

AUTOREFERAT

**w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk
medycznych**

Załącznik 2

Dr n. med. Karol Perlejewski

**Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i
Pasożytniczych**

**Wydział Lekarski
Warszawski Uniwersytet Medyczny**

Warszawa 2023

I. IMIĘ I NAZWISKO: Karol Perlejewski

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE.

- 2016r.** Stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna, specjalność biologia molekularna.
Stopień naukowy nadany uchwałą Rady I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.
Tytuł rozprawy: ***Zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji do identyfikacji czynników zakaźnych u chorych z zapaleniem mózgu o nieznannej etiologii***
Promotor: prof. dr hab. n. med. Marek Radkowski
Promotor pomocniczy: dr n. med. Iwona Bukowska-Ośko
Recenzenci:
prof. dr hab. Jarosław Dziadek
dr hab. Kazimierz Tomczykiewicz
- 2011r.** Tytuł zawodowy magistra analityki medycznej
Wydział Farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 2009r.** Tytuł zawodowy licencjata analityki medycznej
Wydział Farmacji, Warszawski Uniwersytet Medyczny

III. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU

- 2018r.-dziś** Adiunkt
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 2016-2018r.** Technik, pracownik inżynieryjno-techniczny
Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych
Warszawski Uniwersytet Medyczny

IV. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

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

1) TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

„Zastosowanie analizy metagenomicznej oraz sekwencjonowania następnej generacji (NGS) w diagnostyce zakażeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN) człowieka”

2) WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE:

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl sześciu oryginalnych publikacji, w których jestem pierwszym i/lub korespondującym autorem; wszystkie prace zostały opublikowane po nadaniu stopnia doktora nauk medycznych.

Sumaryczna wartość współczynnika IF osiągnięcia wynosi 20,955.

Sumaryczna liczba punktów MEiN osiągnięcia wynosi 610.

PRACA 1

Next-generation sequencing in the diagnosis of viral encephalitis: sensitivity and clinical limitations

Perlejewski K (autor korespondujący), Bukowska-Ośko I, Rydzanicz M, Pawełczyk A, Caraballo Cortès K, Osuch S, Paciorek M, Dzieciatkowski T, Radkowski M, Laskus T.

Sci Rep. 2020 Sep 30;10(1):16173.

doi: 10.1038/s41598-020-7315

IF = 4,380

MEiN = 140

Wkład w powstanie publikacji: zdefiniowanie celu badania i zaplanowanie eksperymentu; stworzenie standardów o znanym mianie wirusa zawieszonego w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR); izolacja kwasów nukleinowych; przeprowadzenie analiz metagenomicznych standardów oraz PMR pobranego od pacjentów; analiza bioinformatyczna danych uzyskanych z sekwencjonowania następnej generacji (NGS); przegląd literatury naukowej; zaplanowanie, przygotowanie oraz napisanie manuskryptu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

PRACA 2

Search for viral agents in cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis using real-time PCR and metagenomics

Perlejewski K (autor korespondujący), Bukowska-Ośko I, Rydzanicz M, Dzieciatkowski T, Zakrzewska-Pniewska B, Podlecka-Piętowska A, Filipiak A, Barć K, Caraballo Cortés K, Pawełczyk A, Radkowski M, Laskus T.

PLoS One. 2020 Oct 28;15(10):e0240601.

doi: 10.1371/journal.pone.0240601. eCollection 2020.

IF = 3,240
MEiN = 100

Wkład w powstanie publikacji: zdefiniowanie celu badania i zaplanowanie eksperymentu; izolacja kwasów nukleinowych; przeprowadzenie analizy metagenomicznej w PMR; analiza bioinformatyczna danych NGS; przegląd literatury naukowej; zaplanowanie, przygotowanie oraz napisanie manuskryptu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

PRACA 3

Search for Viral Infections in Cerebrospinal Fluid From Patients With Autoimmune Encephalitis

Perlejewski K (autor korespondujący), Pawełczyk A, Bukowska-Ośko I, Rydzanicz M, Dzieciatkowski T, Paciorek M, Makowiecki M, Caraballo Cortés K, Grochowska M, Radkowski M, Laskus T.

Open Forum Infect Dis. 2020 Oct 7;7(11):ofaa468.

doi: 10.1093/ofid/ofaa468. eCollection 2020 Nov.

IF = 3,835
MEiN = 100

Wkład w powstanie publikacji: zdefiniowanie celu badania i zaplanowanie eksperymentu; oznaczenie obecności przeciwciał z wykorzystaniem immunofluorescencji pośredniej; izolacja kwasów nukleinowych; przeprowadzenie analizy metagenomicznej w PMR; analiza bioinformatyczna danych NGS; przegląd literatury naukowej; zaplanowanie, przygotowanie oraz napisanie manuskryptu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

PRACA 4

Patients with Infections of The Central Nervous System Have Lowered Gut Microbiota Alpha Diversity

Grochowska M, Laskus T, Paciorek M, Pollak A, Lechowicz U, Makowiecki M, Horban A, Radkowski M, **Perlejewski K (autor korespondujący)**.

Curr Issues Mol Biol. 2022 Jun 29;44(7):2903-2914.

doi: 10.3390/cimb44070200.

IF = 3,100
MEiN = 70

Wkład w powstanie publikacji: współdział w zdefiniowaniu celu badania oraz zaplanowaniu eksperymentu; analiza bioinformatyczna danych NGS; przygotowanie rycin oraz wykresów; przegląd literatury naukowej; zaplanowanie, przygotowanie oraz udział przy tworzeniu manuskryptu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

PRACA 5

Metagenomic search of viral coinfections in herpes simplex 1 encephalitis patients

Perlejewski K (autor korespondujący), Radkowski M, Rydzanicz M, Dzieciatkowski T, Silling S, Wieczorek M, Makowiecki M, Horban A, Laskus T.

J Neurovirol. 2023, Online ahead of print.

doi: 10.1007/s13365-023-01157-9

IF = 3,200

MEiN =100

Wkład w powstanie publikacji: zdefiniowanie celu badania i zaplanowanie eksperymentu; izolacja kwasów nukleinowych; przeprowadzenie analizy metagenomicznej PMR; analiza bioinformatyczna danych NGS; przegląd literatury naukowej; przygotowanie rycin oraz tabel; zaplanowanie, przygotowanie oraz napisanie manuskryptu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

PRACA 6

Enteroviral central nervous system infections in patients with Lyme neuroborreliosis

Perlejewski K (autor korespondujący), Radkowski M, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Dzieciatkowski T, Makowiecki M, Paciorek M, Welc-Falęciak R, Horban A, Laskus T.

Ticks and Tick-Borne Diseases, 2023, 14, 6, str.: 1-7. 2023.

doi: 10.1016/j.ttbdis.2023.102253

IF = 3,200

MEiN = 100

Wkład w powstanie publikacji: zdefiniowanie celu badania i zaplanowanie eksperymentu; pomiar stężenia chemokiny CXCL13; izolacja kwasów nukleinowych; przeprowadzenie analizy metagenomicznej PMR; analiza bioinformatyczna danych NGS; przegląd literatury naukowej; zaplanowanie, przygotowanie oraz napisanie

manuskrytu pracy; złożenie pracy do publikacji oraz odpowiedź na sugestie recenzentów.

3) OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

3.1 Wprowadzenie:

Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) mogą być wywoływane przez szerokie spektrum patogenów, w tym bakterie, grzyby, pasożyty oraz wirusy. Aktualnie wyróżniamy ponad 100 gatunków wirusowych wywołujących stan zapalny w mózgu. Zakażenia OUN są istotnym globalnym problemem klinicznym oraz ekonomicznym, który rocznie dotyczy około 5 milionów osób.

