowaniem mojego stażu podoktorskiego na Uniwersytecie Oregońskim jest 5 prac oryginalnych o łącznym wskaźniku oddziaływania IF wynoszącym **21,967**. Dwie publikacje (Orzechowska i współpr. 2008 i Orzechowska i współpr. 2009, poz. 26 i 25 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych zostały ujęte cyklu są habilitacyjnym.

- Od marca **2010** do czerwca **2011** brałam udział w pracach badawczych w laboratorium zajmującym się diagnostyką molekularną (Molecular Pathology Laboratory and the, Molecular Diagnostic Center at Knight Cancer Institute, OHSU, kierownik Richard D. Press, M.D., Ph.D. W laboratorium tym opracowałam i wdrożyłam nowy test oparty na zaawansowanych technikach molekularnych (Real-time PCR z użyciem sond FRET, beacon i Taqman, oraz pyrosekwencjonowanie) do wykrywania infekcji grzybiczych (*Aspergillus spp* and *Candida spp*) u ludzi. Znaczna część mojej pracy polegała na opracowaniu najefektywniejszej i najczulszej metody izolacji DNA z organizmu grzyba z użyciem automatycznych systemów MagNA Pure LC 2.0, jak i też wykrycia jak najmniejszej ilości spor w surowicy.
- W VGTI (OHSU) uczestniczyłam w badaniach nad opracowywaniem szczepionki mającej na celu zapobieganie chorobom limfoproliferacyjnym w małym modelu zakażenia wirusem HIV i wirusem mięsaka Kaposiego (KHSV/HHV8). Badanie były prowadzone pod kierunkiem prof. Scotta W. Wonga. W ramach tych badań skoncentrowałam się na zrozumieniu wpływu vIL-6 na rozwijające się choroby limfoproliferacyjne. Wyniki prac badawczych zostały zaprezentowane na konferencjach w formie ustnej (poz. 3,4,5,6,7,8 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych) oraz opublikowane w dwóch pracach Orzechowska i współpr. 2008 i Orzechowska i współpr. 2009 (poz. 26 i 25 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
- Kolejne prace badawcze prowadzone w VGTI (OHSU) dotyczyły roli wirokin (chemokin) kodowanych przez wirusa małpiej ospy (monkeypox, MPV) w modelu eksperymentalnego autoimmunizacyjnego zapalenia mózgowo-rdzeniowego (EAE) u makaków. Wyniki badań zostały przedstawione w pracy John M. Jones i współpr. 2008 (poz. 27 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
- Dodatkowe badania wykonywane przeze mnie w VGTI koncentrowały się na roli białka MOPICE (Monkeypox Complement Enzyme Complex Inhibitor) w patogenezie zakażenia wirusem małpiej ospy. Wyniki badań zostały przedstawione w pracy Estep RD i współpr. 2011 (poz. 24 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
- W czasie stażu w NSI (OHSU) prowadziłam prace badawcze mające na celu wyjaśnienie mechanizmu wpływu chemokin na rozwój nawracającego zapalenia tęczówki przedniej (recurrent anterior uveitis, RAU) w eksperymentalnym modelu autoimmunizacyjnego zapalenia mózgowo-rdzeniowego (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) u szczurów. Staż odbywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Adamus. Wyniki prac badawczych zostały zaprezentowane w formie plakatu (poz. 18 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych) oraz opublikowane w pracy Mańczak i współpr. 2002 (pozycja 32 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).

5.2 Inne staże

- W **2014** odbyłam 3 miesięczny staż w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką SP ZOZ we Wrocławiu (kierownik: ppłk

dr n. med. Jacek Majda). Staż miał na celu weryfikację moich kompetencji i umożliwił uzyskanie oficjalnego zatwierdzenia wniosku umożliwiającego wpisanie mnie na listę diagnostów laboratoryjnych (Tytuł Diagnosty Laboratoryjnego, nr wpisu 16729).

