

Autoreferat

dr n. farm. Beata Kaleta

Zakład Immunologii Klinicznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa, 3.06.2020 roku

1. Imię i nazwisko: Beata Kaleta

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2009 r. *Dyplom magistra farmacji*

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Tytuł pracy magisterskiej: „Polimorfizm *FokI* genu kodującego receptor VDR
u pacjentów ze stłuszczeniem i marskością wątroby”.

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Jacek Łukaszkiwicz

2013 r. *Stopień doktora nauk farmaceutycznych*

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Polimorfizm receptora witaminy D i receptora
TLR4 u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym, otyłością
olbrzymią i osteoporozą”.

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Jacek Łukaszkiwicz

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

2012 r. – 2013 r. Asystent, Zakład Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

2013 r. – obecnie Adiunkt, Zakład Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego.

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

A. Tytuł osiągnięcia naukowego

Cykl 6 publikacji (4 prac oryginalnych i 2 poglądowych) zebranych pod zbiorczym tytułem:

Rola osteopontyny i polimorfizmu jej genu jako wskaźnika diagnostycznego i predykcyjnego wybranych stanów patologicznych

Sumaryczny Impact Factor cyklu: 16,641 (w tym dla prac oryginalnych 10,404)

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu: 350 (w tym dla prac oryginalnych 255)

B. Publikacje wchodzące w skład cyklu

1. Kaleta B [autor korespondencyjny]. The role of osteopontin in kidney diseases. *Inflamm Res* 2019; 68(2): 93-102.
IF = 3,061; MNiSW = 70
2. Kaleta B [autor korespondencyjny], Krata N, Zagożdżon R, Mucha KJ. Osteopontin gene polymorphism and urinary OPN excretion in patients with Immunoglobulin A nephropathy. *Cells* 2019; 8(6): 1-10.
IF = 5,656; MNiSW = 140
3. Kaleta B [autor korespondencyjny]. Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp* 2014; 62(6): 475-482.
IF = 3,176; MNiSW = 25
4. Kaleta B [autor korespondencyjny], Mróz P, Górski A, Łukaszewicz J, Woźniacka A, Bogaczewicz J. The preliminary association study of osteopontin 707 C/T polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Polish population. *Adv Dermatol Allergol* 2020; 37(2): 190-194.
IF = 1,757; MNiSW = 70
5. Kaleta B [autor korespondencyjny]. Osteopontin enhances donor-specific alloreactivity of human peripheral blood mononuclear cells. *J Pre Clin Clin Res* 2019; 13(3): 106-109.
MNiSW = 20

6. Kaleta B [autor korespondencyjny], Boguska A. Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, downregulates osteopontin in human peripheral blood mononuclear cells. *Arch Immunol Ther Exp* 2017; 65(4): 347-353.

IF = 2,991; MNiSW = 25

Uzupełnieniem cyklu prac, stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest rozdział w monografii: Kaleta B. „Osteopontin (OPN) Gene Polymorphisms and Autoimmune Diseases”. *Genetic polymorphisms* (s. 75-96). IntechOpen, 2017.

C. Omówienie celu naukowego w/w prac, uzyskanych wyników wraz z omówieniem praktycznych implikacji przeprowadzonych analiz.

Cykl publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest rezultatem moich badań prowadzonych w Zakładzie Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

WPROWADZENIE

Osteopontyna (OPN), znana również jako wydzielana fosfoproteina typu 1 (SPP-1, ang. secreted phosphoprotein 1) lub białko wczesnej aktywacji limfocytów T-1 (Eta-1, ang. early T lymphocyte activation-1 protein), należy do rodziny glikoprotein niekolagenowych macierzy (SIBLING, ang. small integrin binding ligand N-glycosylated) [Fisher i wsp. 2001]. Jej ekspresja ma miejsce w komórkach tkanki kostnej, układu immunologicznego, mięśni gładkich, neuronach, komórkach skóry, nerek i wielu innych [Subraman i wsp. 2015]. OPN jest ponadto wydzielana do płynów ustrojowych, m.in. mleka, nasienia, moczu i żółci [Fisher i wsp. 2001]. Białko to jako fizjologiczny składnik tkanki kostnej odpowiada za procesy mineralizacji i resorpcji [Reinholt i wsp. 1990] ale od momentu pierwotnego opisanie w 1979 roku [Senger i wsp.] przedstawiono wyniki licznych prac, które wykazały iż rola OPN wykracza poza funkcję regulatora metabolizmu kostnego. Potwierdzono, iż glikoproteina ta wpływa na procesy migracji i aktywacji makrofagów oraz ich zdolność do fagocytozy, jest czynnikiem chemotaktycznym dla neutrofilii i komórek dendrytycznych oraz reguluje procesy

aktywacji limfocytów T i B [Ashkar i wsp. 2000; Icer i Gezmen-Karadag, 2018]. Ponadto wiele danych wskazuje na to, iż OPN odgrywa kluczową rolę w procesie apoptozy i angiogenezy [Fisher i wsp. 2001]. Zwiększenie ekspresji OPN obserwowano w przebiegu chorób nowotworowych, alergicznych i chorób układu krążenia [Rangaswami i wsp. 2006; Scatena i wsp. 2007; Cho i wsp. 2009]. Co więcej, wyniki analiz przeprowadzonych na zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych sugerują, iż OPN może mieć wpływ na patogenezę tych schorzeń [Clemente i wsp. 2016]. Chociaż OPN została zidentyfikowana ponad 40 lat temu, a wiedza na temat jej immunomodulacyjnych właściwości ciągle się poszerza, niewielka ilość badań przeprowadzonych u ludzi oraz często odmienne rezultaty tych prac nie pozwalają na jednoznaczną ocenę roli tego białka w patogenezie chorób autoimmunologicznych.