Wzrost liczby oraz ryzyka zakażeń OUN nasila rozwój transportu, masowe i powszechne migracje ludności, jak również wkraczanie ludzkich siedlisk w przestrzeń dzikiej fauny. W ostatnich latach obserwujemy stały wzrost liczby zakażeń patogenami rzadkimi, wywołującymi zapalenie mózgu na co wpływ ma m.in. zwiększająca się liczba uchyleń od obowiązkowych szczepień (wirus odry), zmiany klimatyczne (np. zwiększanie obszaru endemicznego występowania wirusa Zachodniego Nilu), jak również zawleczenie na nowe tereny do tej pory nieopisywanych tam gatunków (np. obecność w populacji europejskich kleszczy wirusa Alongshan, identyfikowanego dotychczas w Azji). Wymienione czynniki istotnie komplikują diagnostykę zakażeń OUN, do tej pory głównie opartą o zastosowanie kombinacji specyficznych względem danego patogenu testów molekularnych (głównie PCR), serologicznych (ELISA, Western Blot) oraz tradycyjnych metod mikrobiologicznych. Pomimo komercyjnego zastosowania multipleksowych testów PCR, umożliwiających jednoczesną identyfikację kilku patogenów w jednej reakcji, proponowane panele nadal nie są w stanie uwzględnić wszystkich czynników etiologicznych zakażeń OUN. Oferowane testy najczęściej nie pozwalają także na diagnostykę patogenów rzadkich, nieprzewidzianych w rekomendacjach diagnostycznych danego kraju oraz do tej pory niepowiązanych gatunków z patogenezą zapaleń mózgu i/lub opon mózgowo-rdzeniowych. Tym samym wykonanie szerokiej diagnostyki jest czasochłonne oraz kosztowne, przy czym nadal pomimo tak kompleksowego podejścia praktycznie niemożliwa jest identyfikacji nieznanymi do tej pory gatunków neurotropowych. Wykrycie i opisanie czynnika etiologicznego zapalenia w OUN jest z kolei kluczowe w wyborze określonej terapii oraz w prognozowaniu przebiegu i następstw danego zakażenia.

Rozwiązaniem części problemów diagnostycznych zakażeń OUN mogą być nowe metody oparte o wysokoprzepustowe sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). W ostatnich latach szczególną uwagę poświęca się analizie metagenomicznej (mNGS), w której weryfikacji poddaje się wszystkie kwasy nukleinowe obecne w badanym materiale klinicznym lub środowiskowym, tworząc tym samym szczegółowy profil mikrobiologiczny uwzględniający zarówno znane, jak też do tej pory nieopisane gatunki. Inną metodą opartą o NGS jest profilowanie genu 16S rRNA, tj. markera molekularnego, który umożliwia analizowanie flory bakteryjnej danych układów oraz próbek. Obie wymienione techniki jeszcze do niedawna były głównie wykorzystywane w badaniach środowiskowych (analiza próbek wód, gleby z różnych ekosystemów) natomiast ich charakterystyka, w tym możliwa identyfikacja każdego patogenu (włączając w to gatunki rzadkie i nieznanne), bez uprzednich podejrzeń o ich obecności w badanym materiale czyni je potencjalnie przydatnymi w diagnostyce zakażeń OUN.

3.2 Cel naukowy:

Przedstawione osiągnięcie naukowe miało następujące cele:

- a) opracowanie procedury metagenomicznej do identyfikacji wirusów wywołujących zakażenia OUN w oparciu o analizę DNA i RNA oraz wykorzystanie jej w różnych układach badawczych u pacjentów ze stanem zapalnym w OUN;
- b) zastosowanie profilowania genu 16S rRNA w diagnostyce zapaleń OUN.

3.3 Omówienie prac wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego:

Ad.1

Next-generation sequencing in the diagnosis of viral encephalitis: sensitivity and clinical limitations

W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Scientific Reports* przedstawiono procedury analiz metagenomicznych w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Protokoły mNGS zostały stworzone z myślą o ich wykorzystaniu w diagnostyce wirusowych zakażeń OUN, stąd też opracowano dwie niezależne procedury, których wyjściowym kwasem nukleinowym poddawany analizie jest DNA lub RNA. Opisane w pracy protokoły były również stosowane w kolejnych omawianych publikacjach, wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego.

Wyjściowym materiałem klinicznym w opracowanych procedurach mNGS są próbki PMR, które w pierwszym etapie były poddawane filtrowaniu (filtr 0.45 µm) oraz trawieniu

DNazą. Wymienione etapy były stosowane w celu zmniejszenia tła sekwencji ludzkich oraz bakteryjnych, które w istotny sposób wpływają na zagłuszanie sygnału poszukiwanych sekwencji wirusowych, stanowiących śladową część analizowanych całkowitych kwasów nukleinowych w próbce. Kolejnym etapem procedury była izolacja RNA (metoda Chomczynski-Sacchi) oraz ekstrakcja DNA (użyto komercyjnego zestawu firmy Macherey-Nagel). Z powodu małej ilości uzyskiwanych z PMR kwasów nukleinowych, powstałe ekstrakty były wykorzystywane w dwóch różnych procedurach dedykowanych niezależnej preamplifikacji RNA (Ovation RNA-Seq V2 system, NuGEN, USA) oraz DNA (SeqPlex Enhanced DNA Amplification, Sigma-Aldrich, USA). Uzyskany produkt był podstawą do stworzenia bibliotek DNA poprzez zastosowanie zestawu Nextera XT (Illumina, USA), a następnie ich zsekwencjonowania na platformie HiSeq 1500 (Illumina, USA).

Integralnym elementem procedury metagenomicznej jest analiza bioinformatyczna danych NGS. W tym przypadku uzyskane z analizy DNA i RNA sekwencje poddano algorytmowi uwzględniającemu ocenę jakościową uzyskanych odczytów NGS, a na jej podstawie także procedurze ich przycięcia oraz filtrowania. Pozostałe po tym etapie odczyty były mapowane do genomu ludzkiego z wykorzystaniem oprogramowania Stampy, w celu pozbycia się tła genomowego gospodarza, co ma wpływ na szybszą i bardziej wydajną analizę docelowych sekwencji wirusowych. Uzyskane odczyty „niehumanne” były z kolei mapowane programem Bowtie 2 do wirusowych genomów referencyjnych pozyskanych z bazy RefSeq z platformy Genbank. Uzyskane wyniki mapowań były indeksowane, zliczane, katalogowane oraz wizualizowane przy użyciu różnego oprogramowania, w tym pakietu phyloseq, czy też programów takich jak Samtools i CLC Genomic Workbench (Qiagen, USA).

W omawianej pracy dokonano oceny czułości zaprezentowanych procedur w wykrywaniu wirusów. W tym celu przygotowano kontrole zawierające wirusy (wirus zapalenia wątroby typu B; HBV oraz wirus ludzkiego niedoboru odporności; HIV) zawieszane w PMR w określonym mianie (10^5 , 10^4 , 10^3 , 500, 100 i 10 kopii wirusowych na pojedynczą reakcję). Wykorzystany do zawieszania PMR miał wcześniej potwierdzony molekularnie brak obecności HBV i HIV. Utworzone kontrole poddano niezależnym procedurom mNGS w oparciu o wyizolowane DNA i RNA, zgodnie z powyższym opisem.

W wyniku przeprowadzonego badania wykazano, iż analiza RNA-mNGS umożliwiła wykrycie HIV w liczbie do 10^2 , zaś w przypadku analizy DNA-mNGS wykryto do 10 kopii HBV na reakcję. W jednocześnie analizowanych metagenomicznie negatywnych kontrolach (PMR do rozcieńczeń) nie wykryto obecności kwasów nukleinowych docelowych wirusów.