5.3. Dorobek publikacyjny jako wynik działalności naukowo badawczej realizowanej w ramach współpracy wielośrodkowej

Przez całą moją karierę akademicką aktywnie współpracowałam z innymi badaczami i instytucjami, aby poszerzyć zakres i wpływ moich badań. Współpraca polegała na projektach interdyscyplinarnych, w których uczestniczyli immunolodzy, wirusolodzy, onkolodzy, farmakolodzy i inni. Takie współprace umożliwiły integrowanie różnorodnej wiedzy i zasobów w celu rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych i przyspieszenia postępu naukowego.

- Współpraca naukowa z prof. dr hab. Piotrem Heczka (Uniwersytet Jagielloński, Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii Katedra Mikrobiologii, Wydział Lekarski, Kraków) dotyczyła zbadania mechanizmów odporności przeciwkoronawirusom. Współpraca jest kontynuowana, w przygotowaniu są prace oryginalne.
- Współpraca naukowa z prof. dr hab. n. med. Anną Lutyńską (Zakład Biologii Medycznej, Narodowy Instytut Kardiologii, Warszawa) i dr hab. Ewą Augustynowicz (Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa) przyczyniła się do powstania pracy przeglądowej dotyczącej najnowszych kierunków rozwoju wakcynologii: Lutyńska i współpr. 2017 (pozycja 16 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4). Efektem współpracy nad wdrażaniem nowych narzędzi diagnostycznych u pacjentów kardiologicznych oraz opracowywania innowacyjnych protokołów na potrzeby hodowli linii komórkowych były dwie prace oryginalne: Waś i współpr. 2023 i Ścieżyńska i współpr. 2023 (pozycja 2 i 1 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4).
- Ważnym obszarem mojej aktywności badawczej są badania koncentrujące się na ocenie właściwości wirusobójczych oraz przeciwwirusowych produktów złożonych i związków chemicznych syntetycznych oraz pochodzenia naturalnego (ekstrakty roślinne i inne preparaty zawierające substancje czynne pochodzenia naturalnego).

Efektem współpracy naukowej, w tym obszarze, z dr hab. Barbarą Bażanów (Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Patologii, Wrocław) była praca przeglądowa Siewiński i współpr. 2022 (pozycja 4 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).

Współpraca naukowa z prof. dr hab. Stanisławem Andrzej Boryczką (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach), w której prowadziłam badania nad przeciwwirusową aktywnością związków, zaowocowała dwoma pracami

oryginalnymi: Pęczak i współpr. 2021, Bębenek i współpr. 2017 (pozycja 9 i 17 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).

- We współpracy z prof. dr hab. Danielem Załuskim, prof. UMK (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Farmaceutyczny) prowadziłam badania dotyczące oceny właściwości immunomodulujących produktów złożonych i związków chemicznych syntetycznych oraz pochodzenia naturalnego w odpowiedzi na infekcję wirusową w modelu ludzkich leukocytów krwi obwodowej. Wynikiem współpracy była praca oryginalna: Graczyk i współpr. 2021 (pozycja 10 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4).
- Współpraca naukowa z dr hab. n. med Grażyną Wróbel (Katedra i Klinika Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Przylądek Nadziei, Wrocław) i dr hab. n. med. Radosławem Chabrem (Klinika Onkohematologii Dziecięcej, Kliniczny Szpital Wojewódzki Nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie). Współpraca dotyczyła wpływu bajkaliny oraz onkolitycznego wirusa vesicular stomatitis virus -VSV na komórki białaczkowe. Wynikiem współpracy były 3 prace oryginalne: Orzechowska i współpr. 2020, Tomczyk i współpr. 2018, Orzechowska i współpr. 2014 (pozycja 11, 14, 22 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć, Załącznik 4) oraz doniesienia zjazdowe (pozycja 17, 15, 13, 12, 2 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
- Współpraca naukowa z dr n. med. Marcinem Jędryką i prof. dr hab. n. med. Rafałem Matkowskim (Dolnośląskie Centrum Onkologii, Pulmonologii i Hematologii we Wrocławiu), prof. Vladimirem Bobkiem (Uniwersytet Karola w Pradze, Ostrava, Czechy, Szpital Uniwersytecki Kralovske Vinohrady, Praga, Czechy) dotyczyła identyfikacji komórek raka jajnika podatnych na zakażenie wirusami onkolitycznymi oraz genetycznych uwarunkowań wpływających na zakażenie. Ta współpraca jest kontynuowana, w przygotowaniu jest praca oryginalna. Wynikiem kolaboracji jest praca przeglądowa: Orzechowska i współpr. 2017 (pozycja 18 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
- W ramach współpracy naukowej z prof. dr hab. inż. Wojciechem Simką (Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej) prowadziłam badania dotyczące zagadnień cytokompatybilności materiałowej. Efektem tej współpracy była praca oryginalna Kazek-Kęsik i współpr. 2018 (pozycja 15 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4).
- Współpraca naukowa z dr Andrzejem Mycem (University of Michigan, Nanotechnology Institute for Medicine and Biological Sciences, USA). W ramach tej współpracy prowadziłam badania dotyczące wyjaśnienia mechanizmów śmierci komórek nabłonka ludzkiego indukowanej przez nanoemulsje oraz zidentyfikowania kaspaz i genów związanych z tymi szlakami. Wynikiem współpracy była praca oryginalna: Orzechowska i współpr. 2015 (pozycja 21 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4).