OPN jest kodowana przez gen *SPP1*, który zlokalizowano na chromosomie 4 (4q21-4q25). Dotychczas zidentyfikowano i opisano kilka jego wariantów polimorficznych, które w zależności od miejsca występowania w strukturze genu mogą mieć wpływ na jego aktywność transkrypcyjną lub na stabilność mRNA, a w efekcie na poziom ekspresji białka OPN [Chiu i wsp. 2012; Comi i wsp. 2012]. Analiza polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) została zaproponowana jako narzędzie do identyfikacji genów związanych z patogenezą, przebiegiem klinicznym oraz skutecznością terapii licznych schorzeń. Badania asocjacji genetycznych sugerują, że polimorfizmy genu *SPP1* mogą służyć jako potencjalne markery predykcyjne wybranych chorób [Niino i wsp. 2003; Glas i wsp. 2011; Chiu i wsp. 2012; Gazal i wsp. 2015; Clemente i wsp. 2016], niestety obecnie brakuje danych dotyczących takich analiz przeprowadzonych w populacji polskiej.

Badania nad immunomodulacyjnym działaniem OPN oraz poznanie roli polimorfizmów genu *SPP1* w chorobach autoimmunologicznych i zapalnych umożliwią lepsze zdefiniowanie tego białka jako potencjalnego markera prognostycznego, diagnostycznego i terapeutycznego. Analizy prowadzone przeze mnie oraz uzyskane rezultaty badań, które przedstawiam jako moje główne osiągnięcie naukowe wpisują się w powyższy nurt.

SZCZEGÓLWE OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

- **Pierwsza publikacja: „The role of osteopontin in kidney diseases”**

Cykl prac otwiera opracowanie, które przeprowadza analizę dostępnej literatury dotyczącej roli OPN oraz wariantów polimorficznych genu kodującego to białko (*SPPI*) w fizjologii nerek oraz w patogenezie schorzeń tego narządu.

Jak wykazały liczne badania, w warunkach fizjologicznych OPN jest niezbędna w procesie prawidłowej tubulogenezy. Obserwowano, iż w przypadku gdy aktywność tego białka zostaje zablokowana, kanaliki nie rozwijają się normalnie i wykazują zwiększoną apoptozę. Liczne prace dostarczyły również informacji na temat roli OPN rozwoju kamicy nerkowej, choć wielu badaczy uzyskało przeciwne rezultaty. Część analiz wykazała, iż OPN hamuje tworzenie i wzrost kryształów szczawianu wapnia. Co więcej, w moczu u pacjentów z kamicą nerkową obserwowano niższe stężenia tej glikoproteiny niż u osób zdrowych. Stwierdzono ponadto, iż funkcjonalne polimorfizmy genu *SPPI* (związane z obniżoną ekspresją OPN) mogą predysponować do rozwoju kamicy nerkowej. Dlatego zaproponowano, iż genotypowanie *SPPI* wraz z oznaczeniem poziomu OPN w moczu może być pomocne w diagnostyce złogów w nerkach. W przeciwieństwie do powyższych raportów, część analiz wykazała, iż OPN nasila odkładanie i wzrost kryształów szczawianu wapnia.

Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, iż ekspresja OPN wzrasta w przebiegu chorób nerek, tj. cewkowo-śródmiąższowego i kłębuszkowego zapalenia nerek, ostrego niedokrwienego uszkodzenia nerek, śródmiąższowego zapalenia i zwłóknienia, wodonercza i wielu innych. Ponadto w modelach tych obserwowano związek podwyższonego poziomu OPN z nasilonym białkomoczem, zmniejszonym klirensiem kreatyniny, zwiększonym procesem włóknienia oraz infiltracji makrofagów i limfocytów T.

Nieliczne analizy sugerują, iż OPN może być markerem wybranych chorób nerek również u ludzi. Wykazano, iż białko to przez wpływ na aktywację metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej-2 i 3 (MMP2 i 3), urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPA), a także osłabienie apoptozy komórek nowotworowych i nasilenie tubulogenezy może przyczyniać się do kancerogenezy i tworzenia przerzutów. Analizowano również rolę OPN w patogenezie zmiany minimalnej (MCD, ang. minimal change disease) oraz w ogniskowym i segmentowym stwardnieniu kłębuszków nerkowych (FSGS, ang. focal and segmental glomerulosclerosis). Zaobserwowano, iż u chorych z MCD i FSGS poziom OPN w moczu

oraz ekspresja OPN w nerkach jest wyższa niż u osób zdrowych, ale późniejsze analizy nie potwierdziły w/w rezultatów. Określona została natomiast rola OPN w patogenezie nefropatii błoniastej (MGN, ang. membranous glomerulonephritis). Mimo, że ilość dostępnych danych w tym temacie jest skąpa, to analizy jednoznacznie wykazały nasiloną ekspresję OPN w nerkach pacjentów z MGN oraz jej korelację ze zwiększoną infiltracją makrofagów oraz limfocytów T o fenotypie CD4⁺ i CD8⁺. Badano również udział OPN w patogenezie nefropatii toczniowej (LN, ang. lupus nephritis) ale podobnie jak w przypadku MCD i FSGS prace te nie dostarczyły jednoznacznych rezultatów. Znaczna część opublikowanych danych wykazała, iż w moczu i surowicy pacjentów z LN występują wyższe stężenia OPN. Obserwowano ponadto związek wysokiej ekspresji OPN ze zmniejszonym współczynnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR), wyższą aktywnością choroby i nasiloną infiltracją makrofagów. Nieliczne opracowania sugerują również udział funkcjonalnych polimorfizmów genu *SPP1* (tj. rs1126616 i 9250 C/T) w rozwoju LN w niektórych grupach etnicznych. Zajmując się tematyką roli OPN w rozwoju chorób nerek nie sposób pominąć tematu nefropatii cukrzycowej. Badania przeprowadzone u pacjentów z cukrzycą typu 1 oraz 2 wykazały, iż podwyższony poziom OPN w surowicy krwi jest czynnikiem predykcyjnym uszkodzenia nerek w tej grupie chorych. Ponadto ostatnie analizy dowiodły związek polimorfizmów genu *SPP1* (rs11730582, rs17524488 i rs28357094) z nasiloną ekspresją OPN i zwiększonym ryzykiem rozwoju niewydolności nerek w przebiegu cukrzycy. Wykazano też, iż wzrost ekspresji OPN koreluje z nasileniem syntezy transformującego czynnika wzrostu beta-1 (TGF-β), który pełni istotną rolę w rozwoju i postępie nefropatii, będąc kluczowym mediatorem uszkodzenia podocytów oraz najważniejszym stymulatorem włóknienia. Istnieją również doniesienia sugerujące, iż OPN może mieć udział w rozwoju nefropatii IgA ale nieliczne badania dotyczące tego zagadnienia dały odmienne rezultaty. Część analiz wykazała, iż u pacjentów z nefropatią IgA dochodzi do nasilenia ekspresji OPN oraz jej receptora (CD44) w kanalikach nerkowych. Stwierdzono również, iż wzrost ten koreluje z większym naciekiem makrofagów i albuminurią. Inne prace nie wykazały różnic w poziomie ekspresji OPN w nerkach i stężeniem OPN w moczu u pacjentów z nefropatią IgA i w grupie osób zdrowych. Dane dotyczące udziału OPN w patogenezie nefropatii IgA są sprzeczne. Co więcej, dotychczas nie przeprowadzono analiz mających na celu poznanie związku polimorfizmów genu *SPP1* z rozwojem i przebiegiem klinicznym w/w schorzenia, dlatego celowe wydaje się kontynuowanie badań.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie poszukiwaniem nieinwazyjnych i wczesnych markerów monitorowania statusu immunologicznego biorców przeszczepu. W