W dalszej części badania procedurę metagenomiczną wykorzystano w analizie PMR pobranego od sześciu pacjentów z enterowirusową etiologią zapalenia mózgu (zakażenie wirusem RNA) oraz od 15 pacjentów z neuroinfekcją spowodowaną wirusem DNA: 13 pacjentów z HSV-1 oraz pojedyncze przypadki zakażeń cytomegalowirusem (CMV) lub wirusem ospy wietrznej i półpaśca (VZV). Pacjenci byli hospitalizowani w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie z klinicznym rozpoznaniem zapalenia mózgu. Obecność domniemanego patogenu w PMR stwierdzono u 17% przypadków zapalenia wywołanego wirusem RNA oraz u 28,6% pacjentów z zakażeniem wirusem DNA (pozytywne wyniki stwierdzono u pacjentów z opryszczkowym zapaleniem mózgu).

Zaprezentowane w publikacji procedury analiz metagenomicznych wykazały przydatność w diagnostyce wirusowych zakażeń OUN, przy czym potwierdzono, iż obecnie stosowane swoiste metody molekularne w identyfikacji patogenów w PMR charakteryzują się większą czułością. Zaletą przedstawionych procedur metagenomicznych jest możliwość detekcji wielu potencjalnych patogenów. Zastosowana metoda może być tym samym istotnym wsparciem aktualnego i rekomendowanego modelu diagnostycznego, stosowanego w wirusowych zakażeniach OUN.

Ad.2

Search for viral agents in cerebrospinal fluid in patients with multiple sclerosis using real-time PCR and metagenomics

Otrzymane wyniki z wcześniejszej pracy pozwoliły na zastosowanie procedur metagenomicznych u osób z rozpoznaniem stwardnieniem rozsianym (SM), którzy zostali wyselekcjonowani z grupy pacjentów Kliniki Neurologii WUM z wcześniejszym podejrzeniem neuroinfekcji. Przeprowadzone badanie zostało opisane w pracy opublikowanej w czasopiśmie *PLoS One*.

Okres ostatnich lat jest czasem intensywnych badań mających na celu poznanie możliwej patogenezы SM. Wśród licznych teorii oraz proponowanych mechanizmów jednym z bardziej intrygujących założeń jest możliwy udział czynników zakaźnych w patogenezie choroby. Oprócz bakterii oraz grzybów, głównie wirusy takie jak wirus Epsteina-Barr (EBV), ludzki herpeswirus typu 6 (HHV-6), CMV, wirus *Torque teno* (TTV) czy też endogenne retrowirusy są najczęściej proponowanymi czynnikami zakaźnymi, które mogą mieć udział w indukcji demielinizacji oraz rozwoju stanu zapalnego w SM. W Pracy 2 dokonano analizy

mającej na celu zweryfikowanie możliwej obecności wirusów w PMR pacjentów z rozpoznaniem SM.

Łącznie do badania zakwalifikowano 47 pacjentów (30 kobiet, 17 mężczyzn) w wieku od 17 do 71 lat. Wśród nich na podstawie kryteriów McDonalda zdiagnozowano 34 pacjentów z rozpoznaną rzutowo-remisyjną postacią SM. Pozostałych 13 pacjentów bez rozpoznania SM zostało zakwalifikowanych jako próby kontrolne. U wszystkich pacjentów wykonano oznaczenia RT-PCR/PCR w PMR w kierunku dziewięciu wirusów (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, ludzki herpeswirus typu 7 (HHV-7), ludzkie adenowirusy (HAdVs) i enterowirusy (EV; Coxsackie A9, A16, B2, B3, B4, B5; ECHO 5, 6, 9, 11, 18, 30 i enterowirus 71). Dodatkowo u 13 pacjentów z SM i czterech kontroli wykonano mNGS opierając się zarówno o analizę DNA, jak też RNA. Analizę wykonano u pacjentów, u których dysponowano wystarczającą objętością PMR, niezbędną do rozpoczęcia procedury metagenomicznej, po uprzednim wykonaniu swoistej diagnostyki molekularnej. Zastosowane analizy metagenomiczne były analogiczne do tych opisanych w [Pracy 1](#).

W przebiegu badania, wykorzystując swoistą diagnostykę molekularną wykryto zakażenia OUN u pacjentów z potwierdzonym SM następującymi wirusami: HHV-6 (3 przypadki; 8.82%), EBV (2 przypadki; 5.88%), VZV (1 przypadek; 2.94%) oraz EV (1 przypadek; 2.94%). W próbkach kontrolnych wykryto EBV-DNA u jednego pacjenta (7.69%). Miano wirusa wykrywanego w PMR wahało się od 550 do 1750 kopii/ml.

Analizę metagenomiczną wykonano w PMR pobranym od 13 pacjentów z SM oraz 4 kontroli. Po jakościowej weryfikacji i obróbce odczytów NGS procedura metagenomiczna oparta o analizę DNA dała łącznie 211440331 odczytów (średnio 13215021 odczytów na próbkę), podczas gdy podejście RNA dostarczyło 451782975 odczytów (średnio 26575469 odczytów na próbkę). Większość odczytów NGS została zmapowana do ludzkiego genomu (średnia: 96,21%). W procedurze opartej o analizę DNA wykryto od 42 do 10174 (0,0003–0,0886%, średnia: 0,0132%) sekwencji wirusowych na próbkę, podczas gdy w podejściu RNA było to od 2609 do 69061 odczytów (0,0075–0,2443%; średnia: 0,0491%). Większość zidentyfikowanych wirusów stanowiły bakteriofagi, podczas gdy inne odczyty wirusowe nie spełniły przyjętych kryteriów identyfikacji lub zostały zakwalifikowane jako zanieczyszczenia lub artefakty mNGS.

W przebiegu badania zidentyfikowano w grupie pacjentów z SM szereg wirusów już wcześniej opisywanych w literaturze w kontekście patogenezy choroby. Większość z wykrytych wirusów należała do rodziny *Herpesviridae*. Szczególnie interesujące jest

potwierdzenie zakażenia HHV-6 w trzech przypadkach, gdyż już wcześniej ten wirus był sugerowany jako możliwy czynnik patogenezy SM, głównie za sprawą swojego białka U24. Istotne jest także wykazanie obecności EBV u dwóch pacjentów z SM, szczególnie w perspektywie przełomowej pracy „Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis” opublikowanej w czasopiśmie *Science* w 2022 roku, gdzie wykazano, iż przebyte zakażenie EBV 32-krotnie zwiększa ryzyko demielinizacji obserwowanej w SM.

Zastosowana w pracy procedura metagenomiczna nie umożliwiła identyfikacji wirusów wcześniej potwierdzonych swoistą diagnostyką molekularną. Stan ten był prawdopodobnie spowodowany mniejszą czułością analizy metagenomicznej w porównaniu do czułości reakcji RT-PCR/PCR wykorzystywanych w diagnostyce OUN w próbach klinicznych. Dodatkowo otrzymane wyniki zasygnalizowały istnienie istotnego problemu zanieczyszczeń mNGS, definiowanych jako tło procedury, generowane z powodu użytych odczynników, niespecyficzných produktów amplifikacji, czy też błędów bioinformatycznych algorytmów użytych w analizie. Zaobserwowane zjawisko w tym, jak również i w kolejnych badaniach zostało opisane w pracy „Contamination Issue in Viral Metagenomics: Problems, Solutions, and Clinical Perspectives” (Jurasz H., Pawłowski T., Perlejewski K. *Frontiers in Microbiology*, 2021) nieujętej w cyklu tego osiągnięcia.