- Współpraca naukowa z prof. dr hab. inż. Januszem Boratyńskim (Instytut Chemii, Nauk o Zdrowiu i Żywności, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im Jana Długosza w Częstochowie) i prof. dr hab. n. med. Ewą Augustynowicz-Kopec (Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa) przyczyniła się do powstania dwóch prac przeglądowych skupiających się na epidemiologii zakażeń wirusowych: Orzechowska i współpr. 2018, Orzechowska i współpr. 2015 (pozycja 13 i 20 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć Załącznik 4).
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne:

Promotorstwo pomocnicze pracy doktorskiej:

dr Tomasz Tomczyk, Promotor: dr hab. Egbert Piasecki, prof. PAN pt.: „Immunologiczne następstwa zakażenia in vitro leukocytów krwi obwodowej człowieka wirusem pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej”; praca doktorska została obroniona w 2018 r. z wyróżnieniem.

Promotorstwo prac licencjackich i magisterskich (podano nazwisko magistranta, tytuł pracy, uczelnię macierzystą, rok obrony):

- Mikołaj Socha, Analiza aktywności farmakologicznej (cytotoksycznej, immunostymulującej oraz przeciwwirusowej) wybranych ekstraktów roślinnych, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 2022.
- mgr inż. Dominika Franz, Badanie aktywności przeciwwirusowej pochodnych izoksazolu i izotiazolu, Wydział Chemiczny, Politechniki Wrocławskiej, biotechnologia farmaceutyczna, 2021.
- mgr Patrycja Bolanowska, Badanie właściwości przeciwwirusowych pochodnych izotiazolu, Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, 2020.
- mgr Monika Włostowska, Nowe estrowe pochodne kwasu betulinowego o działaniu przeciwwirusowym. Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, 2017.
- mgr Paulina Majkowska, Ocena aktywności przeciwnowotworowej zespołu flawonów (ZF) izolowanych z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*) w białaczkowych liniach komórkowych, Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, 2016.

Opiekun pracy magisterskiej:

- Dominika Orzoł, Ocena właściwości onkolitycznych wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (Vesicular Stomatitis Virus -VSV) w liniach komórkowych raka jajnika, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 2020.

Opiekun praktyk i staży studenckich:

- Mikołaj Socha, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, (staż 05.07.21-05.10.21).

- Kinga Hupało, Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego (Mikrobiologia Molekularna), I rok studiów, II stopnia. Staż półroczny 2020/2021.
- Dominika Franz, Wydział Chemiczny, Politechniki Wrocławskiej, biotechnologia farmaceutyczna, 2020.
- Karolina Helińska, Wydział Chemiczny, Politechniki Wrocławskiej, Biotechnologia, praktyka letnia 2019.
- Aleksandra Dudek, Wydział Chemiczny, Politechniki Wrocławskiej, Biotechnologia, praktyka letnia 2019.