kontekście transplantacji nerek jednym z analizowanych markerów była OPN. Stwierdzono występowanie podwyższonego poziomu tego białka podczas epizodów ostrego odrzucania nerki. Obserwowano również, iż podwyższenie stężenia OPN w surowicy wiąże się z niższym prawdopodobieństwem przeżycia pacjentów po przeszczepie.

Opracowanie zgłaszane w obecnym cyklu przeprowadza analizę dostępnej literatury dotyczącej roli OPN i polimorfizmów jej genu w patogenezie chorób nerek. Praca ta stanowi ważny wkład w usystematyzowanie wiedzy i debatę nad w/w zagadnieniami. Mimo, iż część dostępnych danych wskazuje na potencjalny udział OPN w rozwoju niewydolności nerek, to stosunkowo niewielka ilość badań oraz ich niejednoznaczne rezultaty sugerują konieczność kontynuacji analiz. Prace takie pomogą stwierdzić czy OPN może być wartościowym markerem prognostycznym i terapeutycznym zaburzeń czynności nerek.

- **Druga publikacja: „Osteopontin gene polymorphism and urinary OPN excretion in patients with Immunoglobulin A nephropathy”**

Przegląd literatury dotyczącej udziału OPN w patogenezie chorób nerek wykazał, iż rola polimorfizmów genu *SPP1* w rozwoju nefropatii IgA nie była dotychczas analizowana. Ponadto nie jest jasne czy polimorfizmy w/w genu wpływają na poziom OPN wydzielanej do moczu oraz rzutują na przebieg kliniczny choroby. Skłoniło mnie to do zaplanowania badań, których celem było oznaczenie czterech wariantów polimorficznych genu *SPP1* oraz stężenia OPN (tzw. OPN o pełnej długości, niemodyfikowana, full-length) w moczu pacjentów z nefropatią IgA oraz w grupie kontrolnej. Szczegółowe metodologiczne cele badania obejmowały:

- izolację genomowego DNA z krwi 58 pacjentów z nefropatią IgA (potwierdzoną w trakcie biopsji wykonanej w Klinice Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz 184 zdrowych ochotników (niespokrewnionych z pacjentami, dobranych do nich pod względem wieku, płci i rasy);
- analizę częstości występowania genotypów/alleli czterech wariantów polimorficznych genu *SPP1*: rs1126616, rs1126772, rs9138 i rs7687316/rs3841116 w w/w grupach (z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym z użyciem sond typu SimpleProbe i detekcją temperatury topnienia). Selekcji w/w polimorfizmów dokonano na podstawie analizy częstości występowania allelu recesywnego MIF (ang. minor allele frequency). Polimorfizmy rs1126616, rs1126772 i rs9138 mają MIF > 5% u rasy kaukaskiej. Natomiast polimorfizm rs7687316 (określany też jako rs3841116) razem z w/w wariantami

był opisywany w literaturze jako zmiana mająca udział w patogenezie niektórych chorób autoimmunologicznych;

- analizę związku poszczególnych genotypów/alleli badanych polimorfizmów z poziomem kreatyniny w surowicy krwi, współczynnikiem filtracji kłębuszkowej (GFR), poziomem hemoglobiny oraz białka całkowitego w dobowej zbiórce moczu;
- analizę wpływu występowania poszczególnych genotypów *SPP1* na poziom OPN wydalaną do moczu u pacjentów z IgAN;
- określenie różnic w ilości OPN wydzielanej do moczu pacjentów z nefropatią IgA oraz osób zdrowych metodą immunoenzymatyczną.

Analiza częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs1126616 wykazała, iż homozygota recesywna (mutant, TT) oraz allel T występowały istotnie częściej w grupie chorych z nefropatią IgA niż w grupie kontrolnej (odpowiednio $p = 0,0217$ i $p = 0,0531$). Warianty recesywne były ponadto związane z wyższym poziomem OPN w moczu u osób chorych. Wynik analizy częstości występowania genotypów i alleli rs9138 również skłania do wniosku, iż polimorfizm ten może mieć związek z rozwojem nefropatii IgA. Homozygota recesywna (CC) oraz allel C występowały istotnie częściej w grupie pacjentów z IgAN niż w grupie osób zdrowych (odpowiednio $p = 0,0425$ i $p = 0,0112$). Co więcej, wykazano, iż warianty recesywne korelowały z wyższym stężeniem OPN w moczu osób chorych. W niniejszej pracy wykonano również genotypowanie rs1126772 oraz rs7687316 ale nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli w obu badanych grupach ($p > 0,05$), co sugeruje, że w/w polimorfizmy nie są związane z ryzykiem rozwoju nefropatii IgA. Nie zaobserwowano ponadto związku badanych polimorfizmów z poziomem kreatyniny w surowicy, GFR, poziomem hemoglobiny oraz białka całkowitego w dobowej zbiórce moczu. W omawianej pracy dowiedziono, iż średnie stężenie OPN w moczu pacjentów z IgAN jest wyższe o ok. 58% niż w grupie kontrolnej (1,14 ng/ml vs. 0,72 ng/ml), jednak różnice te nie były istotne statystycznie ($p = 0,1185$) i wykazały jedynie pozytywny trend.