Ad.3

Search for Viral Infections in Cerebrospinal Fluid From Patients With Autoimmune Encephalitis

W kolejnej pracy, opublikowanej w *Open Forum Infectious Diseases*, będącej częścią niniejszego cyklu, mNGS zastosowano w analizie, której grupą badaną było 200 pacjentów z podejrzeniem zapalenia mózgu, u których przeprowadzono kompleksową diagnostykę w kierunku obecności w PMR sześciu różnych przeciwciał charakterystycznych dla autoimmunologicznego zapalenia mózgu (AE).

W przypadku AE kluczowym elementem etiologii stanu zapalnego jest obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko wybranym powierzchniowym, jak i wewnątrzkomórkowym antygenom neuronów. Epidemiologicznie AE stanowi od 4,2 do 7,9% przypadków wszystkich zapaleń mózgu. Pomimo licznych badań nadal nie wiadomo co jednoznacznie indukuje produkcję wspomnianych autoprzeciwciał, a tym samym generowanie stanu zapalnego w OUN. Wśród możliwych mechanizmów wymienia się m.in.

udział wirusów w patogenezie choroby, sugerując ich możliwy destrukcyjny wpływ na neurony, czy też udział zjawiska mimikry antygenowej, związanej z białkami określonych gatunków (np. HSV).

W Pracy 3 zbadano 200 pacjentów z rozpoznaniem zapaleniem mózgu, hospitalizowanych w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie w kierunku autoprzeciwciał AE. W tym celu u wszystkich pacjentów wykonano test Autoimmune Encephalitis Mosaic 6 (Euroimmune, Niemcy) oparty o immunofluorescencję pośrednią (IIF) w PMR, wykrywający przeciwciała skierowane przeciwko receptorom glutaminianu (typ NMDA lub typ AMPA1/2), receptorom GABA B, DPPX oraz białkom LGI1 i CASPR2.

W wyniku tak zastosowanej diagnostyki zidentyfikowano ośmiu (4%) pacjentów z obecnością autoprzeciwciał w OUN, co jest porównywalne z danymi epidemiologicznymi z USA i Europy. Wśród pozytywnych pacjentów, siedmiu (3.5%) miało wykryte przeciwciała anti-NMDAR oraz jeden pacjent (0.5%) miał potwierdzoną obecność anti-GABA B. Diagnostykę wykonano również w surowicy krwi pobranej od tych osób i u jednej z nich również wykryto anti-NMDAR. U wszystkich pacjentów z obecnością przeciwciał AE w PMR wykonano swoistą diagnostykę molekularną w kierunku najważniejszych wirusów zakażających OUN (patogeny wymienione w Pracy 2). W wyniku tej analizy u pojedynczych pacjentów zidentyfikowano w PMR obecność HSV-1 (300 kopii/ml) oraz EV (550 kopii/ml).

Opisana w Pracy 1 analiza metagenomiczna została przeprowadzona u siedmiu pacjentów, u których wykryto AE. W DNA-mNGS łącznie uzyskano 12893313, z kolei w RNA-mNGS 14469597 odczytów. Liczba sekwencji wirusowych wykrytych w przebiegu analizy wahała się pomiędzy 1015 a 132884. Ostatecznie na podstawie przyjętych kryteriów zidentyfikowano w PMR jednego pacjenta TTV, którego faktyczną obecność w OUN potwierdziła swoista reakcja PCR.

Wykryte w badaniu wirusy mają dobrze udokumentowany (HSV-1 i EV), bądź też prawdopodobny (TTV) związek z patogenezą zapalenia mózgu. Tym samym wykrycie tych czynników u pacjentów z AE jest kolejnym ważnym głosem potwierdzającym możliwy udział tych wirusów w syntezie autoprzeciwciał, a tym samym ich prawdopodobny udział w patogenezie choroby.

Ad.4

Patients with Infections of The Central Nervous System Have Lowered Gut Microbiota Alpha Diversity

W związku z pojawiającymi się doniesieniami o możliwym wpływie mikrobioty jelitowej na przebieg oraz patogenezę wielu chorób neurologicznych postanowiliśmy zbadać skład mikrobioty jelitowej w odniesieniu do różnych etiologii zapaleń mózgu. Do tej pory flora jelitowa była badana m.in. u pacjentów z SM czy też osób z AE, natomiast jej analiza nie była przeprowadzana u pacjentów z neuroinfekcjami, w szczególności w odniesieniu do rodzaju patogenu wywołującego stan zapalny w OUN.

Dynamiczny rozwój technik NGS w ostatnich latach umożliwił stworzenie platformy pozwalającej na kompleksową ocenę flory bakteryjnej w oparciu o analizę markera molekularnego jakim jest gen kodujący podjednostkę 16S rRNA. W uwzględnionym w niniejszym osiągnięciu naukowym badaniu analizie poddano 47 pacjentów z rozpoznaną neuroinfekcją, których podzielono na 26-osobową grupę z rozpoznaniem wirusowego zapalenia mózgu i/lub opon-mózgowo-rdzeniowych; grupę ośmiu pacjentów z bakteryjną neuroinfekcją oraz grupę składającą się z 13 osób, u których nie udało się stwierdzić specyficznego czynnika zakaźnego odpowiedzialnego za powstały stan zapalny w OUN (nieznana etiologia). Dodatkowo do badania włączono 20-osobową grupę kontrolną (osoby zdrowe, bez antybiotykoterapii; osoby dobrane pod względem zgodności płci i wieku do grupy badanej).

Próbki kału pobrane od każdego pacjenta i kontroli poddano procedurze związanej z sekwencjonowaniem genu 16S rRNA oraz obróbce bioinformatycznej uzyskanych odczytów NGS. W skrócie, z około 200 mg kału wyizolowano DNA, a następnie przy wykorzystaniu polimerazy o „dużej wierności” oraz starterów reakcji PCR (region V3-V4 analizowanego genu) zamplifikowano produkt o wielkości 550 nukleotydów. Po wyznakowaniu, produkt zsekwencjonowano wykorzystując platformę MiSeq (Illumina, USA).

Otrzymane sekwencje zostały podane algorytmowi bioinformatycznemu Qiime, w trakcie którego odczyty NGS zostały poddane m.in. ocenie jakościowej, „asemblacji *de novo*”, kategoryzacji do poszczególnych rang taksonomicznych, zliczeniu, analizie statystycznej, jak również ich wizualizacji.

W wyniku przeprowadzonego sekwencjonowania w grupie badanej otrzymano średnio 37085, natomiast w kontrolnej 40010 odczytów na próbkę. Po rozdzieleniu odczytów na poszczególne kategorie taksonomiczne docelowo zidentyfikowano 14 (grupa

neuroinfekcji) oraz 12 (kontrola) typów bakterii. Na poszczególnych szczeblach taksonomii wykryto różne istotne zmiany liczebności bakterii, zarówno łącznie pomiędzy grupą pacjentów z neuroinfekcją, jak też określonymi typami zakażeń OUN a grupą kontrolną. W badaniu zaobserwowano m.in. zmniejszoną reprezentację *Clostridium*, *Anaerostipes*, *Lachnobacterium*, *Lachnospira*, oraz *Roseburia* u pacjentów z neuroinfekcją w odniesieniu do kontroli. Parametry zmienności alfa-diversity wykorzystywane w tego typu analizach uwidoczniły zmniejszoną zmienność osobniczą mikrobioty pacjentów z neuroinfekcją w porównaniu do kontroli. Z kolei parametry beta-diversity pokazujące ogólne różnice w populacjach bakteryjnych pomiędzy analizowanymi grupami nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami.

