

Autoreferat

dr Magdalena Irena Żmigrodzka

Zakład Patologii Zwierząt
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023

1. Imię i nazwisko.

Magdalena Irena Żmigrodzka

nr ORCID 0000-0003-0880-9093

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

Stopień naukowy: **doktor nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa 2010, tytuł rozprawy doktorskiej: *Ocena aktywacji płytek krwi psów z małopłytkowością*. Praca wyróżniona.

Tytuł: **specjalista laboratoryjnej diagnostyki weterynaryjnej**, Puławy 2011.

Tytuł: **lekarz weterynarii**, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa 2004.

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

Od 01.10.2015 Zakład Patologii Zwierząt, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, **adiunkt**.

01.03.2014 - 30.09.2015 Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii im. Generała K. Kaczkowskiego, w Warszawie; samodzielne stanowisko związane z funkcją Kierownika Zwierzętarń WIHE, (**kierownik zwierzętarń WIHE**).

1.04.2005 - 11.03.2010 – uczestnik stacjonarnych studiów doktoranckich prowadzonych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Katedrze Nauk Klinicznych, Weterynaryjne Nauki Kliniczne; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, **doktorant**.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Jednotematyczny cykl publikacji

- a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Wpływ *in vitro* mikropęcherzyków błonowych z płytek krwi i z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70 na limfocyty krwi psów

- b) lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Na rozprawę habilitacyjną składa się cykl powiązanych tematycznie 3 prac oryginalnych, w których jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem.

Łączna punktacja publikacji, wynosi:

- sumaryczny **Impact Factor** (IF) według Journal Citation Report (JCR): **14,736**
- suma punktów **MEiN** zgodnie z wykazem MEiN z 2021 r.: **380**

Oświadczenia współautorów zgodnie z § 4 pkt. 3 Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie oraz zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej, przedstawiono w załączniku nr 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

1. **Żmigrodzka M**, Witkowska-Piłaszewicz O, Rzepecka A, Cywińska A, Jagielski D, Winnicka A. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer - A Preliminary Study. *Animals* (Basel). 2019, 9, 575. doi: 10.3390/ani9080575. **IF₂₀₁₉ 2,32; pkt. MNiSW 100**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na: opracowaniu koncepcji i założeń badania, ocenie klinicznej zwierząt, pobraniu krwi, przygotowaniu osocza do wykonywania analizy cytometrycznej, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu artykułu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji wyniósł 71%.

2. **Żmigrodzka M**, Witkowska-Piłaszewicz O, Pingwara R, Winnicka A. Platelet Extracellular Vesicles Are Taken up by Canine T Lymphocytes but Do Not Play a Role in Their Proliferation, Differentiation and Cytokine Production In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022, 10, 5504. doi: 10.3390/ijms23105504. **IF₂₀₂₁ 6,208; pkt. MEiN 140**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, izolacji mikropęcherzyków płytkowych, izolacji i przeprowadzeniu hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej w obecności mikropęcherzyków płytkowych oraz wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu artykułu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji wyniósł 77%.

3. **Żmigrodzka M**, Witkowska-Piłaszewicz O, Pingwara R, Pawlak A, Winnicka A. Canine B Cell Lymphoma- and Leukemia-Derived Extracellular Vesicles Moderate Differentiation and Cytokine Production of T and B Cells In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022, 17, 9831. doi: 10.3390/ijms23179831. **IF₂₀₂₁ 6,208; pkt. MEiN 140**

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na opracowaniu koncepcji i założeń badania, izolacji mikropęcherzyków pochodzenia nowotworowego z linii komórkowych CLBL-1 i CLB70, izolacji i przeprowadzeniu hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej w obecności mikropęcherzyków pochodzenia nowotworowego oraz wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, interpretacji wyników, doborze i analizie piśmiennictwa, napisaniu artykułu (rola wiodąca), przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz prowadzeniu korespondencji z redakcją. Mój udział procentowy w powstaniu publikacji wyniósł 74%.

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

Wprowadzenie

Mikropęcherzyki błonowe (MB), nazywane często zewnątrzkomórkowymi pęcherzykami błonowymi, stanowią heterogenną pod względem wielkości, pochodzenia i funkcji populację sferycznych struktur (Żmigrodzka i wsp. 2016). Uwalniane są przez niemal wszystkie komórki organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Po raz pierwszy zostały opisane w 1967 roku przez Wolfa jako „pył płytkowy” (Wolf 1967). Przez kolejne lata uznawane były za szczątki komórkowe, czyli tzw. „debris komórkowy” powstający podczas apoptozy i niszczenia komórek, co wydawało się nieistotne z punktu widzenia procesów odpowiedzialnych za zachowanie homeostazy organizmu. Pracami o charakterze przełomowym, potwierdzającymi ich celowe tworzenie przez komórki, stały się doniesienia Harding i wsp. oraz Pan i wsp.. Autorzy ci opisali proces powstawania, a następnie uwalniania MB z receptorem transferyny na dojrzewających retikulocytach (Harding i wsp. 1983; Pan i wsp. 1983), co prowadziło do zmniejszenia o około 95% ekspresji tego receptora na dojrzałych erytrocytach (Frazier i wsp. 1982).

Klasyfikacja MB opiera się w równym stopniu na ich pochodzeniu komórkowym, jak i wielkości. Zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Meldolesi wyróżniane są: ciała apoptotyczne (500 nm-2 μ m), ektosomy (100 nm-600 nm) oraz egzosomy (do 100 nm), które formowane są w ściśle kontrolowany sposób, różny zależnie od wielkości (Meldolesi 2018, Żmigrodzka i wsp. 2020). MB są źródłem zróżnicowanego ładunku, zawierają w sobie materiał biologicznie czynny pochodzący od komórki rodzicielskiej (miRNA, RNA, DNA, lipidy, enzymy), zamknięty w formie subkomórkowej. MB uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej mogą być transportowane na znaczne odległości (Janowska-Wieczorek i wsp. 2005). Ich pochodzenie, a co za tym idzie skład sprawiają, że wywierają one różny wpływ na komórki docelowe. Transfer horyzontalny informacji między MB a komórką docelową polega na bezpośredniej stymulacji komórki przez ligandy dostarczone z MB. Fuzja MB z komórką - biorcą umożliwia transfer receptorów powierzchniowych i cząsteczek adhezyjnych a przekazanie miRNA, mRNA czy czynników transkrypcyjnych komórki macierzystej prowadzi do jej epigenetycznego reprogramowania (Rak 2010).

Obecność MB potwierdzono w niemal wszystkich płynach ustrojowych (krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, chłonce, ślinie, nasieniu, mleku) oraz w mikrośrodkowisku guza nowotworowego (Jiang i wsp. 2020, Menck i wsp. 2017). Krew, jako optymalny nośnik MB, a jednocześnie łatwy do uzyskania materiał badawczy i diagnostyczny, stała się ich powszechnym źródłem. MB pochodzenia płytkowego (MBP) stanowią 70-90 % MB krwi. Innymi licznie występującymi są MB pochodzenia leukocytarnego (MBL) czy z komórek endotelium (MBE) (Żmigrodzka i wsp. 2019, Puhm i wsp. 2021).

W różnych stanach patologicznych u ludzi, np. w chorobach sercowo-naczyniowych czy cukrzycy, wykazano istotny wzrost liczby MBP i MBE, jednocześnie często będący niekorzystnym wskaźnikiem rokowniczym (Cortez-Espinosa i wsp. 2017, Vajen i wsp. 2015). Podobnie, w przebiegu chorób nowotworowych: raku jelita grubego, gruczołu sutkowego czy rakach płaskonabłonkowych szyi i głowy zaobserwowano istotny wzrost MBP, co wiązało się z gorszym rokowaniem (Stec i wsp. 2015). Prowadzone są liczne badania mające na celu wykorzystanie krwi, jako potencjalnie idealnego materiału biologicznego pozwalającego na wykrycie MB typowych dla konkretnego procesu nowotworowego lub znalezienie uniwersalnego markera identyfikującego MB pochodzenia nowotworowego. Interesujące wyniki uzyskał zespół Menck, który poddał analizie krew pacjentów, m. in. z rakiem jelita grubego, płuc, gruczołu sutkowego, mięsakami głowy i szyi. Badania te potwierdziły obecność MB pochodzenia nowotworowego (MBPN) z ekspresją MUC1, EGFR lub EpCAM, zależną od typu rozrostu nowotworowego i stadium zaawansowania klinicznego. Zważywszy, że we wszystkich przypadkach występowały MBPN z ekspresją CD147, może to dawać nadzieję na odkrycie uniwersalnego markera dla wszystkich MBPN (Menck i wsp. 2017).

Pies, jako model do badań nad rozrostami limfoproliferacyjnymi, w tym chłoniakami, spełnia podstawowe wymagania stawiane zwierzętom modelowym (Ito i wsp. 2014). Podobnie jak u ludzi, nowotwory te rozwijają się spontanicznie u osobników z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym, w przeciwieństwie do modelu mysiego (kongeniczne szczepy B17 SCID). W przypadku czerniaków czy chłoniaków, pies jest powszechnie wykorzystywany jako model do badań translacyjnych (Prouteau i wsp. 2019). Poznanie w zakresie nauk podstawowych interakcji wybranych MB z komórkami układu odpornościowego tego gatunku, pozwoli wykorzystać uzyskane wyniki w weterynaryjnej medycynie eksperymentalnej - w tym immunoterapii oraz porównawczej. W dalszym etapie badań może zostać również wykorzystane w tworzeniu nowych terapii celowanych w medycynie.

Zważywszy, że znaczenie mikropęcherzyków błonowych w regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej u zwierząt towarzyszących, w tym u psów nie było dotychczas przedmiotem badań naukowych celem podjętych badań własnych było:

- 1) określenie fenotypów i ocena ilościowa poszczególnych populacji mikropęcherzyków błonowych we krwi psów zdrowych oraz z chorobą nowotworową,
- 2) ocena wpływu *in vitro* mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin,
- 3) ocena wpływu *in vitro* mikropęcherzyków błonowych pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin.

Ad.1. Określenie fenotypów i ocena ilościowa poszczególnych populacji mikropęcherzyków błonowych we krwi psów zdrowych oraz z chorobą nowotworową

Obecność MB, w różnych materiałach biologicznych została opisana w medycynie ludzkiej. Identyfikacja MB w płynach ustrojowych opiera się przeważnie na podstawie obecności receptorów powierzchniowych, typowych dla komórki macierzystej, z której się wywodzą. We krwi opisano MB pochodzenia: leukocytnego, płytkowego, erytrocytnego i z komórek endotelium. Wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych i techniki cytometrii przepływowej, pozwoliło na szczegółowe scharakteryzowanie MB pochodzenia leukocytnego, wywodzących się z: limfocytów T i B, komórek NK, monocytów czy neutrofili, a których wzrost liczby obserwowany jest w stanach patologicznych, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, sepsa, rak sutka, żołądka czy chłoniaki (Georgatzau i wsp. 2022). Baran i wsp. wykazali wzrost liczby MB u pacjentów z rakiem żołądka i istotnie wyższą liczbę MB płytkowych oraz MB z ekspresją CCR6 i CXCR4. Ponadto potwierdzili wzrost MAGE-1 i HER-2/neu mRNA w MB u pacjentów z rakiem żołądka, zależny od stopnia zaawansowania choroby (Baran i wsp. 2010).