Nowatorski charakter badania polegał na tym, iż była to pierwsza praca opublikowana w piśmiennictwie światowym, w której analizowano częstość występowania wariantów polimorficznych genu *SPP1* u pacjentów z nefropatią IgA oraz ich związek z poziomem OPN w moczu i parametrami klinicznymi choroby.

Podsumowując, w pracy tej wykazano, iż dwa funkcjonalne polimorfizmy genu *SPP1*: rs1126616 oraz rs9138 mają wpływ na ilość OPN wydzielanej do moczu oraz mogą mieć

związek ze zwiększonym ryzykiem występowania nefropatii IgA. Uzyskane wyniki skłaniają do wniosku, iż genotypowanie rs1126616 i rs9138 wraz z oznaczeniem poziomu OPN w moczu może być pomocne w ocenie ryzyka występowania choroby.

- **Trzecia publikacja: „Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus”**

W publikacji nr 3 zgłaszanej w obecnym cyklu podsumowano badania dotyczące udziału OPN w patogenezie mysiego modelu tocznia rumieniowatego układowego (SLE, ang. systemic lupus erythematosus) oraz w rozwoju tego schorzenia u ludzi. Wyniki licznych badań zapoczątkowanych pod koniec lat 90-tych XX wieku i wykonanych z użyciem modelu MLR/lpr (ang. Murphy Roths Large Lymphoproliferative Mouse) wykazały nasiloną ekspresję OPN, istotnie korelującą ze zwiększoną aktywacją limfocytów B, wzrostem produkcji przeciwciał klasy IgG i IgM oraz autoprzeciwciał (w tym anty-ds-DNA). Potwierdzono ponadto, iż wzrost ekspresji OPN korelował ze zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych, tj. TNF- α , IFN- γ i IL-1 β . Późniejsze analizy wykazały, iż u myszy z wyłączonym genem OPN (Opn-knockout) brak wytwarzania OPN przyczyniał się do obniżenia syntezy IFN- γ przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne. Kolejne badania wykazały, iż podwyższony poziom OPN w surowicy myszy MLR/lpr był związany z większym ryzykiem uszkodzenia nerek.

Dane literaturowe wskazują, iż OPN może mieć również udział w patogenezie SLE u ludzi. Już pierwsze analizy przeprowadzone w roku 1995 wykazały, iż poziom OPN w surowicy pacjentów z SLE jest znacząco wyższy niż u osób zdrowych. Kolejne badania wykazały związek OPN z nasiloną aktywnością choroby ocenianą z użyciem skali SLEDAI (ang. SLE Disease Activity Index), a także ze wzrostem syntezy IL-18, która z kolei indukuje produkcję IFN- α i nasilenie odpowiedzi komórkowej Th1. Badania dotyczące wpływu wariantów polimorficznych genu *SPPI* na patogenezę oraz przebieg kliniczny tocznia nie dostarczyły tak jednoznacznych rezultatów. Genotypowanie *SPPI* wykonane w populacji włoskiej wykazały, iż polimorfizm rs1126616 jest związany z częstszym występowaniem zakażeń oportunistycznych i niewydolności nerek u pacjentów z SLE. Późniejsze analizy w tej populacji dowiodły, iż dwa inne polimorfizmy (rs7687316 i rs9138) są związane z ryzykiem rozwoju tocznia i występowaniem limfadenopatii. Podobne badania wykonane w populacji chińskiej dowiodły natomiast, że polimorfizm rs1126616 jest związany ze zwiększonym ryzykiem uszkodzenia nerek w przebiegu SLE. Część opublikowanych danych wskazuje, iż warianty rs1126616 i rs9138 są związane z większym ryzykiem SLE ale tylko u

mężczyzn. Inne prace dowiodły natomiast iż w/w polimorfizmy nie mają związku z patogenezą choroby ale zwiększają ryzyko wystąpienia wysypki światłoczułej i uszkodzenia skóry.

Podsumowując, wiele danych wskazuje na to, że OPN jest białkiem, które pełni istotną rolę w patogenezie SLE. Niestety związek polimorfizmów genu *SPP1* z rozwojem i przebiegiem choroby jest nadal słabo poznany, a wiele prac dało rozbieżne rezultaty. Dlatego konieczne wydaje się kontynuowanie badań w celu stwierdzenia czy oznaczenie poziomu OPN oraz genotypowanie *SPP1* mogą być wykorzystywane w ocenie ryzyka rozwoju SLE oraz wpływu na aktywność choroby.