Wyniki opublikowane w *Current Issues in Molecular Biology* po raz pierwszy potwierdziły istniejące różnice w składzie mikrobioty jelitowej u pacjentów z zakażeniem OUN, otwierając przy tym nową perspektywę badań związanych z określeniem czy zaistniałe obserwacje są konsekwencją danej choroby, czy też są związane z jej patogenezą i/lub mają potencjalny wpływ na jej przebieg. Jakkolwiek, zaobserwowane różnice w zmienności alfa-diversity są niejednoznaczne w kwestii ich interpretacji. Zmniejszenie różnorodności bakteryjnej u pacjentów z neuroinfekcjami w odniesieniu do kontroli może być związane z toczącym się stanem zapalnym, ale także być spowodowane wieloma czynnikami włącznie z kwestią samej hospitalizacji, związaną z tym zmianą diety, jak również przyjmowanymi lekami.

Ad.5

Metagenomic search of viral coinfections in herpes simplex 1 encephalitis patients

W pracy opublikowanej w *Journal of NeuroVirology* zbadano możliwą obecność koinfekcji wirusowych w przebiegu zakażeń OUN. Dotychczas w literaturze opisano zaledwie kilka przypadków zakażeń mózgu, w których patogenezę stanu zapalnego była tłumaczona aktywnością więcej niż jednego patogenu. Z wielu potencjalnych wirusów wykazujących zdolność zakażenia OUN zazwyczaj diagnostyka koncentruje się wyłącznie na wybranych, pojedynczych gatunkach. Tym samym rutynowo rzadko weryfikuje się w PMR u pacjentów z podejrzeniem neuroinfekcji szeroki panel wirusów.

W niniejszej pracy w PMR pobranym od pacjentów z potwierdzonym opryszczkowym zapaleniem mózgu (20 osób) hospitalizowanych w Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie przeprowadzono kompleksową analizę mNGS. U wszystkich pacjentów obecność

HSV-1 w PMR była potwierdzona reakcją RT-PCR, a wykryte miana wirusa wahały się od 60 do 344 kopii/ml. Na podstawie wyników diagnostyki serologicznej nie potwierdzono zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV), jak również obecności w PMR bakterii z rodzaju *Borrelia* u żadnego z pacjentów. W wyniku przeprowadzonej analizy metagenomicznej (DNA-mNGS u 19 pacjentów; RNA-mNGS u 20 pacjentów) u poszczególnych pacjentów zidentyfikowano szereg potencjalnych wirusów innych niż HSV, w tym u Pt 5. stwierdzono możliwe zakażenie różnymi gatunkami EV (wykrycie sekwencji EV A oraz EV B). Ostatecznie serotypowanie pozwoliło na potwierdzenie obecności ludzkiego echowirusa 6 u Pt5. Dodatkowo w mNGS zidentyfikowano również m.in. sekwencje poliomawirusa z komórek Merkla (MCPyV), wirusa brodawczaka ludzkiego typu 5 (HPV5) oraz ludzkiego pegiwirusa (HPgV), natomiast swoista diagnostyka molekularna nie pozwoliła potwierdzić obecności tych czynników w PMR u żadnego z pacjentów.

Włączone w niniejsze osiągnięcie naukowe badanie wykazało użyteczność mNGS w identyfikacji zakażeń mieszanych w OUN, jakkolwiek zasygnalizowało również obecność szeregu istotnych ograniczeń metody. Po raz kolejny podkreślono problematyczność kwestii zanieczyszczeń genomowych w perspektywie powszechnej aplikacji metody, głównie z powodu trudności interpretacyjnych otrzymanych wyników mNGS, jak również wydłużenia czasu procedury diagnostycznej. Dodatkowo problemem jest już wcześniej opisana kwestia mniejszej czułości metody w odniesieniu do PCR stosowanego w PMR. Jakkolwiek, niniejsze badanie jest pierwszym na świecie, które prezentuje przypadek zakażenia OUN, gdzie pacjent ma potwierdzoną jednoczesną obecność w PMR HSV i EV. Do tej pory wykrywano jedynie zakażenia mieszane u pacjentów z neuroinfekcjami różnymi przedstawicielami *Herpesviridae*. Otrzymane wyniki kolejny raz poddają pod dyskusję potrzebę uwzględnienia w diagnostyce neuroinfekcji szerokiego panelu patogenów.

Ad.6

Enteroviral central nervous system infections in patients with Lyme neuroborreliosis

Ostatnia praca niniejszego osiągnięcia naukowego, opublikowana w czasopiśmie *Ticks and Tick-Borne Diseases* przedstawia wyniki badania, w którym weryfikacji poddano obecność wirusowych zakażeń w OUN wśród pacjentów z neuroboreliozą. Temat możliwych współzakażeń wirusami innymi niż TBEV w przebiegu neuroinfekcji spowodowanej krętkami z rodzaju *Borrelia* nie został do tej pory zbadany. Zaproponowane badanie było o tyle istotne, iż część przypadków neuroboreliozy przebiega wraz z zapaleniem mózgu, w którym

głównym czynnikiem etiologicznym są wirusy. Aktualnie jedynym wirusem powszechnie weryfikowanym w ramach diagnostyki osób mających udokumentowany kontakt z kleszczem lub podejrzenie boreliozy jest TBEV. Identyfikacja zakażeń mieszanych jest o tyle istotna, iż te mogą mieć wpływ na przebieg zapaleń mózgu, tym samym po części tłumacząc również zróżnicowany profil kliniczny neuroboreliozy.

Do badania zakwalifikowano 14 pacjentów Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie, u których zgodnie z wytycznymi Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologicznych zdiagnozowano potwierdzoną (pięciu pacjentów) oraz prawdopodobną (dziewięciu pacjentów) neuroboreliozę. Rozpoznanie dokonano na podstawie charakterystycznego obrazu klinicznego choroby, cytozy w PMR oraz wewnątrzoponowej syntezy przeciwciał *Borrelia s.l.* Dodatkowo u wszystkich pacjentów oznaczono stężenie chemokiny CXCL13 w PMR tj. nieswoistego markera neuroboreliozy, stosowanego jako element diagnostyki pomocniczej.

Do identyfikacji zakażeń wirusowych w OUN wykorzystano panel reakcji RT-PCR/PCR (opisany w [Pracy 2](#)), mNGS (analizę RNA i DNA wykonano u 10 pacjentów w PMR) oraz metody serologiczne (detekcja IgM/IgG TBEV w PMR). Ostatecznie w wyniku przeprowadzonej analizy u dwóch pacjentów z potwierdzoną neuroboreliozą wykryto zakażenie enterowirusowe w OUN (Pt.2 - 220 kopii/ml oraz Pt.3 - 270 kopii/ml).

Do tej pory jedyne badanie poświęcone enterowirusowemu zakażeniu OUN w neuroboreliozie zostało przeprowadzone u szwedzkich pacjentów pediatrycznych (99 osób), przy czym w jego ramach nie zdołano potwierdzić zakażenia EV w żadnym z analizowanych przypadków. Przeprowadzone przeze mnie badanie jest na ten moment pierwszą tak kompleksową analizą, w której potwierdzono obecność zakażenia EV w OUN w przebiegu neuroboreliozy. Tym samym uzyskane wyniki poddają pod dyskusję rewizję rekomendacji dotyczących diagnostyki osób z podejrzeniem neuroboreliozy sugerując uwzględnienie w niej również testów wykrywających EV, jak też innych wirusów wykazujących właściwości neurotropowe. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do szerszej analizy, w której identyfikacja EV w neuroboreliozie powinna zostać przeprowadzona wśród większej liczby chorych wraz z dokonaniem oceny realnego wpływu EV na przebieg i następstwa neuroboreliozy.