Zdecydowanie najwięcej MB pochodzenia nowotworowego (MBPN) stwierdzanych jest we krwi pacjentów z nowotworami krwiopochodnymi. U ludzi z przewlekłą białaczką B

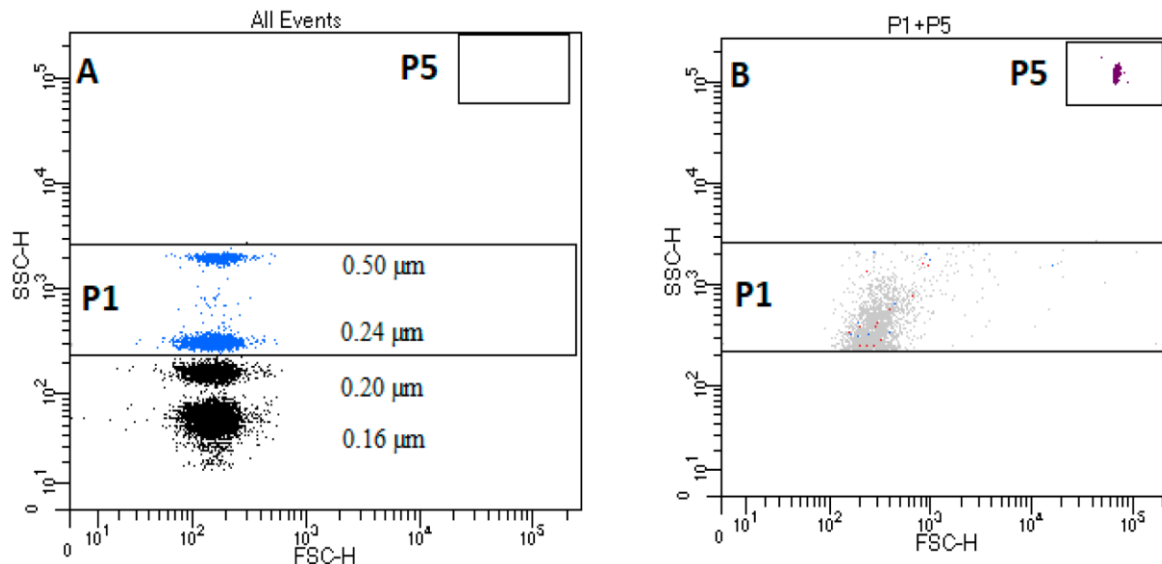
komórkową wykazano podwyższoną liczbę MB nowotworowych z ekspresją CD52, których ilość istotnie obniżała i utrzymywała się na niskim poziomie w trakcie i po zakończeniu chemioterapii (Boysen i wsp. 2017). Również praca De Luca i wsp. potwierdziła potencjalne wykorzystanie MB pochodzenia nowotworowego, jako markera diagnostycznego i prognostycznego u pacjentów z przewlekłą białaczką B komórkową, gdzie wzrost liczby MB z ekspresją CD19 i CD37 korelował ze stopniem zaawansowania choroby (De Luca i wsp. 2017). Podobnie u pacjentów z ostrą białaczką mieloidalną wykazano podwyższoną liczbę MB z ekspresją TGF- β , których liczba malała podczas chemioterapii i utrzymywała się na niskim poziomie u pacjentów w remisji. Ponadto niektórzy autorzy wskazują na wykorzystanie pomiaru ilości MB w celu rozpoznawania choroby resztkowej u pacjentów onkologicznych (Hong i wsp. 2014). Inni zaś wykazali, że u pacjentów z chłoniakiem nieziarniczym (NHL) MBPN o fenotypie CD20+ są najlepszym markerem zaawansowania choroby i odpowiedzi na terapię przeciwciałami monoklonalnymi. Liczba MBPN CD20+ u pacjentów z NHL korelowała z liczbą komórek CD20+ we krwi obwodowej (Domnikowa i wsp. 2013).

W medycynie weterynaryjnej MB po raz pierwszy zostały opisane w 2001 roku w pracy oceniającej aktywację płytek krwi oraz stopień nasilenia trombopoezy u psów z małopłytkowością. Potwierdzono obecność MB pochodzenia płytkowego u pacjentów zakażonych *B. gibsoni* i u psów z małopłytkowością tła immunologicznego (Wilkerson i wsp. 2001). Kolejna praca dotycząca MB we krwi u psów, oceniała wpływ leukoredukcji i przechowywania koncentratów czerwonych krwinek (KRBC) na dynamikę formowania MB. Herring i wsp. wykazali większą liczbę MB w koncentratkach czerwonych krwinek nie poddanych wcześniejszej leukoredukcji, jak również stwierdzili postępujący wzrost liczby MB z ekspresją fosfatydyloseryny (PS+) korelujący z czasem przechowywania KRBC (Herring i wsp. 2013). Na uwagę zasługuje praca Kidd i wsp., w której przeanalizowano ilość mikropęcherzyków błonowych PS+ u osobników z pierwotną niedokrwistością autoimmunologiczną (IMHA). Autorzy wykazali wyższą liczbę MB o fenotypie PS+TF+ (czynnik tkankowy), co może wskazywać na zwiększone ryzyko incydentów zakrzepowych u tej grupy zwierząt (Kidd i wsp. 2015).

Wobec braku w dostępnym piśmiennictwie informacji na temat fenotypu mikropęcherzyków błonowych we krwi psów z chorobą nowotworową przeprowadzone zostały badania własne, których wyniki zostały zawarte w pracy:

Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Rzepecka A, Cywińska A, Jagielski D, Winnicka A. *Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer-A Preliminary Study. Animals (Basel).* 2019, 9, 575. **IF 2,32; pkt. MNiSW 100**

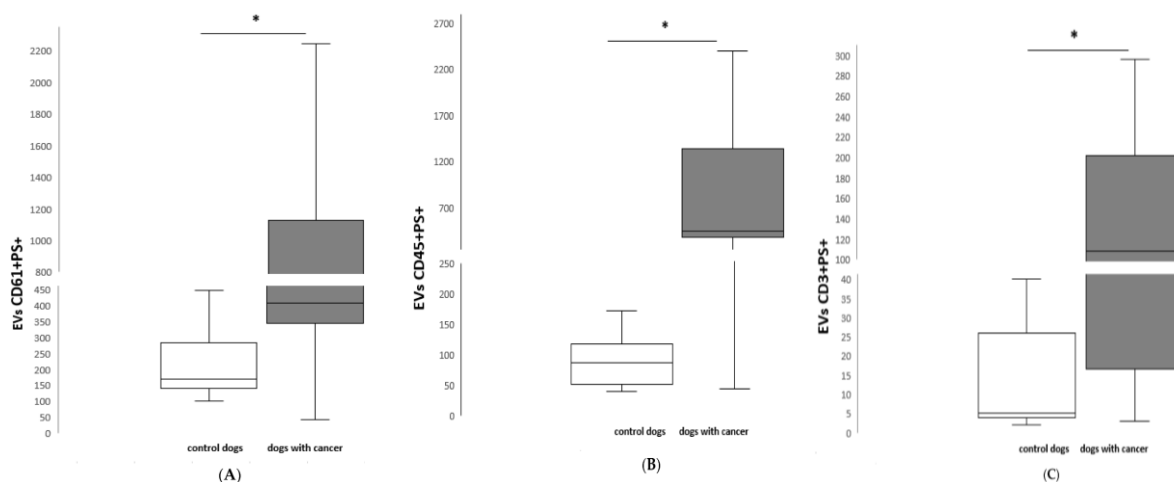
W przeprowadzonym badaniu, po raz pierwszy zastosowano kombinację specyficznych gatunkowo przeciwciał monoklonalnych, pozwalających na określenie pochodzenia MB: z płytek krwi o fenotypie CD61+, leukocytów z ekspresją CD45+, limfocytów T z koekspresją CD3+ i B z koekspresją CD21+ oraz z megakariocytów CD45+CD61+. W badaniach wykorzystany został zestaw kalibracyjny, umożliwiający analizę MB w zakresie czułości cytometru przepływowego oraz próbki TruCount™ beads, pozwalające na określenie liczby bezwzględnej MB w pobranym materiale (ryc. 1).



Ryc. 1. Strategia bramkowania oparta na kulkach kalibracyjnych (SSC Megamix beads) i kulkach do określenia liczby bezwzględnej (TruCount™ beads). A- region P1, w którym identyfikowano MB we krwi u psów. P5- region dla TruCount™ beads, pozwalający na określenie liczby bezwzględnej poszczególnych populacji MB. B- przykładowy wykres kropkowy z (TruCount™ beads) w filtrowanym płynie DPBS. (Żmigrodzka et al. Animals 2019)

W pracy wykazano, że liczba MB płytkowych (PS+CD61+) i MB pochodzenia leukocytnego (PS+CD45+) była istotnie wyższa u psów z chorobą nowotworową

w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobnie liczba MB z limfocytów T (PS+CD3+) była istotnie wyższa w grupie badanej, a najwyższe wartości odnotowano u psów z chłoniakami (T komórkowymi i z rozsiałym chłoniakiem B komórkowym) (ryc. 2).



Ryc. 2. Liczba mikropęcherzyków (MB/ μ L) pochodzenia płytkowego (A), leukocytarnego (B) i z limfocytów T (C) u psów zdrowych i z chorobą nowotworową. (Żmigrodzka et al. Animals 2019)

Porównując liczbę bezwzględną MBP, zidentyfikowanych w badaniach własnych z pracą Helmond i wsp., w pracy własnej była ona niższa. Różnica ta może być wynikiem odmiennych procedur, w tym: pobrania krwi na inny antykoagulant - cytrynian sodowy, czy innej izolacji MB z krwi pełnej. Ponadto do określenia zakresu wielkości liczonych MB zastosowano inny zestaw kulek kalibracyjnych, przeznaczony dla posiadanego typu cytometru przepływowego (Helmond i wsp. 2013).

Z tego względu niezbędne jest ujednolicenie procedur: pobierania materiału, schematu wirowań oraz zastosowania narzędzi kalibracyjnych dla różnych cytometrów przepływowych. Problem ten jest szeroko dyskutowany w środowisku badaczy zajmujących się tą tematyką i został szczegółowo opisany przez Thery i wsp. (Thery i wsp. 2018). W pracy własnej, procedura pobierania krwi i izolacji MB od pacjentów została starannie opracowana, co umożliwiło wykorzystanie uzyskanych wyników do celów diagnostycznych i porównania między innymi laboratoriami.

W omawianej pracy własnej istotnie większa liczba MBP u psów z chorobą nowotworową korelowała z podwyższoną liczbą płytek we krwi tych osobników. W pracy wykazano obecność MB o fenotypie PS+CD45+CD61+, ale ich liczba nie różniła się między grupami. Flaumenhaft i wsp. wykazali u ludzi, że MB o fenotypie PS+CD41+ pochodzą z megakariocytów, a nieaktywne płytki inkubowane przez 72 godziny nie wytwarzają MB

(Flaumenhaft i wsp. 2009). Natomiast prace Inamdar i wsp. oraz Bush i wsp. wykluczyły obecność CD45 na powierzchni płytek krwi (Inamdar i wsp. 2019; Bush i wsp. 2021). Pozwala to na wykazanie, że MB o fenotypie PS+CD45+CD61+ wywodzą się z megakariocytów. Natomiast MB o fenotypie PS+CD61+ są pochodzenia płytkowego, a wzrost ich liczby u pacjentów z nowotworem jest wynikiem zwiększonego ich uwalniania ze zmienionych, w chorobie nowotworowej, płytek krwi (Roweth i wsp. 2021).