- **Czwarta publikacja: „The preliminary association study of osteopontin 707 C/T polymorphism with systemic lupus erythematosus in a Polish population.**

Celem niniejszej pracy było określenie częstości występowania wariantów polimorficznych rs1126616 (inaczej określanym jako 707 C/T) genu *SPP1* w populacji polskiej, zarówno w grupie osób zdrowych jak i pacjentów z SLE oraz ocena relacji między obecnością poszczególnych genotypów i alleli wariantu rs1126616 oraz aktywnością choroby. Do zaplanowania powyższych badań skłonił mnie fakt, iż tego typu analizy dotychczas nie zostały przeprowadzone w populacji polskiej. Dotychczasowe badania potwierdziły, iż polimorfizm rs1126616 wpływa na transkrypcję, składanie, transport mRNA do cytoplazmy oraz na translację białka OPN, dlatego założyłam, iż może mieć związek z patogenezą SLE. Szczegółowe metodologiczne cele badania obejmowały:

- izolację genomowego DNA z krwi 83 pacjentów z SLE (zdiagnozowanych w Klinice Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wg kryteriów American College of Rheumatology). U chorych rozpoznano chorobę, jeżeli zostało spełnione co najmniej 4 z 11 kryteriów w chwili badania lub w wywiadzie. Każdy chory został poddany szczegółowej ocenie klinicznej obejmującej badanie podstawowe i przedmiotowe.
- izolację genomowego DNA z krwi 100 ochotników stanowiących grupę kontrolną (bez historii chorób autoimmunologicznych, niespokrewnionych z pacjentami, dobranych do nich pod względem wieku, płci i rasy).
- analizę częstości występowania genotypów/alleli polimorfizmu rs1126616 (707 C/T) genu *SPP1* z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym i użyciem sond typu TaqMan;

– analizę wpływu poszczególnych genotypów w/w polimorfizmu na częstość występowania objawów klinicznych i parametrów laboratoryjnych, tj. wysypka malarowa, wysypka tarczowa, nadwrażliwość na światło słoneczne, owrzodzenia jamy ustnej, zapalenie stawów, zapalenie błon surowiczych, nefropatia, objawy neuropsychiatryczne, anemia hemolityczna, leukopenia, limfopenia, trombocytopenia, obecność przeciwciał (przeciw nukleosomom, anty-dsDNA, anty-Smith, anty-Ro/SSA, anty-La/SSB, anty-RNP, anty-His, ANA).

W grupie pacjentów z SLE wysypkę malarową stwierdzono u 45,8% badanych, wysypkę tarczową u 9,6% zaś nadwrażliwość na światło słoneczne u 32,5% chorych. Owrzodzenia jamy ustnej dotyczyły 14,5% chorych, zapalenie stawów obserwowano u 80,7%, zapalenie błon surowiczych u 6%. Nefropatię toczniową stwierdzono u 7,2% chorych, występowanie objawów neuropsychiatrycznych u 14,5% pacjentów. Anemię hemolityczną obserwowano u 16,9% chorych, leukopenię u 47%, limfopenię u 15,7%, zaś trombocytopenię u 27,7% pacjentów. U 10,8% chorych wykryto przeciwciała przeciw nukleosomom, przeciw dsDNA u 20,5% chorych, przeciw Smith u 14,5%, przeciw Ro/SSA u 41%, przeciw La/SSB u 36,1%, przeciw RNP u 14,5%, przeciw His u 25,3%, zaś przeciwciała typu ANA wykazano u 73,5% pacjentów.

W omawianej pracy wykazano, iż allel recesywny T polimorfizmu rs1126616 w modelu recesywnym (CT + TT vs. CC) występuje częściej w grupie pacjentów z SLE ($p = 0,037$; OR = 1,98; 95% CI = 1,08 - 3,61), co może wskazywać na jego związek ze zwiększonym ryzykiem choroby w polskiej populacji. W przeprowadzonych badaniach nie znaleziono natomiast statystycznie istotnych zależności wskazujących na powiązanie poszczególnych genotypów rs1126616 z częstością występowania poszczególnych objawów klinicznych choroby czy wartościami parametrów laboratoryjnych.

Podsumowując, w niniejszej pracy po raz pierwszy w populacji polskiej wykazano różnice w częstości występowania poszczególnych wariantów polimorfizmu rs1126616 u pacjentów z SLE i u osób zdrowych. Dane te wskazują na potencjalną rolę jaką w/w polimorfizm odgrywa w rozwoju choroby. Należy jednak pamiętać o dużej różnorodności czynników genetycznych zaangażowanych w patogenezę tocznia, dlatego celowe wydaje się kontynuowanie analiz. Umożliwi to pełniejsze zrozumienie podłoża choroby oraz będzie pomocne w tworzeniu genetycznych profili predysponujących do chorób autoimmunologicznych, w tym SLE.

- **Piąta publikacja: „Osteopontin enhances donor-specific alloreactivity of human peripheral blood mononuclear cells”.**

Zajmując się tematyką wpływu OPN na układ odpornościowy człowieka nie sposób pominąć kwestii jej roli w transplantologii. Choć liczne badania wskazują na to, iż białko to pełni istotną funkcję w regulacji układu immunologicznego, nie poznano dotychczas jej wpływu na patogenezę i przebieg jednego z najgroźniejszych powikłań po allogenicznym przeszczepie komórek krwiotwórczych (HSCT, ang. allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) jakim jest choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (GVHD, ang. graft-versus-host disease). Powikłanie to dotyczy nawet 60% pacjentów i jest główną przyczyną ich śmiertelności. GVHD występuje, gdy limfocyty T dawcy, w odpowiedzi na antygeny HLA (ang. Human Leukocyte Antigen) biorcy różnicują się w alloreaktywne komórki T, które migrują m.in. do skóry, wątroby i przewodu pokarmowego, powodując uszkodzenie tkanek.

Wiele danych wskazuje na wpływ OPN na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego. Ponadto u pacjentów po transplantacji nerki wykazano związek podwyższonego poziomu tego białka w surowicy i moczu ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia epizodu ostrego odrzucenia komórkowego. Mimo tego, dotychczas nie badano wpływu OPN na ludzkie limfocyty allogeniczne, a udział tego białka w patogenezie GVHD nie jest poznany. Skłoniło mnie to do zaplanowania analiz, których celem było zbadanie wpływu OPN na proliferację ludzkich komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC, ang. peripheral blood mononuclear cells) w mieszanej reakcji limfocytów (MLR, ang. mixed lymphocyte reaction). MLR jest jednym z testów *in vitro*, stosowanych do oceny ryzyka GVHD po HSCT. Indeks stymulacji (IS) reakcji MLR jest stosowany do oceny dopasowania dawcy i biorcy.