3.4 Podsumowanie:

Przedstawione w osiągnięciu naukowym wyniki wskazują na użyteczność nowoczesnych metody opartych o NGS w diagnostyce zakażeń OUN. Opracowane i wykorzystane w osiągnięciu procedury metagenomiczne były wartościowym elementem wspierającym rutynowe schematy diagnostyki wirusowych zapaleń mózgu. Jednocześnie powszechne wykorzystanie tego typu procedur w rutynowej diagnostyce neuroinfekcji jest możliwe jedynie po rozwiązaniu problemów związanych z ich ograniczoną czułością wynikającą bezpośrednio z nieswoistego charakteru tej metodyki, wysokiego kosztu pojedynczej analizy, jak również trudnością analizy bioinformatycznej danych NGS. Dodatkowo istotnym aspektem jest kwestia generowanego w przebiegu metagenomiki tła zanieczyszczeń genomowych, istotnie utrudniających i wydłużających proces interpretacji wyników. Brak jednoznacznych wytycznych, komercyjnych kontroli, standaryzacji metody, jak również duża różnorodność proponowanych procedur sugeruje, aby metagenomikę traktować jako metodę pomocniczą w diagnostyce zakażeń OUN z zachowaniem priorytetu obecnych rekomendacji. Z kolei opisana w osiągnięciu naukowym praca, w której zastosowano oparte o NGS profilowanie genu 16S rRNA pokazała istniejący potencjał tego typu analiz w kolejnym modelu badawczym, zaś otrzymane wyniki mogą mieć potencjalne znaczenie diagnostyczne, tym samym otwierają również nowe pola do przyszłych badań.

Podsumowując, techniki oparte o NGS są wartościowym dopełnieniem aktualnego schematu diagnostycznego w zakażeniach OUN.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Poza przedstawionym cyklem publikacji jestem autorem lub współautorem 30 innych prac; w pięciu z tych publikacji jestem pierwszym lub korespondującym autorem. Prace poza opisanym osiągnięciem naukowym są poświęcone głównie zagadnieniom tematyki chorób zakaźnych oraz mikrobiologii człowieka. Łączny IF prac poza cyklem habilitacyjnym wynosi 106,947 punktów (punkty MEIN = 1905).

1) ARTYKUŁY ZWIĄZANE TEMATYCZNIE Z DIAGNOSTYKĄ ZAPALEŃ MÓZGU, NIE UJĘTE W OSIĄGNIĘCIU:

Głównym obszarem moich naukowych zainteresowań jest zagadnienie zakażeń OUN z naciskiem na problematykę zakaźnego zapalenia mózgu. W większości swoich badań koncentrowałem się na zastosowaniu metagenomiki do diagnostyki wirusowych zapaleń

mózgu. Oprócz przeprowadzania analiz metagenomicznych jednocześnie byłem odpowiedzialny za analizę bioinformatyczną danych NGS.

Łącznie do tej kategorii zaliczam dziewięć artykułów z czego osiem to prace oryginalne. Jedna praca poglądowa została napisana na bazie doświadczeń zebranych podczas realizacji badań opisanych w powyższym osiągnięciu naukowym i dotyczy problemu zanieczyszczeń genomowych w wirusowych analizach metagenomicznych. Wymieniona praca jako pierwsza przedstawiała ten problem oraz uwzględniła rekomendacje, które mają na celu zminimalizowanie negatywnych efektów zaprezentowanego zjawiska.

Wybrane publikacje:

a) ***Human Pegivirus in Patients with Encephalitis of Unclear Etiology, Poland***

Bukowska-Ośko I, **Perlejewski K (autor korespondujący)**, Pawełczyk A, Rydzanicz M, Pollak A, Popiel M, Cortés KC, Paciorek M, Horban A, Dzieciatkowski T, Radkowski M, Laskus T. Open Forum Infectious Diseases, 2020, DOI: 10.1093/ofid/ofaa468

b) ***Contamination Issue in Viral Metagenomics: Problems, Solutions, and Clinical Perspectives***

Jurasz H, Pawłowski T, **Perlejewski K (autor korespondujący)**. Frontiers in Microbiology, 2021, DOI: 10.3389/fmicb.2021.745076

c) ***A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting***

Lipowski D, Popiel M, **Perlejewski K**, Nakamura S, Bukowska-Osko I, Rzdakiewicz E, Dzieciatkowski T, Milecka A, Wenski W, Cizek M, Debska-Slizien A, Ignacak E, Cortes KC, Pawełczyk A, Horban A, Journal of Infectious Diseases, 2017, DOI: 10.1093/infdis/jix040

d) ***Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens***

Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Caraballo Cortés K, Stępień A, Radkowski M, Bukowska-Ośko I. Journal of Virological Methods, 2015, DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.09.010

2) ARTYKUŁY ZWIĄZANE TEMATYCZNIE Z PATOGENEZĄ I DIAGNOSTYKĄ ZAKAŻENIA WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV)

Poza zagadnieniem zakażeń OUN kolejnym ważnym elementem mojej działalności naukowej jest uczestnictwo w badaniach poświęconych tematyce wirusowego zapalenia wątroby wywoływanego przez HCV (WZWC). Aktualnie jestem współautorem 14 prac oryginalnych realizowanych w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych WUM, dotyczących immunopatologii zakażeń HCV, jak również wpływu zmienności wirusa na patogenezę WZWC. Moją rolą w tych pracach była wykonywana przeze mnie analiza statystyczna oraz bioinformatyczna danych NGS. Prezentowane w pracach wyniki wskazują

na istotne znaczenie zjawiska wycieńczenia immunologicznego w przebiegu WZWC, jak również wpływu zmienności genetycznej wirusa na przebieg, konsekwencje oraz terapię zakażenia.

Wybrane publikacje:

a) ***CD8+ T-cell exhaustion phenotype in chronic hepatitis C virus infection is associated with epitope sequence variation***

Osuch S, Laskus T, Perlejewski K, Berak H, Bukowska-Ośko I, Pollak A, Zielenkiewicz M, Radkowski M, Caraballo Cortés K.

Frontiers in Immunology, 2022, DOI: 10.3389/fimmu.2022.832206

b) ***Hepatitis C virus (HCV) genotype 1b displays higher genetic variability of hypervariable region 1 (HVR1) than genotype 3***

Janiak M, Perlejewski K, Grabarczyk P, Kubicka-Russel D, Zagordi O, Berak H, Osuch S, Pawełczyk A, Bukowska-Ośko I, Płoski R, Laskus T, Caraballo Cortés K.

Scientific Reports, 2019, DOI: 10.1038/s41598-019-49258-y

c) ***Analysis of genotype 1b hepatitis C virus IRES in serum and peripheral blood mononuclear cells in patients treated with interferon and ribavirin***

Bukowska-Ośko I, Caraballo Cortés K, Pawełczyk A, Płoski R, Fic M, Perlejewski K, Demkow U, Berak H, Horban A, Laskus T, Radkowski M.

BioMed Research International, 2014, DOI: 10.1155/2014/175405

d) ***Deep sequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 reveals no correlation between genetic heterogeneity and antiviral treatment outcome***

Cortés KC, Zagordi O, Perlejewski K, Laskus T, Maroszek K, Bukowska-Ośko I, Pawełczyk A, Płoski R, Berak H, Horban A, Radkowski M.

BMC Infectious Diseases, 2014, DOI: 10.1186/1471-2334-14-389

3) ARTYKUŁY ZWIĄZANE TEMATYCZNIE Z ANALIZĄ MIKROBIOTY JELITOWEJ CZŁOWIEKA I SZCZURÓW

Kolejna część moich prac naukowych jest poświęcona mikrobiocie jelitowej badanej u człowieka i szczurów. Do tej kategorii zaliczam cztery prace oryginalne realizowane z Zakładem Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej (kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal), w których wykorzystano sekwencjonowanie genu 16S rRNA do profilowania flory bakteryjnej szczurów w różnych modelach badawczych. Moją rolą w tych badaniach była analiza bioinformatyczna danych NGS. Dodatkowo jedna praca przeglądowa, zaliczona do tej kategorii opisuje rolę mikrobioty jelitowej w nowotworach przewodu pokarmowego.