Ponadto, w omawianym osiągnięciu również liczba MB z limfocytów T o fenotypie PS+CD3+ była podwyższona u psów z chorobą nowotworową, co jest zbieżne z wynikami badań przeprowadzonych u ludzi z mięsakami szyi (Theodoraki i wsp. 2018). U ludzi zaobserwowano ponadto, że proporcjonalnie do zaawansowania klinicznego choroby (stadium I-IV), na MB CD3+ zwiększała się koekspresja PD-L1 i CTLA-4, co może być wykorzystane, jako biomarkery zaawansowania choroby. Jednocześnie obecność tych białek wskazuje na potencjał immunomodulacyjny tych MB (Theodoraki i wsp. 2018). W prezentowanym osiągnięciu zwiększona liczba MB PS+CD3+ mogła być wynikiem aktywacji limfocytów i nasilonej odpowiedzi przeciwnowotworowej, ale wymaga to dalszych badań.

Podsumowując, w pracy wchodzącej w skład omawianego osiągnięcia wykazano, że u pacjentów z chorobą nowotworową istotnie wzrasta liczba MB pochodzenia płytkowego, z limfocytów T, a pochodzenia megakariocytowego i z limfocytów B pozostaje bez zmian. Dalsze badania nad fenotypem poszczególnych populacji MB w konkretnych typach rozrostów nowotworowych czy innych stanach patologicznych (cukrzyca, niewydolność nerek) pozwoli na wyodrębnienie markerów diagnostycznych i rokowniczych.

Ad. 2. Ocena wpływu *in vitro* mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin

Poznanie mechanizmów komunikacji międzykomórkowej ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia, w jaki sposób komórki wchodzą w interakcje między sobą i mikrośrodowiskiem, w którym się znajdują. Badania w zakresie immunologii ewolucyjnej opisują filogenetycznie starsze mechanizmy odporności wrodzonej wystarczające do zachowania integralności organizmów bezkręgowych. W tym aspekcie bardzo interesującymi strukturami okazały się MB, odgrywające rolę w mechanizmach odpornościowych nie tylko u bezkręgowców. Jako że

MB biorą udział w komunikacji międzykomórkowej, zasadne wydawało się przeprowadzenie badań oceniających ich wpływ na komórki układu immunologicznego.

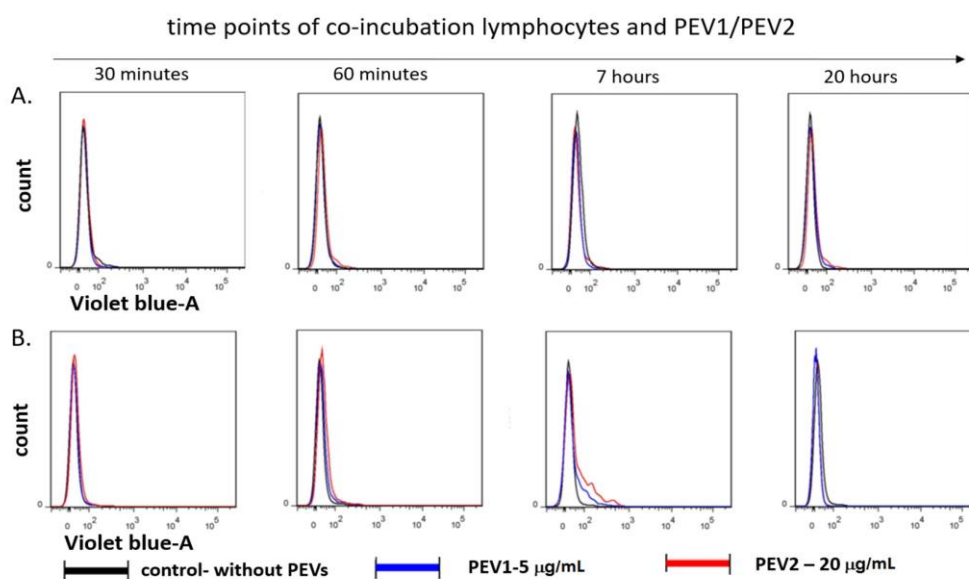
MBP są najliczniejszą populacją MB krwi u zdrowych ludzi (Puhm i wsp. 2021) a ich liczba wzrasta w przebiegu różnych stanów patologicznych, co daje podstawy do rozpatrywania ich jako istotnych mediatorów w komunikacji międzykomórkowej. MBP dzięki obecności na swojej powierzchni fosfatydyloseryny (PS) i czynnika tkankowego (TF) mają kilkadziesiąt razy silniejsze właściwości prokoagulacyjne niż płytki krwi (Sinauridze i wsp. 2007). Potwierdzono, że obecność integryny IIb/IIIa (CD41/CD61) na MBP sprzyja tworzeniu się skrzepu fibrynowego, a w przypadku różnego tła skaz krwotocznych wykazano zmniejszoną liczbą MBP (Aatonen i wsp. 2012; Zubairowa i wsp. 2015). MBP zwiększają produkcję prostaglandyny I₂ oraz ekspresję cząsteczek powierzchniowych: CD11a, CD14 i MAC-1 na monocytach, nasilają ich adhezję do komórek śródbłónka (Aatonen 2012). Wykazano również, że obecność MBP z selektyną P (CD62P) w ognisku zapalania jest istotnym czynnikiem nasilającym gromadzenie neutrofili (Aatonen 2012; Saber i wsp. 2020). Pokazuje to, że MBP odgrywają istotną rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych.

Zważywszy, że we wcześniejszych badaniach własnych (Żmigrodzka i wsp. 2019) potwierdzono również we krwi psów, iż najliczniejszą populacją MB są MBP, postanowiono zbadać ich wpływ na limfocyty zdrowych psów. W drugiej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia oceniono czy MBP w warunkach *in vitro* ulegają fuzji z limfocytami zdrowych osobników i czy zmieniają ich funkcjonalność.

Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Pingwara R, Winnicka A. Platelet Extracellular Vesicles Are Taken up by Canine T Lymphocytes but Do Not Play a Role in Their Proliferation, Differentiation and Cytokine Production In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022, 10, 5504. doi: 10.3390/ijms23105504. IF 6,208; pkt. MEiN 140

Płytki krwi są fragmentami cytoplazmatycznymi megakariocytów, łatwo ulegającymi pobudzeniu, co powoduje, że w zależności od działania czynników je aktywujących powstające z nich MB są zróżnicowane, pod względem transportowanego materiału biologicznie czynnego, a tym samym funkcji. W omawianej pracy po raz pierwszy zbadano dynamikę fuzji MBP z limfocytami i ich wpływ na fenotyp i właściwości komórek docelowych. Dobranie odpowiedniego antykoagulantu jest kluczowe, dla uniknięcia aktywacji płytek krwi w czasie

pobrania i przechowywania pobranego materiału. Jayachandran i wsp. ocenili wpływ najczęściej stosowanych antykoagulantów i czas przechowywania materiału biologicznego na formowanie się MBP. Wykazali, że liczba MBP we krwi pobranej na EDTA, cytrynian sodowy i ACD-A była istotnie niższa niż we krwi heparynowej (Jayachandran i wsp. 2012). Podobne wyniki uzyskali Weiss i wsp. oceniając liczbę MBP we krwi pełnej i w osoczu wolnym od płytek (Weiss i wsp. 2018). Omawiane wcześniej prace, potwierdziły wzrost liczby MB w przechowywanej krwi. EDTA, jako chelator jonów wapnia, wpływa stabilizująco na błony komórkowe i liczba MBP nie zmienia się w ciągu 48h (Cauwenberghs i wsp. 2006). Niektórzy autorzy, aby uzyskać, jak największą liczbę MBP z izolowanego materiału przechowują osocze bogatopłytkowe do siedmiu dni lub stosują aktywatory płytek krwi (np. trombinę, jonofor Ca^{2+}) (Aatonen i wsp. 2012), co jednak istotnie wpływa na zawartość MBP. Z tego powodu, w prezentowanej pracy do izolacji MBP zastosowano krew wersenianową, a osocze bogatopłytkowe było przechowywane tylko 24 godziny, tak aby zminimalizować powstawanie ciałek apoptotycznych, agregacji MBP i zmian w zawartości materiału biologicznie czynnego (Vasina i wsp. 2013). Pierwszym etapem prezentowanej pracy było określenie, czy MBP są pobierane przez limfocyty. W tym celu wyznakowane fluorochromem MBP w dwóch koncentracjach zostały inkubowane z komórkami jednojądrzastymi izolowanymi od zdrowych psów. Wykazano, że tylko limfocyty T pobrały MBP po upływie 7 godzin (ryc. 3). Wyniki te są podobne do otrzymanych u ludzi, gdzie MBP były pobierane przez limfocyty w ciągu 17 do 20 godzin (Dinkla i wsp. 2016; Sadallah i wsp. 2014).



Ryc. 3. Zmiany fluorescencji limfocytów po fuzji z MBP. Kinetyka pobrania MBP przez limfocyty B (A) i limfocyty T (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)

Następnie MBP w dwóch stężeniach były inkubowane z jednojądrzastymi komórkami krwi, w obecności mitogenu i IL-2 w celu ustalenia ich potencjalnego wpływu na fenotyp i funkcje limfocytów. W pracy wykazano, że MBP zdrowych psów nie mają wpływu na proliferację limfocytów, ich fenotyp oraz produkcję wybranych cytokin. Interesujące wyniki pracy przedstawili Weiss i wsp. oceniający efektywność pobrania MBP przez komórki krwi u ludzi. W pracy tej wykazano, że MBP są pobierane przez monocyty, podczas gdy limfocyty T, B i komórki NK w ciągu 3 godzin koinkubacji nie pobierają ich (Weiss i wsp. 2018). Odmienne wyniki przedstawili Sadallah i wsp. oraz Dinkla i wsp.. W ich pracach MBP ulegały pobraniu przez limfocyty i wpływały na ich fenotyp i sekrecję cytokin. Różnice między wynikami można tłumaczyć odmiennym uzyskaniem MBP. W obu pracach osocze bogato płytkowe było przechowywane przez 7 dni, co wiązało się z powstawaniem większej liczby MBP, ale głównie różnice wynikały z aktywacji i starzenia się przechowywanych płytek krwi. Dinkla i wsp. wykazali, że MBP zapobiegają różnicowaniu limfocytów Treg w komórki produkujące IL-17 i IFN- γ . Równie interesujące jest, że u ludzi 8% limfocytów krwi obwodowej wykazuje ekspresję CD62P i CD41+, co potwierdza pobieranie MPB przez te komórki u zdrowych osobników (Dinkla i wsp. 2016). W pracy Sadallah wykazano, że MBP zmniejszyły sekrecję IFN γ , TNF i IL-6, a zwiększało TGF β 1 limfocytów CD4+. Dodatkowo zaobserwowano wzrost liczby komórek CD25^{high}FoxP3+, co potwierdza ich potencjalne działanie supresyjne w przechowywanych produktach krwi (Sadallah i wsp. 2014).

Należy podkreślić, że jest to praca, w której po raz pierwszy zbadano dynamikę pobrania MBP izolowanych od zdrowych psów przez limfocyty. Internalizacja MBP nie miała jednak wpływu na ich liczbę, fenotyp, proliferację i zdolność do produkcji wybranych cytokin, co jest wynikiem istotnym, z punktu widzenia udziału MBP w komunikacji międzykomórkowej.