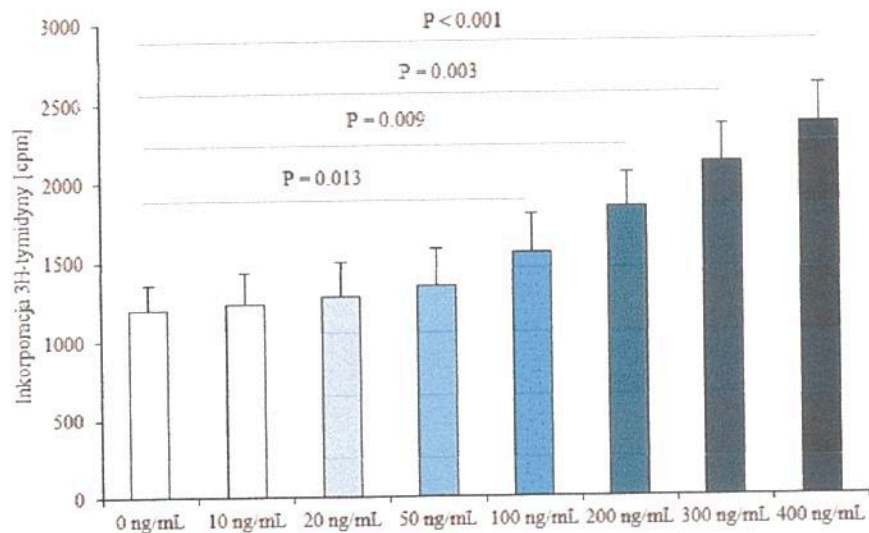
W badaniu wykorzystałam PBMC izolowane z krwi 20 zdrowych krwiodawców. Komórki każdego z dawców zostały podzielone na dwie grupy: (1) komórki odpowiadające (efektorowe) oraz (2) komórki stymulujące, których zdolność do proliferacji została zablokowana przez naświetlanie promieniowaniem gamma. Następnie założyłam hodowlę, w której komórki pochodzące od dwóch niespokrewnionych krwiodawców były inkubowane z dodatkiem ludzkiej rekombinowanej wolnej od endotoksyn OPN wg poniższego schematu:

XYir	YXir	OPN 0 ng/ml
XYir	YXir	OPN 10 ng/ml
XYir	YXir	OPN 20 ng/ml
XYir	YXir	OPN 50 ng/ml
XYir	YXir	OPN 100 ng/ml
XYir	YXir	OPN 200 ng/ml
XYir	YXir	OPN 300 ng/ml
XYir	YXir	OPN 500 ng/ml

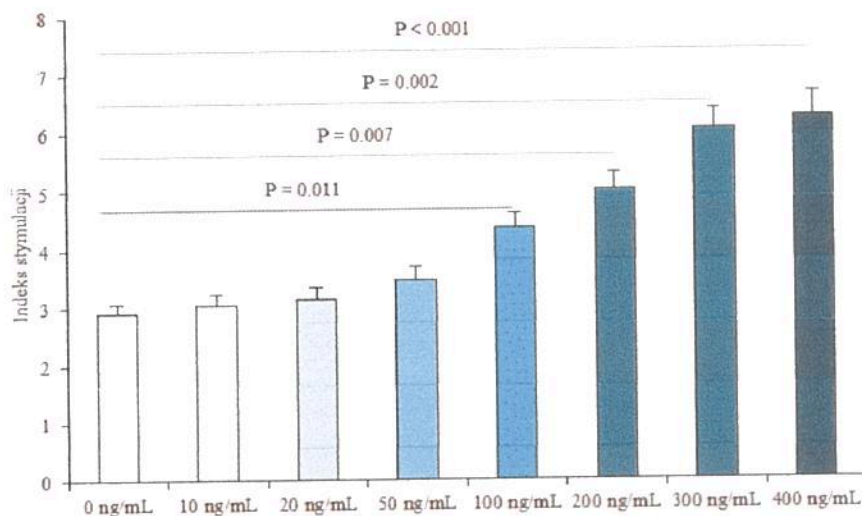
Gdzie: X – komórki efektorowe pierwszego dawcy, Yir – komórki stymulujące drugiego dawcy, Y – komórki efektorowe drugiego dawcy, Xir – komórki stymulujące pierwszego dawcy. Powyższy schemat zastosowano dla eksperymentów wykonanych na komórkach pochodzących od 20 krwiodawców.

Po inkubacji dzielące się komórki efektorowe wyznakowano tymidyną ($3,7 \times 10^{10}$ Bq). Ilość tymidyny wbudowanej do DNA proliferujących komórek mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego, podając poziom radioaktywności jako "skorygowaną liczbę impulsów na minutę" (cpm). Poziom radioaktywności wykorzystano do obliczenia IS reakcji MLR. Każdy eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach.

Powyższe badanie wykazało, iż OPN nasila odpowiedź proliferacyjną ludzkich limfocytów stymulowanych allogenicznie w reakcji MLR. Wzrost proliferacji obserwowano dla wszystkich testowanych stężeń OPN, jednak statystycznie istotne różnice występowały dla stężenia 100, 200, 300 i 400 ng/ml (odpowiednio $p = 0,013$; $p = 0,009$; $p = 0,003$ i $p < 0,001$) (Ryc. 1). Ponadto wykazano, iż OPN w w/w stężeniach zwiększała IS w sposób zależny od dawki (odpowiednio $p = 0,011$; $p = 0,007$; $p = 0,002$ i $p < 0,001$) (Ryc. 2). Żywotność hodowanych komórek oceniona z wykorzystaniem błękitu trypanu wynosiła średnio $96,6\% \pm 0,9\%$ (94% - 98%).



Rycina 1. Wpływ osteopontyny (OPN) na proliferację stymulowanych allogenicznie komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) w mieszanej reakcji limfocytów (MLR). Wyniki są przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD) z 20 eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach.



Rycina 2. Wpływ osteopontyny (OPN) na indeks stymulacji (IS) allogenicznej mieszanej reakcji limfocytów (MLR). Wyniki są przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD) z 20 eksperymentów przeprowadzonych w trzech powtórzeniach.