Wybrane publikacje:

a) ***Trimethylamine But Not Trimethylamine Oxide Increases With Age in Rat Plasma and Affects Smooth Muscle Cells Viability***

Jaworska K, Konop M, Hutsch T, **Perlejewski K**, Radkowski M, Grochowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E, Ufnal M.

Journals of Gerontology Series A - Biological Sciences and Medical Sciences, 2020, DOI: 10.1093/gerona/glz181

b) *High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats*

Bielinska K, Radkowski M, Grochowska M, **Perlejewski K**, Huc T, Jaworska K, Motooka D, Nakamura S, Ufnal M.

Nutrition, 2018, DOI: 10.1016/j.nut.2018.03.004

c) *Enalapril decreases rat plasma concentration of TMAO, a gut bacteria-derived cardiovascular marker*

Konop M, Radkowski M, Grochowska M, **Perlejewski K**, Samborowska E, Ufnal M.

Biomarkers, 2018, DOI: 10.1080/1354750X.2018.1432689

4) ARTYKUŁY TEMATYCZNIE ZWIĄZANE Z COVID-19

W moim dorobku na wyróżnienie zasługują również dwie prace oryginalne opublikowane w 2022 roku, które tematycznie odnoszą się do skuteczności szczepień w COVID-19. Moja rola w niniejszych pracach wiązała się z kwestią wykonania oznaczeń mian przeciwciał poszczepiennych, jak również przeciwciał świadczących o przebytych lub aktywnym zakażeniu drugim koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2).

Wybrane publikacje:

a) *The Beneficial Effect of the COVID-19 Vaccine Booster Dose among Healthcare Workers in an Infectious Diseases Center*

Skrzat-Klapaczyńska A, Bieńkowski C, Kowalska J, Paciorek M, Puła J, Krogulec D, Stengiel J, Pawełczyk A, **Perlejewski K**, Osuch S, Radkowski M, Horban A.

Vaccines, 2022, DOI: 10.3390/vaccines10040552

b) *Higher Immunological Response after BNT162b2 Vaccination among COVID-19 Convalescents - The Data from the Study among Healthcare Workers in an Infectious Diseases Center*

Skrzat-Klapaczyńska A, Kowalska JD, Paciorek M, Puła J, Bieńkowski C, Krogulec D, Stengiel J, Pawełczyk A, **Perlejewski K**, Osuch S, Radkowski M, Horban A.

Vaccines, 2022, DOI: 10.3390/vaccines10122158

VI. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

W przebiegu swojej działalności naukowej utrzymywałem, jak również nadal prowadzę współpracę z następującymi międzynarodowymi ośrodkami naukowymi:

1) WSPÓŁPRACE ZWIĄZANE Z APLIKACJĄ METAGENOMIKI W DIAGNOSTYCE CHOROÓB ZAKAŻNYCH CZŁOWIEKA.

- Department of Infection Metagenomics, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japonia – współpraca z Prof. Shota Nakamura
- Department of Clinical Science, University of Bergen, Norwegia – współpraca z Dr Tomaszem Stokowym

Współpraca opierała się na udzielanym wsparciu w kwestii analizy danych NGS pozyskanych w przebiegu analizy metagenomicznych. W ramach trwającej kilka lat współpracy, w tym podczas tygodniowej wizyty w Department of Clinical Science, University of Bergen w roku 2015 pozyskałem podstawowe umiejętności związane z obróbką i analizą danych NGS, którą następnie rozszerzyłem po wizycie zespołu Prof. Shoty Nakamury w Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i pasożytniczych WUM w 2016r. W ramach współpracy opublikowano łącznie pięć prac naukowych o łącznym IF=13,982. W konsekwencji tych współprac nabyłem umiejętności umożliwiające mi samodzielną analizę danych NGS w zakresie badań metagenomicznych. Jednocześnie pozyskane zdolności były podstawą do rozwinięcia mojej wiedzy o analizach danych NGS stosowanych również w profilowaniu genu 16S rRNA, jak również w ocenie zmienności HCV.

2) POZOSTAŁE WSPÓŁPRACE NAUKOWE

- Institute of Virology, National Reference Center for Papilloma- and Polyomaviruses, University of Cologne, Faculty of Medicine, University Hospital Cologne, Niemcy – współpraca z Dr Steffi Silling

W ramach swojej działalności naukowej miałem okazję współpracować z Dr Steffi Silling w związku z potrzebą wykluczenia/potwierdzenia zakażenia OUN HPV typu 5, jako wiodącego ośrodka w Europie zajmującego się *Papillomaviridae*. Efektem tej współpracy jest Praca 5 opisana w powyższym osiągnięciu naukowym.

- Laboratory of Viral Metagenomics, Rega Institute, KU Leuven, Belgia – współpraca z Prof. Jelle Matthijssens

Współpraca z Prof. Jelle Matthijssens rozpoczęła się w roku 2017 od 3-miesięcznego pobytu w kierowanym przez Pana Profesora Laboratory of Viral Metagenomics. Podczas tej wizyty poznałem protokół analizy metagenomicznej NetoVIR, który jest wykorzystywany do charakterystyki flory wirusowej człowieka i zwierząt. Efektem tej współpracy jest złożona w 2023 roku aplikacja o kolejny, półroczny staż w ramach Programu Bekkera w Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej (NAWA); sygnatura wniosku BPN/BEK/2023/1/00069 (obecny status: ocena merytoryczna wniosku). Wspólny projekt naukowy dotyczy wykorzystania metagenomiki w kontekście analizy wirusowej polskiej populacji kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*.

VII. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

1) INFORMACJA O DZIAŁALNOŚCI DYDAKTYCZNEJ

- Prowadzenie ćwiczeń i seminariów z przedmiotu „Choroby zakaźne” dla studentów IV roku kierunku lekarskiego (Warszawski Uniwersytet Medyczny).
- Prowadzenie wykładów, ćwiczeń i seminariów z przedmiotu „Immunopatologia z immunodiagnostyką” dla studentów II roku analityki medycznej (Warszawski Uniwersytet Medyczny).
- Prowadzenie ćwiczeń i seminariów w języku angielskim z przedmiotu Choroby zakaźne dla studentów kierunku lekarskiego w ramach The English Division Medical Program (Warszawski Uniwersytet Medyczny).
- Udział w prowadzeniu studenckiego koła naukowego przy Zakładzie Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych WUM w latach 2012-2013.

2) PROMOTORSTWO PRAC MAGISTERSKICH I DOKTORSKICH

2016-2023r.

Promotor pomocniczy pracy doktorskiej: ***Badanie mikrobioty jelita u ludzi oraz u szczurów przy użyciu sekwencjonowania generacji (next-generation sequencing) wspartych analizą metagenomiczną***

Studentka studiów doktoranckich - Marta Grochowska
Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Marek Radkowski
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2023r.