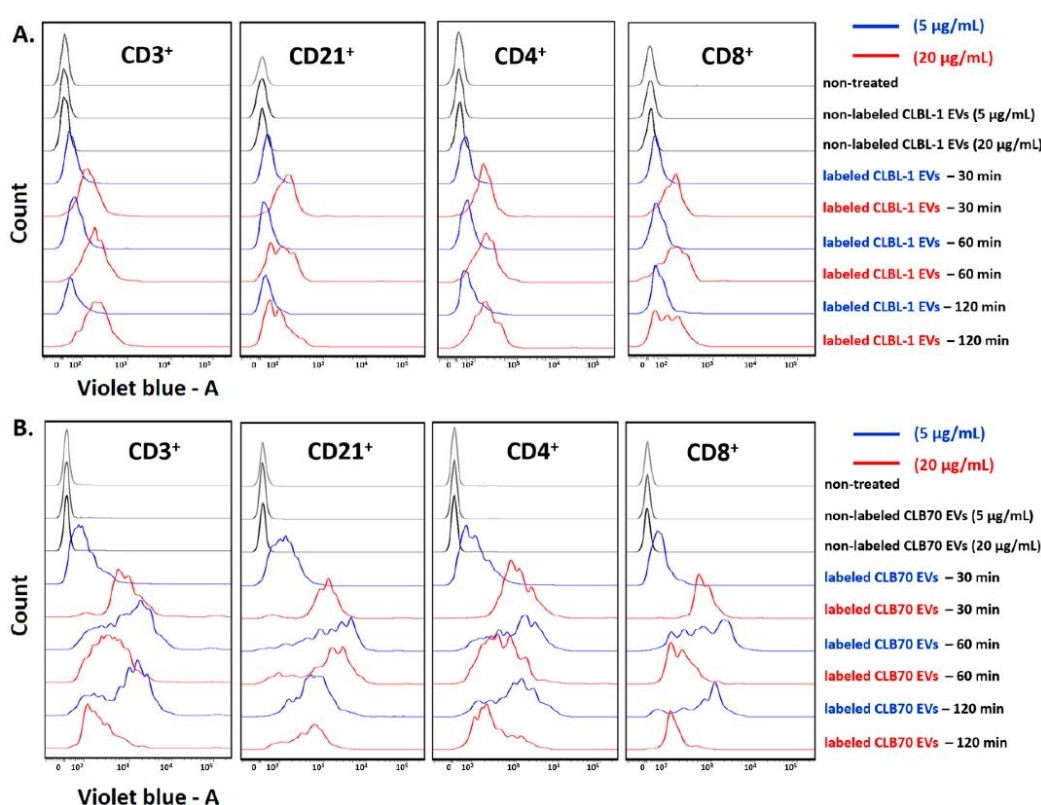
Ad.3. Ocena wpływu *in vitro* mikropęcherzyków błonowych pochodzenia nowotworowego na fenotyp limfocytów i produkcję cytokin

Ważnym obszarem zainteresowań najnowszych badań w dziedzinie onkologii klinicznej jest ocena wpływu MB pochodzenia nowotworowego (MBPN) uzyskiwanych z linii komórkowych lub od pacjentów onkologicznych, na komórki wchodzące w skład mikrośrodowiska guza nowotworowego. Egzosomy białaczkowe (K562) przez transfer miR-17-92, nasilają migrację i dojrzewanie komórek endotelium, specyficzne dla angiogenezy (Umezu i wsp. 2013). Wykazano, że egzosomy z linii komórkowych raka prostaty nasilają apoptozę limfocytów CD8+, a u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym szyi i głowy zmniejszają aktywację limfocytów CD8+ (Abusamra i wsp. 2005; Theodoraki i wsp. 2018). Wiadomo ponadto, że egzosomy izolowane od pacjentów z czerniakiem nasilają apoptozę i hamują proliferację komórek CD8+. Natomiast w przypadku fuzji z komórkami NK zmniejszają ekspresję receptora NKG2D na tych komórkach (Kugeratski i wsp. 2020; Sharma i wsp. 2020). Ostatnie doniesienia wskazują również na istotny udział MBPN w tworzeniu niszy dla przerzutów odległych w raku jelita grubego. Wykazano nadekspresję miRNA 934 zarówno w MBPN izolowanych od pacjentów z rakiem jelita grubego, jak i z linii komórkowych. W badaniach *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem modelu mysiego potwierdzono wpływ miRNA 934 na polaryzację alternatywną makrofagów oraz tworzenie niszy przerzutowej w wątrobie (Zhao i wsp. 2020).

Przedmiotem kolejnych badań własnych było określenie wpływu MBPN na limfocyty krwi psa. Wyniki tych badań zostały opisane w pracy:

Żmigrodzka M, Witkowska-Pilasiewicz O, Pingwara R, Pawlak A, Winnicka A. Canine B Cell Lymphoma- and Leukemia-Derived Extracellular Vesicles Moderate Differentiation and Cytokine Production of T and B Cells In Vitro. *Int J Mol Sci.* 2022, 17, 9831. doi: 10.3390/ijms23179831. IF 6,208; pkt. MEiN 140

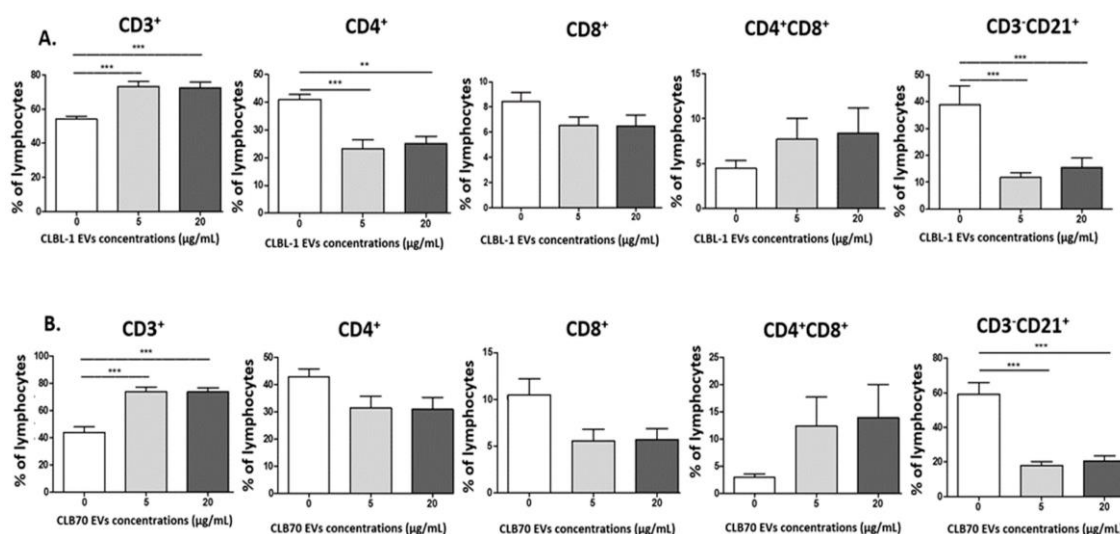
Wiedząc, że MBPN biorą udział w modulowaniu mikrośrodowiska guza nowotworowego oraz w tworzeniu niszy przerzutowej postanowiono ocenić zdolność ich pobierania przez limfocyty krwi psów. Dotychczas u ludzi najczęściej analizowanym mechanizmem oddziaływania MBPN na mikrośrodowisko guza nowotworowego był ich wpływ na polaryzację makrofagów w kierunku fenotypu M2, co potwierdzono, m.in. w raku jelita grubego czy czerniaku. U ludzi, potwierdzono także pobieranie egzosomów z linii chłoniaka (WSU-DLCL) głównie przez limfocyty B i monocyty, a mniejszym stopniu przez limfocyty T i komórki NK (Bennit i wsp. 2017; Hazan-Halevy i wsp. 2015). Natomiast w przedstawionym osiągnięciu własnym wykazano, że MBPN izolowane z dwóch linii komórkowych: chłoniakowej (CLBL-1) i białaczkowej (CLB70), koinkubowane z komórkami jednojądrzastymi krwi psów, zostają pobrane przez limfocyty B, Tc i Th w ciągu 60 minut, niezależnie od stopnia zagęszczenia MBPN (ryc. 4). Dlatego postanowiono skupić się na reakcji właśnie tych komórek.



Ryc. 4. Zmiany fluorescencji limfocytów po fuzji z MBPN. Kinetyka pobrania MBPN z CLBL-1 przez subpopulacje limfocytów (A) i MBPN z CLB70 przez subpopulacje limfocytów (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)

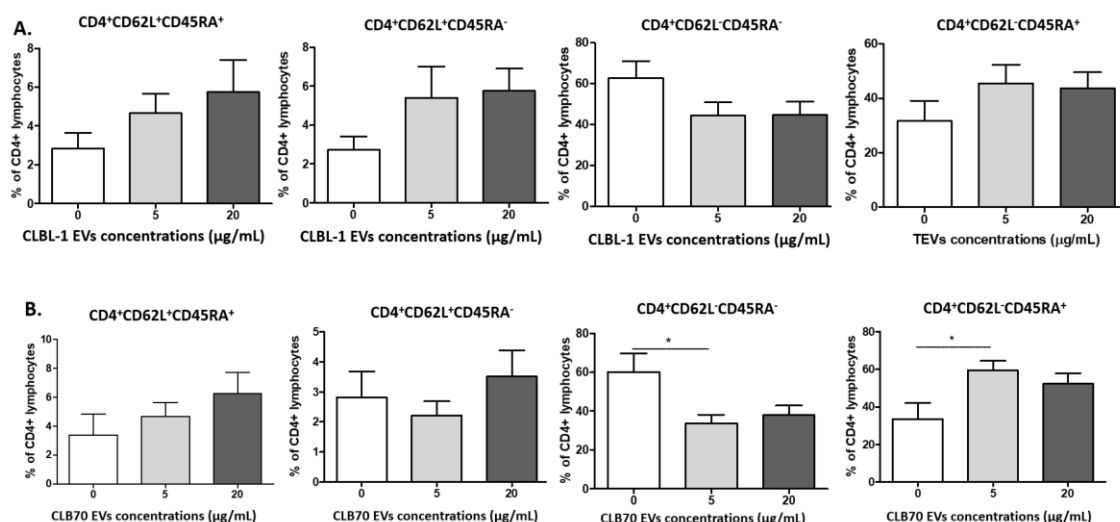
W przedstawionej pracy własnej MBPN nie wpływały na proliferację limfocytów, co jest sprzeczne z wynikami przedstawionymi przez Haque i wsp., w których egzosomy izolowane od pacjentów z ostrą białaczką limfocytarną działały auto- i parakrynnie, nasilając

proliferyację limfocytów B (Haque i wsp. 2016). Zastosowane pracy Haque i wsp., jak również w pracy Patel i wsp. stężenia egzosomów były wyższe niż w omawianej pracy własnej, co może tłumaczyć ich istotny wpływ na proliferację (Patel i wsp. 2016). Wybór stężeń MBPN w pracy własnej podyktowany był wynikami uzyskanymi wcześniej u psów z chłoniakiem czy białaczką (Żmigrodzka i wsp. 2019). W omawianej pracy wykazano zmniejszony odsetek limfocytów B ($CD3^+CD21^+$) a podwyższony limfocytów $CD3^+$. Ponadto MBPN z CLBL-1 obniżyły odsetek komórek $CD4^+$ (ryc. 5).