Nowatorski charakter badania polegał na tym, iż po raz pierwszy wykazano, iż OPN w sposób zależny od dawki nasila proliferację ludzkich limfocytów stymulowanych allogenicznie i w ten sposób może przyczyniać się do patogenezy i postępu GVHD. Wyniki

niniejszej pracy sugerują, iż oznaczenie poziomu OPN w surowicy pacjentów przed i po HSCT może być przydatne w ocenie ryzyka wystąpienia GVHD. Ponadto jest prawdopodobne, iż u pacjentów z GVHD w leczeniu choroby można zastosować pomocniczo przeciwciała anti-OPN. Niezbędne są jednak dalsze badania, które potwierdzą wartość OPN jako markera prognostycznego GVHD po HSCT.

- **Szósta publikacja: „Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, downregulates osteopontin in human peripheral blood mononuclear cells”.**

Liczne prace dowiodły, iż stan zapalny jest istotnym elementem patogenezы i przebiegu chorób autoimmunologicznych, nowotworowych, sercowo-naczyniowych i wielu innych. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na to, iż enzymy katalizujące hydrolytyczny rozkład diestrów fosforanowych, tzw. fosfodiesterazy (PDE, ang. phosphodiesterases), odgrywają znaczącą rolę w immunomodulacji, m.in. wpływają na produkcję cytokin pro- i przeciwzapalnych. Pojawiają się hipotezy wskazujące na możliwość wykorzystania leków selektywnie hamujących ich działanie w leczeniu schorzeń autoimmunologicznych i zapalnych. Jednym z takich leków jest sildenafil. Jest on selektywnym inhibitorem fosfodiesterazy typu 5 (PDE5) i kluczowym elementem kaskady sygnalizacyjnej cGMP-PKG (cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan/kinaza białkowa G), która odgrywa istotną rolę w regulacji aktywności wielu populacji komórek, w tym komórek układu immunologicznego. W chwili obecnej sildenafil jest zatwierdzony przez FDA (ang. Federal Drug Administration) do leczenia zaburzeń erekcji oraz w terapii tętniczego nadciśnienia płucnego ale prowadzone są liczne badania mające na celu znalezienie nowych wskazań terapeutycznych dla tego preparatu. Badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych sugerują, iż sildenafil może mieć działanie immunomodulacyjne. W Zakładzie Immunologii Klinicznej prowadzone są prace mające na celu określenie wpływu sildenafilu na komórki układu odpornościowego człowieka. W 2015 roku mój projekt badawczy pt. „Wpływ cytrynianu sildenafilu na produkcję osteopontyny (OPN) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka” otrzymał finansowanie Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Umożliwiło mi to przeprowadzenie analiz, których rezultaty opublikowałam w niniejszej pracy zgłaszanej w obecnym cyklu.

W badaniu wykorzystałam PBMC izolowane z krwi 16 krwiodawców (mężczyzn), którzy nie cierpieli na choroby przewlekłe, nie palili tytoniu i nie przyjmowali na żadnych leków (w

szczególności w okresie bezpośrednio poprzedzającym badania). W celu określenia wpływu sildenafilu na produkcję OPN ludzkie PBMC były hodowane w obecności cytrynianu sildenafilu w stężeniach 400 ng/ml i 4 µg/ml. Stężenia te zostały wybrane na podstawie farmakokinetyki leku (C_{max} i AUC, ang. Area Under the Curve). 400 ng/ml to średnie stężenie sildenafilu uzyskiwane w surowicy po pojedynczym podaniu doustnym dawki 100 mg. Stężenie 4 µg/ml (10-krotnie wyższe niż średnie stężenie terapeutyczne) zastosowałam do sprawdzenia potencjalnego toksycznego wpływu leku na PBMCs. Po 20-godzinnej inkubacji połowę wariantów hodowlanych stymulowałam octanem mirystynianu forbolu (PMA) i jonomycyną wg schematu:

PBMC	PBMC + sildenafil 400 ng/ml	PBMC + sildenafil 4 µg/ml	PBMC + PMA + jonomycyna	PBMC + sildenafil 400 ng/ml PMA + jonomycyna	PBMC + sildenafil 4 µg/ml PMA + jonomycyna
------	-----------------------------	---------------------------	-------------------------	--	--

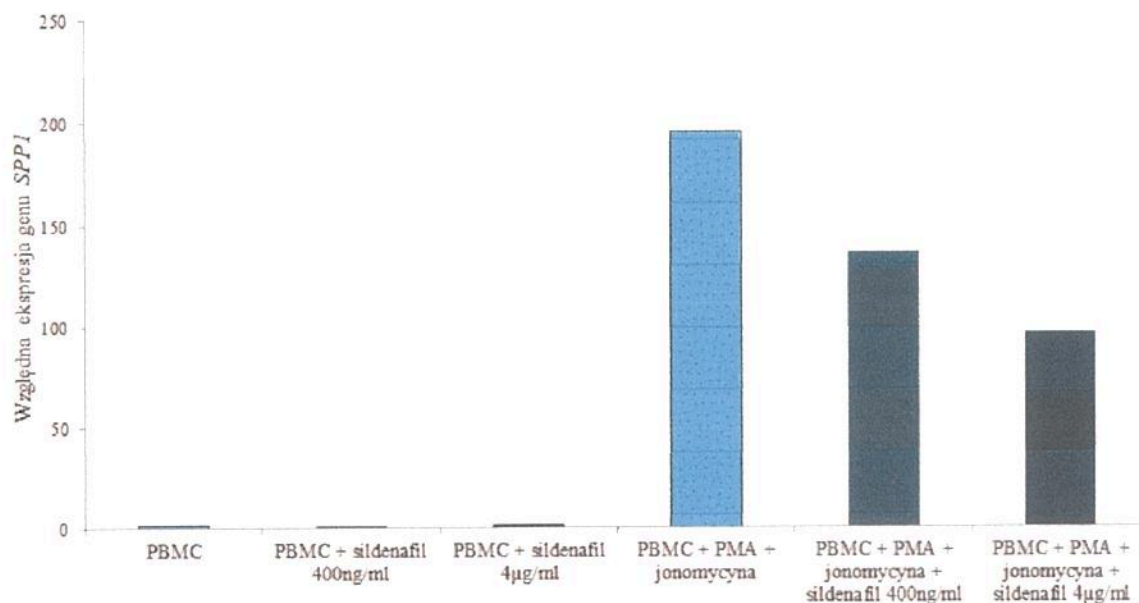
Stymulacja PMA i jonomycyną została zastosowana w celu umożliwienia obserwacji ewentualnego nasilenia jak i obniżenia syntezy OPN pod wpływem sildenafilu.