Promotor pracy magisterskiej: ***Ocena parametrów immunologicznych u samobójców na podstawie analizy***

ekspresji genów w płacie czołowym mózgu z wykorzystaniem reakcji real-time PCR

Studentka analityki medycznej - Magda Molenda
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2022r. Promotor pracy magisterskiej: **Identyfikacja regionu niekodującego wirusa Torque Teno (TTV) w płacie skroniowym człowieka przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)**
Studentka analityki medycznej - Gabriela Jarska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2022r. Promotor pracy magisterskiej: **Zastosowanie metagenomiki do identyfikacji czynników wirusowych wywołujących zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych**
Studentka analityki medycznej - Zuzanna Buczkowska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2021r. Promotor pracy magisterskiej: **Oznaczenie przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi Torque Teno (IgM-TTV i IgG-TTV) w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy krwi u pacjentów z zapaleniem mózgu**
Studentka analityki medycznej - Karolina Bakuła
Warszawski Uniwersytet Medyczny

2020r. Promotor pracy magisterskiej: **Określenie dynamiki zmian wirerii wirusa Torque Teno (TTV) w surowicy krwi biorców nerki przed i po przeszczepieniu narządu**
Studentka analityki medycznej - Monika Malangiewicz
Warszawski Uniwersytet Medyczny

3) DZIAŁALNOŚĆ POPULARYZATORSKA – WYSTĄPIENIA PUBLICZNE ORAZ DONIESIENIA USTNE I PLAKATOWE NA KONFERENCJACH

a) Wystąpienia publiczne

2016r. Wykład w ramach kursu AKP/30/2016 „**Nowe wyzwania w diagnostyce chorób zakaźnych i pasożytniczych**” dla lekarzy organizowanego na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

2015r. Wystąpienie popularyzujące naukę o zasięgu ogólnopolskim (materiały internetowe obecne w serwisie Youtube) dotyczące metagenomiki oraz stwardnienia rozsianego w ramach Konkursu Popularyzatorskiego INTER (Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej).

b) Doniesienia ustne i plakatowe na konferencjach

- 2022r.** 26th Congress of the Polish Parasitological Society
Prezentacja ustna: ***Toxoplasma gondii and Borrelia burgdorferi s.l. in patients with encephalitis***
Pawełczyk A, Perlejewski K, Kurowicka M, Makowiecki M, Paciorek M, Radkowski M, Laskus T, Welc-Falęciak R.
Olsztyn, Polska
- 2022r.** 15th International Congress of Parasitology (ICOPA 2022)
Sesja posterowa: ***Risk of transmission of borrelia burgdorferi sensu lato from ixodes ricinus ticks to humans***
Pawełczyk A, Koczawska J, Zdzienicka O, Perlejewski K, Welc-Falęciak R.
Kopenhaga, Dania
- 2021r.** V Ogólnopolska Konferencja Naukowa Choroby zakaźne i pasożytnicze człowieka: problem współczesnego społeczeństwa
Prezentacja ustna: ***Wykorzystanie metagenomiki w diagnostyce wirusowego zapalenia mózgu: perspektywy kliniczne, wyzwania oraz przykłady zastosowania***
Perlejewski K, Laskus T, Radkowski M.
Lublin, Polska
- 2014r.** Konferencja Naukowa NEUROINFEKcje
Sesja posterowa: ***Wykorzystanie metagenomiki w diagnostyce wirusowego zapalenia mózgu: perspektywy kliniczne, wyzwania oraz przykłady zastosowania***
Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Popiel M, Stokowy T, Nakamura S, Motooka D, Lipowski D, PollakA, Lechowicz U, Caraballo Cortès K, Pawełczyk A, Laskus T, Radkowski M.
Białowieża, Polska
- 2013r.** Konferencja: Positive Strand RNA Viruses
Sesja posterowa: ***Deep Sequencing of Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 in Patients Treated with Pegylated Interferon Alpha and Ribavirin***
Caraballo Cortès K, Zagordi O, Ploski R, Perlejewski K, Radkowski M.
Boston, USA
- 2013r.** XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych
Sesja posterowa: ***Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the serum of seronegative patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL)***
Pawełczyk A, Caraballo Cortès K, Kaźmierczak J, Bukowska-Ośko I, Perlejewski K, Fic M, Radkowski M.
Wrocław, Polska

2012r. 8th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists
Prezentacja ustna: ***Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV) exposure on cytokine mRNA expression levels in macrophages in vitro***
Siernicka M, Ciezar Z, Kucharska T, Maroszek K, Pacek M, Pająk P, Rużycka M, Słowińska N, Stachowiak N, Kaźmierczak J, Kubisa N, **Perlejewski K**, Caraballo Cortès K.
Warszawa, Polska

2011r. 7th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists
Prezentacja ustna: ***mRNA Cytokine Profiles in Monocytes from Chronic Hepatitis C Virus-infected Patients: Effect of Virus Persistence***
Perlejewski K, Skowronska B, Sota J, Zychowska M, Pajak P, Maroszek K, Osinska J, Kucharska T, Machura P, Jozwicka E, Osinska A, Caraballo Cortes K, Radkowski M.
Warszawa, Polska

4) Nagrody i stypendia

2021r. Nagroda naukowa Rektora WUM (zespołowa, trzeciego stopnia) za opracowanie protokołu metagenomicznego do identyfikacji patogenów wywołujących zapalenie mózgu.

2020r. Nagroda naukowa Rektora WUM (zespołowa, trzeciego stopnia) za publikację wykazującą wpływ tiometyloaminy i jej tlenku na czynność komórek mięśni gładkich oraz zmian związanych ze starzeniem.

2019r. Nagroda naukowa Rektora WUM pierwszego stopnia za publikację dotyczącą badania zmienności genetycznej ludzkiego pegiwirusa w ośrodkowym układzie nerwowym.

2017r. Nagroda naukowa Rektora WUM trzeciego stopnie za współautorstwo pracy pt. *Spouse-to-Spouse Transmission and Evolution of Hypervariable Region 1 and 5' Untranslated Region of Hepatitis C Virus Analyzed by Next-Generation Sequencing.*

2014r. Główna nagroda w Konkursie Popularyzatorskim INTER (3 edycja) w ramach projektu SKILLS (Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej).

2012r. Laureat głównej nagrody (I miejsce) konkursu prac magisterskich na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego na kierunku Analityka Medyczna.

VIII. Pozostałe informacje

1) Realizowane granty i projekty naukowe:

- 2018-2023r.** Badacz w projekcie: **Zastosowanie metagenomiki w identyfikacji czynników zakaźnych u chorych z zapaleniem mózgu i zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych**
Finansowanie: Narodowe Centrum Nauki
Kierownik projektu: prof. dr hab. Tomasz Laskus
Numer umowy o dofinansowanie:
UMO-2017/25/B/NZ6/01463
- 2017-2018r.** Kierownik projektu Młodego Badacza: **Zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych (metagenomika) do diagnostyki zapaleń mózgu o nieznannej etiologii, z uwzględnieniem autoimmunologicznego zapalenia mózgu**
Finansowanie: Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 2016-2017r.** Kierownik projektu Młodego Badacza: **Wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do wykrywania potencjalnych patogenów indukujących stwardnienie rozsiane**
Finansowanie: Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 2014-2015r.** Kierownik projektu: **67/UD/SKILLS/2014 (Jeśli oni tam są, to zapewne już o nas wiemy – wykorzystanie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do wykrywania potencjalnych patogenów indukujących stwardnienie rozsiane (SM)**
Finansowanie: Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej

2) Analiza bibliometryczna wykonana przez Bibliotekę Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego:

	PRZED DOKTORATEM		PO DOKTORACIE	
	IF	MEiN	IF	MEiN
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	20,149	255	98,489	2020
Opisy przypadków	-	-	-	-
Prace poglądowe	-	-	9,264	240
RAZEM	20,149	255	107,753	2260

łącznie (przed i po doktoracie): 36 prac (34 prace oryginalne; 2 prace przeglądowe).

IF = 127,902

MEiN = 2515

Współczynnik Hirscha: 11 (Web of Science); 12 (Scopus).