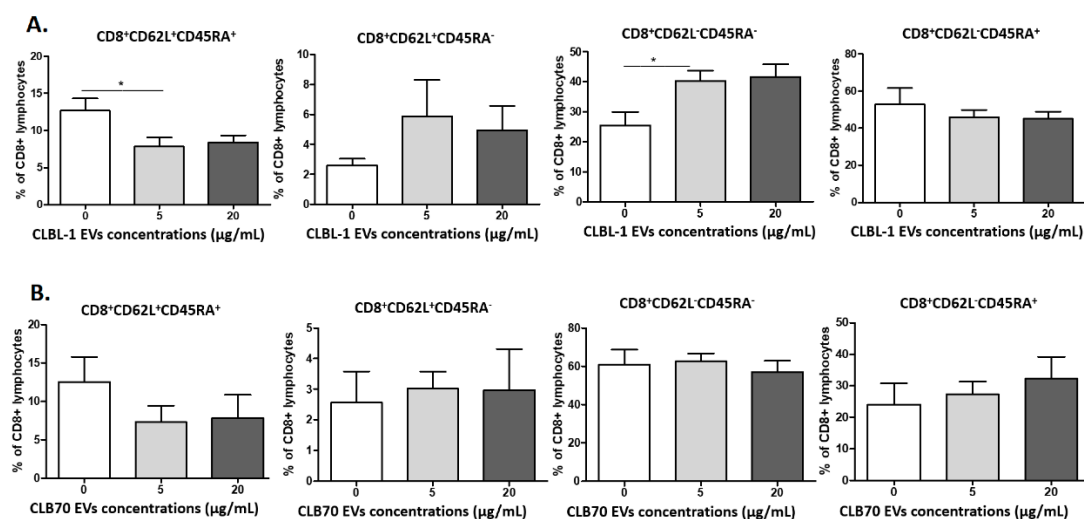


Ryc. 5. Wpływ MBPN na fenotyp limfocytów. Zmiany odsetka subpopulacji limfocytów: $CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+CD8^+$ i $CD3^+CD21^+$ pod wpływem MBPN z CLBL-1 (A) i MBPN z CLB70 (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)

W prezentowanym badaniu oceniono ponadto wpływ MBPN na fenotyp i ekspresję cytokin w limfocytach $CD4^+$ i $CD8^+$. Fizjologicznie u psów starszych występuje zmniejszony odsetek dziewiczych $CD4^+$ i $CD8^+$ i zwiększony odsetek komórek końcowo zróżnicowanych $CD8^+$ (TEMRA) (Withers i wsp. 2018). W przedstawianej pracy własnej do grupy badanej zakwalifikowano tylko młode dorosłe osobniki, tak aby zmiany wynikające z procesu starzenia nie wpływały na otrzymane wyniki. Pod wpływem MBPN z CLB70 stwierdzono zmniejszenie odsetka efektorowych komórek pamięci $CD4^+$ a zwiększenie odsetka komórek końcowo zróżnicowanych $CD4^+$ (TEMRA). Natomiast w przypadku MBPN z CLBL-1 doszło do zwiększenia odsetka efektorowych komórek pamięci $CD8^+$ i zmniejszenia odsetka komórek dziewiczych $CD8^+$. Wyniki te potwierdzają różnorodne oddziaływanie na limfocyty MBPN w zależności od ich pochodzenia komórkowego (ryc. 6) i (ryc. 7).

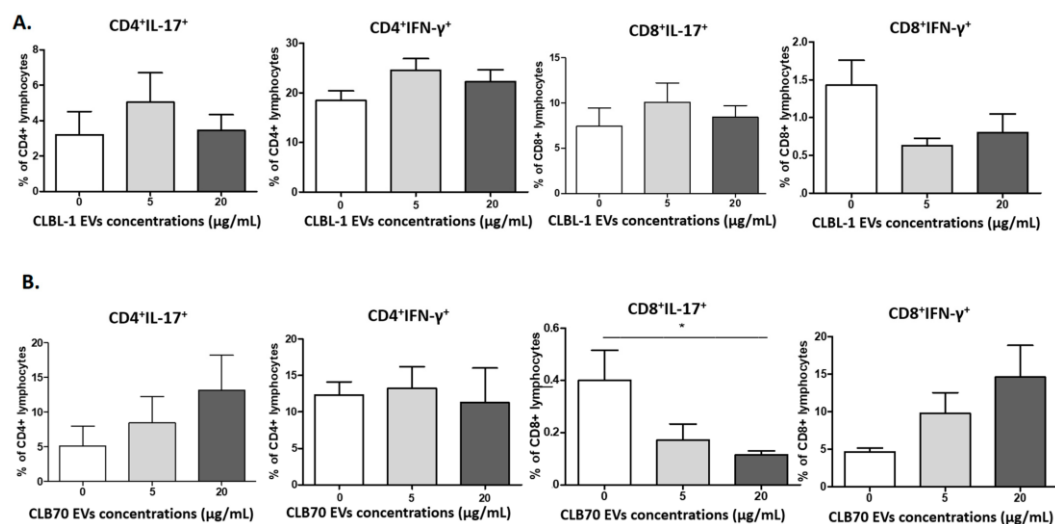


Ryc. 6. Wpływ MBPN na fenotyp limfocytów CD4⁺. Zmiany odsetka subpopulacji limfocytów: naiwnych (CD62L⁺CD45RA⁺), centralnych komórek pamięci (CD62L⁺CD45RA⁻), efektorowych komórek pamięci (CD62L⁻CD45RA⁻) i końcowo zróżnicowanych (CD62L⁻CD45RA⁺) pod wpływem MBPN CLBL-1 (A) i MBPN CLB70 (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)



Ryc. 7. Wpływ MBPN na fenotyp limfocytów CD8⁺. Zmiany odsetka subpopulacji limfocytów: naiwnych (CD62L⁺CD45RA⁺), centralnych komórek pamięci (CD62L⁺CD45RA⁻), efektorowych komórek pamięci (CD62L⁻CD45RA⁻) i końcowo zróżnicowanych (CD62L⁻CD45RA⁺) pod wpływem MBPN z CLBL-1 (A) i MBPN z CLB70 (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)

U ludzi wykazano, że komórki CD4⁺ i CD8⁺ wydzielające IL-17 wykazują działanie przeciwnowotworowe (Hinrichs i wsp. 2011; Majchrzak i wsp. 2016). W omawianej pracy, wykazano zmniejszenie odsetka komórek CD8⁺ z ekspresją IL-17, co wskazuje na pronowotworowe działanie MBPN, a tym samym istotny wpływ MBPN w kontekście modulacji odpowiedzi immunologicznej w mikrośrodku guza nowotworowego (ryc. 8).



Ryc. 8. Wpływ MBPN na limfocyty produkujące IL-17 i INF γ . Zmiany odsetka limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ produkujących IL-17 i INF γ pod wpływem MBPN z CLBL-1 (A) i MBPN z CLB70 (B). (Żmigrodzka et al. IJMS 2022)

PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

- U psów z chorobą nowotworową obserwowany jest wzrost liczby mikropęcherzyków błonowych pochodzenia płytkowego i z limfocytów T, natomiast nie ulega zmianie liczba mikropęcherzyków z limfocytów B oraz pochodzenia megakariocytowego.
- Mikropęcherzyki płytkowe wyizolowane z krwi zdrowych psów, w warunkach *in vitro* ulegają internalizacji przez limfocyty, co nie wpływa na ich fenotyp, proliferację i sekrecję cytokin.
- Mikropęcherzyki płytkowe pochodzące z wybranych linii komórek nowotworowych (CLBL-1 i CLB70) są pobierane przez limfocyty, lecz nie ma to wpływu na proliferację limfocytów.
- Mikropęcherzyki nowotworowe pochodzące z linii komórkowych: CLBL-1 i CLB70 wykazują zróżnicowany wpływ na subpopulacje limfocytów CD4⁺ i CD8⁺: dziewiczych, centralnych komórek pamięci, efektorowych komórek pamięci i komórek końcowo zróżnicowanych.
- Mikropęcherzyki nowotworowe z linii CLB70 wykazują działanie pronowotworowe przez zmniejszenie odsetka limfocytów CD8⁺IL-17⁺.

Osiągnięcie przedstawione do oceny ma znaczenie na poziomie poznawczym. Ocena wpływu na limfocyty mikropęcherzyków błonowych różnego pochodzenia wyjaśnia ich rolę w komunikacji międzykomórkowej – tak lokalnej, jak i systemowej, poszerzając wiedzę w zakresie nauk podstawowych. Ponadto w osiągnięciu wykazano, że powszechnie uznana technika cytometrii przepływowej jest niezastąpionym narzędziem pozwalającym na identyfikację i klasyfikację MB we krwi psów, na podstawie obecności swoistych markerów komórkowych. W przyszłości określenie specyficznych dla choroby lub jej rokowania markerów związanych z MB może stanowić wartościowy element diagnostyczny i prognostyczny wielu chorób, w tym zwłaszcza chorób nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Aatonen M, Grönholm M, Siljander PR. Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication. *Semin Thromb Hemost*. 2012 Feb;38(1):102-13. doi: 10.1055/s-0031-1300956.
2. Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE, Chin JL, Min WP. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2005 Sep-Oct;35(2):169-73. doi: 10.1016/j.bcmd.2005.07.001.
3. Baran J, Baj-Krzyworzeka M, Weglarczyk K, Szatanek R, Zembala M, Barbasz J, Czupryna A, Szczepanik A, Zembala M. Circulating tumour-derived microvesicles in plasma of gastric cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jun;59(6):841-50. doi: 10.1007/s00262-009-0808-2.
4. Ferguson Bennit HR, Gonda A, Oppegard LJ, Chi DP, Khan S, Wall NR. Uptake of lymphoma-derived exosomes by peripheral blood leukocytes. *Blood Lymphat Cancer*. 2017 Feb 28;7:9-23. doi: 10.2147/BLCTT.S130826.
5. Boysen J, Nelson M, Magzoub G, Maiti GP, Sinha S, Goswami M, Vesely SK, Shanafelt TD, Kay NE, Ghosh AK. Dynamics of microvesicle generation in B-cell chronic lymphocytic leukemia: implication in disease progression. *Leukemia*. 2017 Feb;31(2):350-360. doi: 10.1038/leu.2016.217.
6. Bush LM, Healy CP, Marvin JE, Deans TL. High-throughput enrichment and isolation of megakaryocyte progenitor cells from the mouse bone marrow. *Sci Rep*. 2021 Apr 15;11(1):8268. doi: 10.1038/s41598-021-87681-2.
7. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J, Heemskerk JW. Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*. 2006 Oct 2;580(22):5313-20. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.082.
8. Cortez-Espinosa N, Mayoral LP, Perez-Campos E, Cabrera Fuentes HA, Mayoral EP, Martínez-Cruz R, Canseco SP, Andrade GM, Cruz MM, Velasco IG, Cruz PH. Platelets and Platelet-Derived Microvesicles as Immune Effectors in Type 2 Diabetes. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;15(3):207-217. doi: 10.2174/1570161115666170126130309.
9. Dinkla S, van Cranenbroek B, van der Heijden WA, He X, Wallbrecher R, Dumitriu IE, van der Ven AJ, Bosman GJ, Koenen HJ, Joosten I. Platelet microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin. *Blood*. 2016 Apr 21;127(16):1976-86. doi: 10.1182/blood-2015-04-640300.
10. Domnikova NP, Dolgikh TY, Sholenberg EV, Vorontsova EV, Goreva OB, Mel'nikova EV, Gorbachenko EA, Grishanova AY. Blood microvesicles during chronic lymphoproliferative diseases. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Nov;156(1):94-7. doi: 10.1007/s10517-013-2286-y.
11. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1112-21. doi: 10.1182/blood-2008-06-163832.
12. Frazier JL, Caskey JH, Yoffe M, Seligman PA. Studies of the transferrin receptor on both human reticulocytes and nucleated human cells in culture: comparison of factors regulating receptor density. *J Clin Invest*. 1982 Apr;69(4):853-65. doi: 10.1172/jci110525.
13. Georgatzakou HT, Fortis SP, Papageorgiou EG, Antonelou MH, Kriebardis AG. Blood Cell-Derived Microvesicles in Hematological Diseases and beyond. *Biomolecules*. 2022 Jun 8;12(6):803. doi: 10.3390/biom12060803.

14. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983 Aug;97(2):329-39. doi: 10.1083/jcb.97.2.329.
15. Haque S, Vaiselbuh SR. Leukemia-derived exosomes induce paracrine and autocrine cell proliferation in pediatric ALL. *Blood* 2016, 128, 4080.
16. Hazan-Halevy I, Rosenblum D, Weinstein S, Bairey O, Raanani P, Peer D. Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett.* 2015 Aug 1;364(1):59-69. doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.026.
17. Helmond SE, Catalfamo JL, Brooks MB. Flow cytometric detection and procoagulant activity of circulating canine platelet-derived microparticles. *Am J Vet Res.* 2013 Feb;74(2):207-15. doi: 10.2460/ajvr.74.2.207.
18. Herring JM, Smith SA, McMichael MA, O'Brien M, Ngwenyama TR, Corsi R, Galligan A, Beloshapka AN, Deng P, Swanson KS. Microparticles in stored canine RBC concentrates. *Vet Clin Pathol.* 2013 Jun;42(2):163-9. doi: 10.1111/vcp.12034.
19. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, Klebanoff CA, Johnson LA, Kerkar SP, Yang S, Muranski P, Palmer DC, Scott CD, Morgan RA, Robbins PF, Rosenberg SA, Restifo NP. Human effector CD8⁺ T cells derived from naive rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood.* 2011 Jan 20;117(3):808-14. doi: 10.1182/blood-2010-05-286286.
20. Hong CS, Muller L, Whiteside TL, Boyiadzis M. Plasma exosomes as markers of therapeutic response in patients with acute myeloid leukemia. *Front Immunol.* 2014 Apr 10;5:160. doi: 10.3389/fimmu.2014.00160.
21. Inamdar VV, Kostyak JC, Badolia R, Dangelmaier CA, Manne BK, Patel A, Kim S, Kunapuli SP. Impaired Glycoprotein VI-Mediated Signaling and Platelet Functional Responses in CD45 Knockout Mice. *Thromb Haemost.* 2019 Aug;119(8):1321-1331. doi: 10.1055/s-0039-1692422.
22. Ito D, Frantz AM, Modiano JF. Canine lymphoma as a comparative model for human non-Hodgkin lymphoma: recent progress and applications. *Vet Immunol Immunopathol.* 2014 Jun 15;159(3-4):192-201. doi: 10.1016/j.vetimm.2014.02.016.
23. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005 Feb 20;113(5):752-60. doi: 10.1002/ijc.20657.
24. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods.* 2012 Jan 31;375(1-2):207-14. doi: 10.1016/j.jim.2011.10.012
25. Jiang M, Zhang W, Zhang R, Liu P, Ye Y, Yu W, Guo X, Yu J. Cancer exosome-derived miR-9 and miR-181a promote the development of early-stage MDSCs via interfering with SOCS3 and PIAS3 respectively in breast cancer. *Oncogene.* 2020 Jun;39(24):4681-4694. doi: 10.1038/s41388-020-1322-4.
26. Kidd L, Geddings J, Hisada Y, Sueda M, Concannon T, Nichols T, Merricks E, Mackman N. Procoagulant microparticles in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 2015 May-Jun;29(3):908-16. doi: 10.1111/jvim.12583.
27. Kugeratski FG, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS J.* 2021 Jan;288(1):10-35. doi: 10.1111/febs.15558.
28. De Luca L, D'Arena G, Simeon V, Trino S, Laurenzana I, Caivano A, La Rocca F, Villani O, Mansueto G, Deaglio S, Innocenti I, Laurenti L, Molica S, Pietrantonio G, De Stradis A, Del Vecchio L, Musto P. Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2017 Jun;58(6):1424-1432. doi: 10.1080/10428194.2016.1243790.

29. Majchrzak K, Nelson MH, Bailey SR, Bowers JS, Yu XZ, Rubinstein MP, Himes RA, Paulos CM. Exploiting IL-17-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells to improve cancer immunotherapy in the clinic. *Cancer Immunol Immunother*. 2016 Mar;65(3):247-59. doi: 10.1007/s00262-016-1797-6.
30. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol*. 2018 Apr 23;28(8):R435-R444. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.059.
31. Menck K, Bleckmann A, Wachter A, Hennies B, Ries L, Schulz M, Balkenhol M, Pukrop T, Schatlo B, Rost U, Wenzel D, Klemm F, Binder C. Characterisation of tumour-derived microvesicles in cancer patients' blood and correlation with clinical outcome. *J Extracell Vesicles*. 2017 Jul 16;6(1):1340745. doi: 10.1080/20013078.2017.1340745.
32. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967-78. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
33. Patel SJ, Darie CC, Clarkson BD. Exosome mediated growth effect on the non-growing pre-B acute lymphoblastic leukemia cells at low starting cell density. *Am J Transl Res*. 2016 Sep 15;8(9):3614-3629.
34. Puhm F, Boilard E, Machlus KR. Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Jan;41(1):87-96. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314644.
35. Prouteau A, André C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel)*. 2019 Jun 30;10(7):501. doi: 10.3390/genes10070501.
36. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov;36(8):888-906. doi: 10.1055/s-0030-1267043.
37. Roweth HG, Battinelli EM. Lessons to learn from tumor-educated platelets. *Blood*. 2021 Jun 10;137(23):3174-3180. doi: 10.1182/blood.2019003976.
38. Saber SH, Ali HEA, Gaballa R, Gaballah M, Ali HI, Zerfaoui M, Abd Elmageed ZY. Exosomes are the Driving Force in Preparing the Soil for the Metastatic Seeds: Lessons from the Prostate Cancer. *Cells*. 2020 Feb 28;9(3):564. doi: 10.3390/cells9030564.
39. Sadallah S, Amicarella F, Eken C, Iezzi G, Schifferli JA. Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4⁺T cells into T regulatory cells. *Thromb Haemost*. 2014 Dec;112(6):1219-29. doi: 10.1160/TH14-03-0281.
40. Sharma P, Diergaarde B, Ferrone S, Kirkwood JM, Whiteside TL. Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci Rep*. 2020 Jan 9;10(1):92. doi: 10.1038/s41598-019-56542-4.
41. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataulakhanov FI. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*. 2007 Mar;97(3):425-34. PMID: 17334510.
42. Stec M, Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Węglarczyk K, Zembala M, Barbasz J, Szczepanik A, Zembala M. Isolation and characterization of circulating micro(nano)vesicles in the plasma of colorectal cancer patients and their interactions with tumor cells. *Oncol Rep*. 2015 Nov;34(5):2768-75. doi: 10.3892/or.2015.4228.
43. Theodoraki MN, Hoffmann TK, Whiteside TL. Separation of plasma-derived exosomes into CD3(+) and CD3(-) fractions allows for association of immune cell and tumour cell markers with disease activity in HNSCC patients. *Clin Exp Immunol*. 2018 Jun;192(3):271-283. doi: 10.1111/cei.13113.
44. Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1⁺ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2018 Feb 15;24(4):896-905. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2664.

45. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
46. Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 2013 May 30;32(22):2747-55. doi: 10.1038/onc.2012.295.
47. Vajen T, Mause SF, Koenen RR. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 2015 Aug;114(2):228-36. doi: 10.1160/TH14-11-0962.
48. Vasina EM, Cauwenberghs S, Staudt M, Feijge MA, Weber C, Koenen RR, Heemskerk JW. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. *Am J Blood Res*. 2013 May 5;3(2):107-23.
49. Weiss R, Gröger M, Rauscher S, Fendl B, Eichhorn T, Fischer MB, Spittler A, Weber V. Differential Interaction of Platelet-Derived Extracellular Vesicles with Leukocyte Subsets in Human Whole Blood. *Sci Rep*. 2018 Apr 26;8(1):6598. doi: 10.1038/s41598-018-25047-x.
50. Wilkerson MJ, Shuman W, Swist S, Harkin K, Meinkoth J, Kocan AA. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol*. 2001;30(3):141-149. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00423.x.
51. Withers SS, Moore PF, Chang H, Choi JW, McSorley SJ, Kent MS, Monjazebe AM, Canter RJ, Murphy WJ, Sparger EE, Rebhun RB. Multi-color flow cytometry for evaluating age-related changes in memory lymphocyte subsets in dogs. *Dev Comp Immunol*. 2018 Oct;87:64-74. doi: 10.1016/j.dci.2018.05.022.
52. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967 May;13(3):269-88. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.
53. Zhao S, Mi Y, Guan B, Zheng B, Wei P, Gu Y, Zhang Z, Cai S, Xu Y, Li X, He X, Zhong X, Li G, Chen Z, Li D. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *J Hematol Oncol*. 2020 Nov 19;13(1):156. doi: 10.1186/s13045-020-00991-2.
54. Zubairova LD, Nabiullina RM, Nagaswami C, Zuev YF, Mustafin IG, Litvinov RI, Weisel JW. Circulating Microparticles Alter Formation, Structure, and Properties of Fibrin Clots. *Sci Rep*. 2015 Dec 4;5:17611. doi: 10.1038/srep17611.
55. Żmigrodzka M, Guzera M, Miśkiewicz A, Jagielski D, Winnicka A. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol*. 2016 Nov;37(11):14391-14401. doi: 10.1007/s13277-016-5358-6.
56. Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Winnicka A. Platelets Extracellular Vesicles as Regulators of Cancer Progression-An Updated Perspective. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 22;21(15):5195. doi: 10.3390/ijms21155195.
57. Żmigrodzka M, Witkowska-Piłaszewicz O, Rzepecka A, Cywińska A, Jagielski D, Winnicka A. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer-A Preliminary Study. *Animals (Basel)*. 2019 Aug 19;9(8):575. doi: 10.3390/ani9080575.

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

Moim pierwszym miejscem pracy w instytucji naukowej (2014/2015), był **Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii im. Generała K. Kaczkowskiego, w Warszawie (WIHE)**. Byłam tam zatrudniona w Zakładzie Medycyny Regeneracyjnej, na samodzielnym stanowisku związanym z funkcją Kierownika Zwierzętni WIHE. W trakcie zatrudnienia w tej jednostce powstały dwie prace oryginalne. Efektem współpracy z dr hab. Małgorzatą Krzyżowską prof. WIHE była praca dotycząca udziału szlaku Fas/FasL apoptozy, na modelu mysim, atopowego zapalenia skóry. Przeprowadzone badania wykazały, że brak zapoczątkowania szlaku Fas/FasL apoptozy prowadzi do zaostrzenia objawów klinicznych, w tym pogrubienia skóry, jak i nasilenia reakcji zapalnej.

Bień K, Żmigrodzka M, Fruba A, Nowak Z, Malewski T, Krzyżowska M. Involvement of Fas/FasL pathway in the murine model of atopic dermatitis. Inflammation Research; 2017. IF 5-letni 6,197; IF 2,557; pkt. MNiSW 20

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na współprowadzeniu eksperymentów i przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Drugą pracą oryginalną był artykuł oceniający wpływ ekstraktów wodnych i wodno-alkoholowych *Rhodiola kirilowii* na przebieg ciąży i laktacji myszy.