Wykłady i zajęcia dla Studentów:

1. Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii, Uniwersytet Jana Długosza w Częstochowie:
Wykładowca, zajęcia dydaktyczne z przedmiotu: Biologia komórki, w roku akademickim 2017/2018.
2. Uniwersytet Wrocławski:

Wykłady i ćwiczenia praktyczne prowadzone w języku angielskim, które skierowane do międzynarodowej grupy studentów.

- Wydział Biotechnologii, Medical Biotechnology, wykłady z przedmiotu: Wirusologia medyczna:
3 semestry 2019-2023
 - Katedra Fizjologii i Neurobiologii, ćwiczenia z przedmiotu: Fizjologia zwierząt, w roku akademickim 2018/2019.
3. Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, Studium Doktoranckie:
Wykłady tematyczne z przedmiotu: Wirusologia, w roku akademickim 2020/2021
 4. Inne wykłady:
Seminaria, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk:
 - 22.02.2018; „Potencjał terapeutyczny wirusów onkolitycznych -od badań podstawowych do zastosowania klinicznego”
 - 06.06.2013: „Zakażenie makaków wirusami SIV i RRV jako model zwierzęcy obrazujący koinfekcję HIV i HHV-8 u ludzi, Rola vIL-6 (wirusowa IL-6 kodowana przez Radinowirus rezusa -RRV)”;
 - 6.2 Osiągnięcia popularyzujące:
 1. Edukowanie medialne społeczeństwa na temat koronawirusów w okresie pandemii.
Przygotowanie i prowadzenie wykładu (webinarium) pt. „ Fakty o koronawirusie”, „Diagnostyka COVID-19” dla Centrum Rozwoju Społecznego we Wrocławiu (24.06.2020).

2. Udział w popularyzacji artykułu B. Orzechowska i in.: „Powstrzymanie epidemii księgosuszu w Polsce w latach 1921-1922, Postepy Hig Med Dosw 2018; 72. Publikacja T. Targański, Tygodnik powszechny, 23-30.12.2018.
3. Wykłady i pokazy w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki:
 - XX Dolnośląski Festiwal Nauki, 2017, Wirusem w raka. Nowa broń medycyny w walce z nowotworami, IITD PAN, PWr Wydział Techniczno-Przyrodniczy, Legnica
 - XXI Dolnośląski Festiwal Nauki, 2018, Uwaga wirus! Skuteczne sposoby walki z przeziębieniem Legnica, Bystrzyca Kłodzka, Jelenia Góra, Lubin
 - XXII Dolnośląski Festiwal Nauki, 2019, Wirus czy bakteria? Najlepsze sposoby na walkę z przeziębieniem, Głogów, Dzierżonów, Ząbkowice Śląskie, Bystrzyca Kłodzka
 - XXIII Dolnośląski Festiwal Nauki, 2020, Czy koronawirus COVID-19 jest królem wirusów?, Wirusy stale zagrażające człowiekowi. Czy jest nadzieja? Czy każdy wirus jest groźny? Wirusy w służbie człowieka, Legnica, Bystrzyca Kłodzka, Ząbkowice Śląskie, Jelenia Góra.
4. Przygotowanie i przeprowadzenie wykładu podczas mini-konferencji w ramach Uniwersytetu Młodego Odkrywcy: „Nowoczesne strategie w leczeniu nowotworów”, 20.05.2017, IITD PAN.
5. Przygotowanie i przeprowadzenie wykładu na zaproszenie: „Wirusy onkolityczne w leczeniu nowotworów Współczesne trendy”, Polskie Towarzystwo Diagnostów Laboratoryjnych, Szklarska Poręba, 14.06.2014.
6. Napisanie artykułu: „Biologia molekularna szansą na wczesne wykrycie choroby”, Kwartalnik Wrocławski, Hallo Wrocław, październik 2012.
- 6.3. Działalność organizacyjna:
 1. Aktywny udział w tworzeniu i organizacji pracy laboratoriów:
 - Jako Wirusolog aktywnie uczestniczyłam w Organizacji Laboratorium Diagnostyki Zakażeń SARS-CoV-2 w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej, im. Ludwika Hirszfelda PAN podczas trwającej pandemii (**11.05.2020-30.03.2022**). Pełniłam rolę organizatorki szkoleń personelu, które obejmowały zagadnienia związane z zapewnieniem bezpieczeństwa podczas pracy z wirusem, prawidłową izolacją materiału genetycznego, minimalizacją potencjalnych kontaminacji oraz wykonywaniem testów PCR. Ponadto, przeprowadzałam procesy walidacji i certyfikowanej oceny wyników jako diagnosta molekularny.
 - W okresie od **03.10.2011 do 27.10. 2012** pełniłam funkcję Kierownika Działu Badań i Rozwoju, w Ogólnopolskim Centrum Genetyki REX Company S.A. gdzie zajmowałam się optymalizacją metod badawczych stosowanych w laboratorium pod względem merytorycznym i ekonomicznym. Brałam udział w opracowywaniu, walidacji i wdrożeniu szeregu testów diagnostycznych, opartych na biologii molekularnej, służących do wykrywania infekcji wirusowych. Prowadziłam wykłady dla klientów na szkoleniach