Zdanowski R, Lewicki S, Sikorska K, Żmigrodzka M, Buchwald W, Wilczak J, Skopińska-Różewska E. The influence of aqueous and hydro-alcoholic extracts of roots and rhizomes of Rhodiola kirilowii on the course of pregnancy in mice. Cent Eur J Immunol. 2014;39(4):471-5. IF 5-letni 0,381; IF 0,358; pkt. MNiSW 15

Mój udział w powstawaniu pracy polegał na kontroli przeprowadzanych eksperymentów.

Ponadto odbyłam zagraniczne staże w renomowanych ośrodkach naukowych. W 2019 roku odbyłam miesięczny staż na **Uniwersytecie w Kentucky w USA** w Gluck Equine Center - wiodącym centrum badawczym zajmującym się fizjologią i chorobami koni, w tym sportowych. Podczas stażu poznałam wykorzystywane tam techniki (Luminex, real-time PCR, cytometria przepływowa), pozwalające ocenić stan układu immunologicznego koni z zespołem metabolicznym.

W wyniku tej współpracy powstała praca:

*Witkowska-Piłaszewicz O, Grzędzicka J, Seń J, Czopowicz M, **Żmigrodzka M**, Winnicka A, Cywińska A, Carter C. Stress response after race and endurance training sessions and competitions in Arabian horses. Prev Vet Med. 2021, 188, 105265. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105265. IF 2,30; pkt. MEiN 140*

Mój udział w tej pracy polegał na przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Odbyłam również tygodniowy staż/szkolenie w Szkole Cytometrii w **Szwajcarii na Uniwersytecie w Genewie** (14-19.04.2019), gdzie doskonalłam swoją wiedzę z techniki cytometrii przepływowej. Pozwoliło to na udoskonalenie warsztatu badawczego, co zostało wykorzystane w pracach stanowiących omawiane osiągnięcie.

W roku 2020 nawiązałam współpracę z dr hab. Aleksandrą Pawlak prof. Uczelni, z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w zakresie badań podstawowych nad nowotworami hematopoetycznymi u psów, ze szczególnym uwzględnieniem roli MBPN. Efektem tej współpracy jest praca wchodząca w skład prezentowanego osiągnięcia.

***Żmigrodzka M**, Witkowska-Piłaszewicz O, Pingwara R, Pawlak A, Winnicka A. Canine B Cell Lymphoma- and Leukemia-Derived Extracellular Vesicles Moderate Differentiation and Cytokine Production of T and B Cells In Vitro. Int J Mol Sci. 2022, 17, 9831. doi: 10.3390/ijms23179831. IF 6,208; pkt. MEiN 140*

W trakcie studiów doktoranckich nawiązałam współpracę z naukowcami z Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Byłam również wykonawcą w projekcie badawczym (N N308 237936) „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni” przyznanego przez MNiSW (w latach 2009-2012),

którego kierownikiem był dr hab. Kazimierz Jan Obremski prof. Uczelni. W wyniku tej współpracy powstały dwie prace oryginalne.

Pierwsza praca opisywała wpływ zearalenonu na funkcję tkanki limfatycznej związanej z jelitami (GALT). Surowce roślinne wykorzystywane do produkcji pasz dla trzody chlewnej są często zanieczyszczone mykotoksynami. Zearalenon jest mykotoksyną estrogenową nazywany toksyną (F-2) produkowaną jako metabolit licznych gatunków *Fusarium*. Wykazano, że stosowanie największej dawki zearalenonu dla którego nie obserwuje się działań niepożądanych (NOAEL) moduluje odpowiedź immunologiczną w węzłach chłonnych krętniczo-kątnicznych z Th1 na Th2 z jednoczesną aktywacją makrofagów w kierunku M2.

Obremski K, Wojtacha P, Podlasz P, Żmigrodzka M. The influence of experimental administration of low zearalenone doses on the expression of Th1 and Th2 cytokines and on selected subpopulations of lymphocytes in intestinal lymph nodes. Pol J Vet Sci. 2015;18(3):489-97. IF 5-letni 0,819; IF 0,719; pkt. MNiSW 25

Mój udział w pracach polegał na analizie cytometrycznej, interpretacji wyników i opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Toksyna T-2 jest również wtórnym metabolitem wybranych gatunków *Fusarium* i może wywierać szkodliwy wpływ na organizmy żywe. Większość mikotoksyn dostaje się do organizmu przez przewód pokarmowy i może modulować funkcję tkanki limfatycznej związanej z jelitami (GALT). Efektem tej współpracy są dwie publikacje w których oceniano wpływ mikotoksyn (zearalenon) i T-2 na funkcje tkanki limfatycznej związanej z jelitami. Wyniki badań wykazały, że toksyna T-2 zaburza rozwój tolerancji na antygeny pokarmowe poprzez nasilenie wydzielania cytokin prozapalnych i regulatorowych oraz zmniejszenie produkcji przeciwzapalnego TGF- β . Toksyna T-2 wywołała odpowiedź komórkową, która objawiała się wzrostem odsetka limfocytów T CD8⁺ i spadkiem odsetka limfocytów B2 (CD21⁺) i T γ δ .

Wojtacha P, Trybowski W, Podlasz P, Żmigrodzka M, Tyburski J, Polak-Śliwińska M, Jakimiuk E, Bakula T, Baranowski M, Żuk-Golaszewska K, Zielonka Ł, Obremski K. Effects of a Low Dose of T-2 Toxin on the Percentage of T and B Lymphocytes and Cytokine Secretion in the Porcine Ileal Wall. Toxins (Basel). 2021 Apr 13;13(4):277. IF 5-letni 3.283; IF 4,536; pkt. MEiN 100

Mój udział w pracach polegał na opracowaniu metodologii badań, wykonaniu oznaczeń cytometrycznych, wizualizacji danych i opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

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

Od pierwszego roku studiów doktoranckich (2005 r.) prowadziłam zajęcia z przedmiotów **„Diagnostyka laboratoryjna”** oraz **„Interpretacja wyników wybranych badań dodatkowych w chorobach psów i kotów”** dla studentów polskojęzycznych kierunku weterynaria oraz współuczestniczyłam w prowadzeniu zajęć z przedmiotu **„Metody produkcji i praktyczne wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych”**, dla studentów polskojęzycznych kierunku Biotechnologia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Po uzyskaniu stopnia doktora, nie będąc jeszcze zatrudnioną w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, w roku 2012 prowadziłam zajęcia z przedmiotu **„Patofizjologia zwierząt”** dla studentów kierunku weterynaria. Od momentu zatrudnienia w 2015 roku, prowadzę zajęcia: **„Immunologia kliniczna”** oraz **„Patofizjologia”** dla studentów polskojęzycznych, a od 2017 również **„Pathophysiology”** dla studentów anglojęzycznych kierunku weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Ponadto prowadziłam/prowadzę ćwiczenia z przedmiotów: **„Techniki diagnostyczne”**, **„Inżynieria przeciwciał monoklonalnych”** oraz **„Metody produkcji przeciwciał monoklonalnych”**, **„Podstawy immunopatologii”**, **„Diagnostyka biochemiczna”** i **„Możliwości badawcze cytometrii przepływowej”** dla kierunków Biotechnologia oraz Bioinżynieria Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Od roku 2020 jestem głównym prowadzącym, a od 2022 roku również koordynatorem przedmiotu **„Podstawy immunopatologii”** dla kierunku Biotechnologia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W 2019 r. wraz z zespołem stworzyliśmy fakultet **„Clinical Immunology”** dla studentów anglojęzycznych Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW, który współprowadzę z pracownikami Zakładu Patologii Zwierząt Instytutu Medycyny Weterynaryjnej.

Ponadto ciągle podnoszę swoje kompetencje dydaktyczne, biorąc udział w kursach dedykowanym nauczycielom akademickim. Uczestniczyłam w szkoleniu z zakresu relacji międzykulturowych prowadzonych dla pracowników SGGW w Warszawie (22-23.01.2020),

czy w „Specjalistycznym kursie pedagogicznym dla nauczycieli akademickich wydziału medycyny Weterynaryjnej (12-14.06.2019). Odbyłam również w szkolenie „Nauczyciele akademicy SGGW wobec studentów niepełnosprawnych” (17.02.2016). Aktywnie uczestniczyłam w kursach pozwalających na efektywne prowadzenie zajęć z wykorzystaniem technik nauczania na odległość organizowanych przez SGGW w czasie pandemii COVID.

Od 2016 roku aktywnie wspomagałam działalność Koła Naukowego Medyków Weterynaryjnych, czego wynikiem była współorganizacja dwóch edycji Międzynarodowej Konferencji Naukowej Studentów Weterynarii „Non sibi sed omnibus – Nie dla siebie, ale dla wszystkich” w 2017 i 2018 roku, gdzie byłam członkiem komitetu organizacyjnego. Ponadto w 2018 r. studenci, nad którymi sprawowałam opiekę wraz z dr Olgą Witkowską-Piłaszewicz, zdobyli nagrodę za referat w języku angielskim na IV Międzynarodowej Konferencji Naukowej Studentów Weterynarii „Non sibi sed omnibus – Nie dla siebie, ale dla wszystkich”.

Byłam również członkiem komitetu organizacyjnego konferencji krajowej pt.: Badania genetyczne w monitorowaniu zdrowia i możliwości treningowych u koni wyścigowych, w Warszawie, Trybuna Honorowa Toru Wyścigów Konnych Służewiec 01.10. 2017.

Dotychczas byłam promotorem pomocniczym wyróżnionej pracy doktorskiej pt.: Ocena zmienności fenotypowej i funkcji monocytów krwi obwodowej psów zdrowych i z chłoniakami (2019) dr Alicji Rzepeckiej oraz pracy magisterskiej pt.: Cytometryczna ocena subpopulacji limfocytów w węzłach chłonnych psów z chłoniakiem (2007) mgr Natalii Wilczyńskiej.

Również recenzowałam trzy prace inżynierskie (na kierunkach: Zootechnika, Bioinżynieria, Biotechnologia) oraz jedną pracę dyplomową studentki anglojęzycznej na kierunku weterynaria w roku 2019.

Dwukrotnie otrzymałam nagrodę zespołową JM Rektora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (w 2021 r. I stopnia oraz w 2018r. III stopnia) za osiągnięcia organizacyjne.

Nieprzerwanie od 2015 roku biorę czynny udział w Festiwalu Nauki organizowanym przez Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, dla uczniów szkół podstawowych i gimnazjów, prowadząc lekcje pokazowe i warsztaty mikroskopowe mające na celu promocję nauki już na wczesnym etapie edukacji młodzieży.

Od 2015 jestem członkiem PolLASA oraz od 2022r. Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych. W 2019 roku byłam członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

SGGW w Warszawie. Od 2021 r. jestem członkiem Komisji ds. inwentaryzacji w Katedrze Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej.

Jestem także współautorem 9 prac poglądowych w branżowych czasopismach polskich dotyczących głównie diagnostyki weterynaryjnej, w tym hematologii.

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

Od czasu zatrudnienia w Katedrze Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW w 2015 roku głównym obszarem moich zainteresowań stały się mikropęcherzyki błonowe, co zaowocowało opublikowaniem dwóch prac przeglądowych o tej tematyce:

Żmigrodzka, M., Guzera, M., Miśkiewicz, A., Jagielski, D., Winnicka, A. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. Tumor Biol. 2016 Nov;37(11):14391-14401. IF 5-letni 3,43; IF 2,926; pkt. MNiSW 25

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Winnicka, A. Platelets extracellular vesicles as regulators of cancer progression- an updated perspective. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(15), 5195; IF 5-letni 6,132; IF 5,9; pkt. MNiSW 140

W roku 2018 zostałam kierownikiem projektu MINIATURA DEC. 2017/01/X/NZ5/01481 „Ocena wpływu mikropęcherzyków płytkowych na komórki układu odpornościowego u psów z chorobą nowotworową” (2017-2018), którego wyniki opublikowane zostały w pracach będących między innymi elementami przedstawianego osiągnięcia.

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Rzepecka, A., Cywińska, A., Jagielski, D., Winnicka, A. Extracellular Vesicles in the Blood of Dogs with Cancer—A Preliminary Study. Animals 2019, 9, 575. IF 5-letni brak; IF 2,32; pkt. MNiSW 100

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Pingwara, R., Pawlak, A., Winnicka, A. *Canine B cell lymphoma- and leukemia-derived extracellular vesicles moderate differentiation and cytokine production of T and B cells in vitro*, 2022 *Int J Mol Sci*, Aug 29;23(17):9831. IF 5-letni 6,628; IF 6,208; pkt. MEiN 140

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Pingwara, R., Winnicka, A. *Platelet Extracellular Vesicles Are Taken up by Canine T Lymphocytes but Do Not Play a Role in Their Proliferation, Differentiation and Cytokine Production In Vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5504. IF 5-letni 6,628; IF 6,208; pkt. MEiN 140

Mój udział w przedstawionych pracach był wiodący i polegał na: opracowaniu koncepcji i metodologii badań, zbieraniu materiału, izolacji mikropęcherzyków błonowych, wykonaniu badań laboratoryjnych interpretacji wyników i ich analizie, opracowaniu manuskryptów i ich ostatecznych wersji oraz korespondowaniu z recenzentami i edytorami czasopism.

Od początku mojej pracy naukowej, moim głównym obszarem zainteresowań były zaburzenia funkcji płytek krwi. Tematem mojej pracy doktorskiej była ocena aktywacji płytek krwi u psów z małopłytkowością. W pracy oceniłam stopień aktywacji płytek krwi psów z małopłytkowością z krwią psów z prawidłową ich liczbą pod wpływem związków o charakterze aktywującym i stabilizującym.

Po raz pierwszy zbadano u psów nasilenie aktywacji płytek krwi przy wykorzystaniu aktywatorów i stabilizatora błony komórkowej. Przeprowadzone badania potwierdziły, że płytki krwi psów z małopłytkowością związaną z rasą słabiej aktywują się niezależnie od tego na jaki antykoagulant została pobrana krew. Wykazano, że prokaina jest dobrym stabilizatorem błony komórkowej, co wiązało się z obniżeniem odsetka aktywowanych płytek krwi. Przeprowadzone badania wykluczyły jako przyczynę małopłytkowości niszczenie płytek zależne od przeciwciał, jednocześnie potwierdziły zwiększony odsetek młodocianych płytek u osobników z małopłytkowością związaną z rasą, co wskazuje na prawidłowy przebieg trombopoezy. W pracy wykazano, że zastosowanie cytrynianu sodowego do oceny liczby płytek krwi fałszywie zaniża ich liczbę, objętość i hematokryt płytkowy. Ponadto, potwierdzono, że u pacjentów z małopłytkowością i jednocześnie obecnymi płytkami olbrzymimi, analizator hematologiczny fałszywie zlicza część płytek olbrzymich jako

leukocyty, nasilając tym samym małopłytkowość. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w trzech pracach oryginalnych:

Żmigrodzka, M., Guzera, M., Winnicka, A. *Flow cytometric assessment of activation of peripheral blood platelets in dogs with normal platelet count and asymptomatic thrombocytopenia.* *Pol J Vet Sci.* 2016;19(2):407-14. IF 5-letni 0,763; IF 0,604; pkt. MNiSW 20

Żmigrodzka M, Guzera M, Winnicka A. *Evaluation of reticulated platelets in dogs with breed-related thrombocytopenia.* *Pol J Vet Sci.* 2014;17(1):137-42. IF 5-letni 0,787; IF 0,604; pkt. MNiSW 20

Żmigrodzka M, Winnicka A, Guzera M. *Comparison of the influence of EDTA-K3 and sodium citrate on haematology analysis in healthy dogs.* *Pol J Vet Sci.* 2012;15(2):391-2. IF 5-letni 0,66; IF 0,57; pkt. MNiSW 20

Ponadto, w trakcie doktoratu byłam beneficjentką „Mazowieckiego stypendium doktoranckiego” finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Zintegrowany Program Operacyjny Rozwoju Regionalnego (ZPORR) działanie 2.6 Regionalne Strategie innowacyjne i transfer wiedzy.

Prace, których jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem były nagradzane (2018 r.) lub wyróżniane (2021 r.) przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych (PTNW):

Żmigrodzka, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Winnicka, A. *Platelets extracellular vesicles as regulators of cancer progression - an updated perspective.* *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(15), 5195; IF 5-letni 6,132; IF 5,9; pkt. MNiSW 140

Żmigrodzka, M., Rzepecka, A., Krzyżowska, M., Witkowska-Piłaszewicz, O., Cywińska, A., Winnicka, A. *The cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway and its role in the pathogenesis of human and dog hematological malignancies.* *J Physiol Pharmacol.* 2018, 69, 5, 653. IF 5-letni 2,66; IF 2,47; pkt. MNiSW 25

Kontynuacją kooperacji z ośrodkiem naukowym WIHE, była współpraca w latach 2014-2018, jako jeden z wykonawców w projekcie OPUS pt.: „Nanocząstki srebra koniugowane taninami - badania nad ich aktywnością regeneracyjną w zastosowaniach dermalnych” 2014/13/B/NZ5/01356, którego kierownikiem była dr hab. Małgorzata Krzyżowska prof. Uczelni. Działanie nanocząsteczek srebra jako molekuł o działaniu przeciwbakteryjnym czy wspomagających gojenie się ran jest potwierdzone. W projekcie tym oceniano m.in. wpływ różnej wielkości nanocząsteczek srebra koniugowanych z taninami, na gojenie się ran. Wykazano, że nanocząsteczki srebra większe niż 26 nm modyfikowane kwasem taninowym mogą mieć potencjalne zastosowanie w gojeniu ran, w tym zakażonych. Kolejnym etapem prac było potwierdzenie wpływu dwumetalicznych nanocząstek - Au i Ag skoniugowanych z wybranymi związkami flawonoidowymi, w celu oceny ich wpływu na szybkość gojenia się ran. Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione w dwóch pracach oryginalnych:

Orlowski P., Żmigrodzka M., Tomaszewska E., Ranoszek-Soliwoda K., Czupryn M., Antos-Bielska M., Szemraj J., Celichowski G., Grobelny J., Krzyżowska M. Tannic acid modified silver nanoparticles for wound healing: the importance of size. International Journal of Nanomedicine. 2018. 991-1007. IF 5-letni 7,419; IF 4,3; pkt. MNiSW 35

Mój udział w pracach polegał na wykonaniu badań oraz analizie i interpretacji wyników.

Orlowski P., Żmigrodzka M., Tomaszewska E., Ranoszek-Soliwoda K., Pajak B., Slonska A., Cymerys J., Celichowski G., Grobelny J., Krzyżowska M. Polyphenol-Conjugated Bimetallic Au@AgNPs for Improved Wound Healing. International Journal of Nanomedicine, 2020; 15 4969–4990. IF 5-letni 7,419 IF 4,471; pkt. MNiSW 140

Mój udział w pracach polegał na planowaniu badania, wykonaniu badań, analizie i interpretacji wyników, oraz na przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Jestem również współwykonawcą w projekcie OPUS pt.: „Badanie reakcji organizmu na wysiłek fizyczny z zastosowaniem biologii systemowej u koni wyścigowych” 2021/41/B/NZ7/03548 pod kierownictwem dr n rol. Olgi Witkowskiej - Piłaszewicz. W projekcie tym będą oceniane reakcje adaptacyjne koni do treningu wyścigowego. Zaprojektowano na szeroką skalę badanie, z wykorzystaniem najnowocześniejszej technologii, w celu identyfikacji białek związanych z określonymi procesami biologicznymi i szlakami sygnałowymi, które modulują adaptację do wzrastających obciążeń i mogą wskazywać

na ryzyko pojawienia się kontuzji u koni. Ponadto uzyskane wyniki pomogą wyjaśnić regulację genomyczną w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, takie jak ćwiczenia fizyczne.

Plisak A., Szczepaniak, J., Żmigrodzka, M., Giercuskiewicz-Hecold, B., Witkowska-Piłaszewicz, O. Changes in novel anti-inflammatory cytokine concentration in the blood of endurance and race horses at different levels of training. Comput Struct Biotechnol J, 2022, IF 5-letni 7,914; IF 6,15; pkt. MNiSW 100

Mój udział w powstaniu tej pracy polegał na przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Podczas studiów doktoranckich uczestniczyłam w szkoleniach i kursach organizowanych przez Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego (CMKP), w Warszawie. W roku 2006 ukończyłam szkolenie z „Podstaw immunologii dla lekarzy”, a w 2007 w „Wybranych zagadnieniach z diagnostyki hematologicznej i układu hemostazy” oraz „Podstaw cytometrii przepływowej - zastosowanie w diagnostyce”. Byłam również uczestnikiem szkoleń organizowanych przez firmę Becton Dickinson: V edycja szkoły Cytometrii Przepływowej-2006 rok oraz w 2013 roku szkolenie poinstalacyjne w zakresie BD FACSCanto II i HTS. Ponadto w roku 2010 wygłosiłam wykład na XVII Kongresie PSLWMZ pt.: Choroby wrodzone krwi psów i kotów.

Od czasu rozpoczęcia pracy w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Instytucie Medycyny Weterynaryjnej podnoszę swoje kwalifikacje jako naukowiec, uczestnicząc w szkoleniach organizowanych przez CMKP, w Warszawie. Uczestniczyłam w tym ośrodku w kilku kursach. W roku 2016 były to: „Cytometria przepływowa w diagnostyce schorzeń immunologicznych i limfoproliferacyjnych” i „Hodowla komórkowa”. W roku 2018 odbyłam kurs: „Nowoczesne metody biologii molekularnej w diagnostyce medycznej i badaniach naukowych” a także uczestniczyłam w XI Szkole Cytometrii Przepływowej pod patronatem firmy Becton Dickinson.

Posiadam również certyfikaty ukończenia szkoleń prowadzonych przez PolLASA (21- 25.09.2025) dla: osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, dla osób wykonujących procedury oraz dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane do procedur. Certyfikaty te pozwalają mi na przeprowadzanie wyżej wymienionych czynności na zwierzętach laboratoryjnych.

Byłam również recenzentem 7 artykułów do takich czasopism jak: “International Journal of Molecular Sciences”, “Animals”, “BMC Veterinary Research” czy “Veterinary Sciences”. Potwierdzeniem uznania moich osiągnięć badawczych jest bycie edytorem w numerze specjalnym Animals “Advances in Companion Animal Clinical Pathology”.

Podsumowanie dorobku naukowego na podstawie analizy bibliometrycznej:

Rodzaj pracy naukowej	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Suma
Liczba publikacji w czasopismach z listy MEiN (lub A do 2010r.)	1	24	25
Liczba publikacji w czasopismach spoza listy ministerialnej (lub B do 2010r)	5	9	14
Współczynniki IF (5-letni IF)	0,219	68,167 (66,776) (w tym osiągnięcie 14,736)	68,386 (66,776)
Liczba punktów wg MEiN	10	1865 (w tym osiągnięcie 380)	1875
Baza	Web of Science Core Collection	Scopus Preview	
Liczba cytowań (bez samocytowań)	333 (321)	357	
H-index	10	10	

*stan na dzień 14.02.2023r.

Zmigrodzka

(podpis wnioskodawcy)