i spotkaniach handlowych oraz szkolenia pracowników laboratorium z nowych, wprowadzanych do oferty metod i procedur badawczych.

2. Prowadzenie grantów:

- **2016-2019:** Kierownictwo w grantie przyznany przez Fundację „Na Ratunek Dzieciom z Chorobą Nowotworową”. Temat grantu: „Aktywność proapoptotyczna zespołu flawonów izolowanych z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis*) oraz zastosowanie onkolitycznych właściwości vesicular stomatitis virus -VSV, jako nowe możliwości terapii ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL) u dzieci (badania *ex vivo*); Wynikiem prac badawczych są trzy publikacje ujęte w ujęte w cyklu habilitacyjnym: Orzechowska i współpr. 2020, Tomczyk i współpr. 2018, Orzechowska i współpr. 2014 (pozycja 11, 14, 22 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć, Załącznik 4) oraz doniesienia zjazdowe (pozycja 17, 15, 13, 12, 2 w rozdziale II.7 wykazu osiągnięć naukowych, Załącznik 4).
 - **2018:** Grant Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018, Wrocławskie Centrum Biotechnologii. Tytuł zadania: „Krażące we krwi komórki nowotworowe i sferoidy w płynie otrzewnowym jako cel dla wirusa onkolitycznego VSV (Vesicular Stomatitis Virus) w terapii raka jajnika”. Badania w trakcie. Przegląd wiedzy na temat krążących komórek nowotworowych oraz prace badawcze nad onkolitycznym potencjałem wirusa VSV zostały ujęte w cyklu habilitacyjnym: Tomczyk i współpr. 2018, Orzechowska i współpr. 2017 (pozycja 14, 18 w rozdziale II.4 wykazu osiągnięć, Załącznik 4)
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.
- W **2007** zostałam laureatką grantu przyznanego przez National Cancer Institute (NCI) i American Association of Cancer Research –AACR, USA) w postaci uczestnictwa w warsztatach dotyczących patobiologii i diagnostyki molekularnej nowotworów (Workshop on Pathobiology of Cancer, Aspen, Colorado, USA). Otrzymanie grantu było niezwykle wartościowe z uwagi na moje zainteresowanie histopatologią w nowotworach wywołanych przez wirusy.
 - W **2020:** zostałam laureatką Zespołowej Nagrody Dyrektora za opublikowanie pracy oryginalnej o najwyższym współczynniku wpływu (IF) w kategorii „wiodąca rola IITD PAN”: Sochocka M., Ochnik M., Sobczyński M., Siemieniec I., Orzechowska B., Naporowski P., Leszek J.: New therapeutic targeting of Alzheimer’s disease with the potential use of proline-rich polypeptide complex to modulate an innate immune response - preliminary study. *J. Neuroinflammation*, 2019, 16:137, IF 5,793 (100 pkt MNiSW).

- W **2020**: zostałam laureatką Zespołowej Nagrody Dyrektora za wkład w organizację i działalność Laboratorium Diagnostyki Zakazań SARS-CoV-2 Centrum Medycznego Instytutu Hirszfelda.



Podpis