Po inkubacji supernatanty hodowlane wykorzystałam do oceny stężenia OPN metodą immunoenzymatyczną (ELISA). PBMC natomiast posłużyły do izolacji RNA i oznaczenia poziomu ekspresji genu *SPPI* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR, ang. real-time polymerase chain reaction) z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ znormalizowanej dla dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanowej (GAPDH).

W niniejszym badaniu wykazałam, iż stymulacja PBMC PMA i jonomycyną spowodowała istotny wzrost ekspresji genu *SPPI* ($p < 0,001$) oraz produkcji OPN ($p < 0,001$) przez te komórki, co potwierdziło iż zastosowany schemat analizy był poprawny i umożliwił obserwację zmian poziomu OPN po hodowli PBMC z sildenafilem.

Analiza wykazała, iż sildenafil istotnie zmniejsza ekspresję genu *SPPI*, przy czym efekt był wprost proporcjonalny do stężenia leku w hodowli (w stężeniu 4 µg/ml obserwowałam znaczące obniżenie ekspresji [$p < 0,05$], natomiast w stężeniu 400 ng/ml lek wykazywał tendencję statystyczną [$p = 0,06$]) (Ryc. 3 i Tab. 1). Analiza ilości OPN w supernatantach hodowlanych PBMC wykazała, iż podobnie jak w przypadku ekspresji genu, sildenafil w obu testowanych stężeniach obniżał syntezę OPN w stymulowanych PBMC ($p < 0,05$), przy czym wpływ ten był silniejszy dla stężenia 4 µg/ml. W przypadku hodowli, które nie były stymulowane PMA, zaobserwowanie takiego efektu nie było możliwe ze względu na wartości

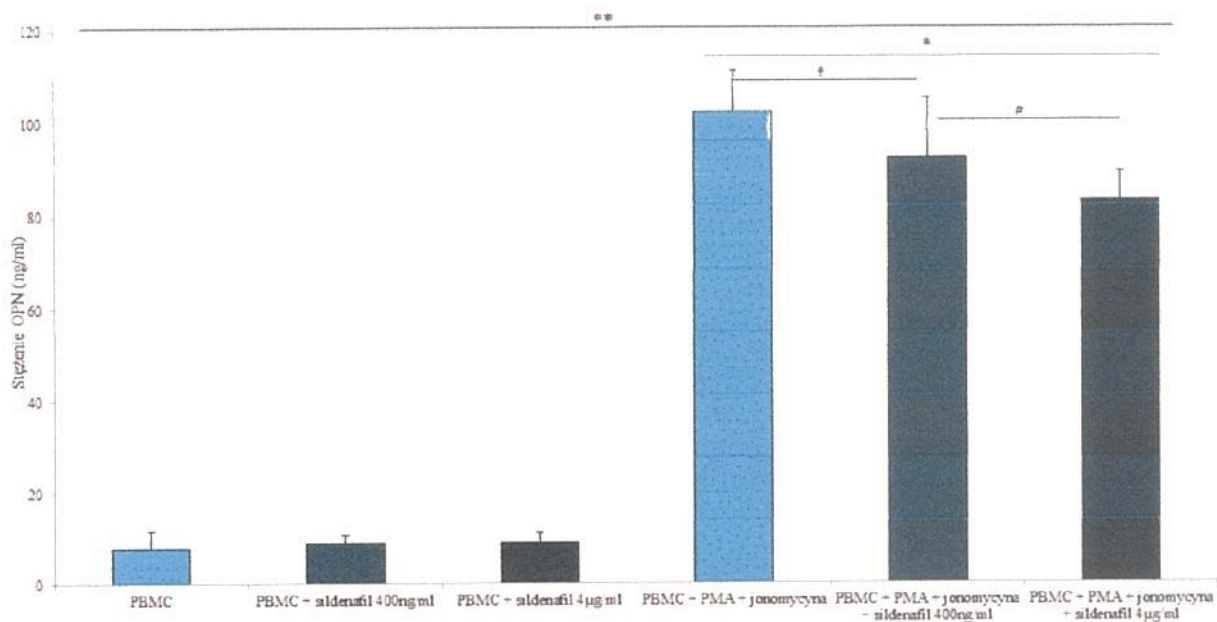
stężeń OPN poniżej progu wykrywalności testu (Ryc. 4). Żywołność hodowanych komórek oceniona z wykorzystaniem błękitu trypanu wynosiła średnio $98\% \pm 1,3\%$ (96% - 99%).



Rycina 3. Wpływ sildenafilu na względną ekspresję genu osteopontyny (SPP1) w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) określoną metodą PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki są przedstawione jako średnia z 16 eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach.

Tabela 1. ΔCt (średnia \pm odchylenie standardowe, SD) dla osteopontyny w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) określona metodą PCR w czasie rzeczywistym po inkubacji z sildenafiliem (z i bez stymulacji PMA i jonomycyną). Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$. *PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 4µg/ml vs. PBMC + PMA + jonomycyna. NS – różnice nieistotne statystycznie.

	$\Delta Ct \pm SD$	P
PBMC	$5,403 \pm 1,518$	
PBMC + sildenafil 400ng/ml	$5,379 \pm 1,008$	NS
PBMC + sildenafil 4µg/ml	$5,016 \pm 1,456$	NS
PBMC + PMA + jonomycyna	$-2,207 \pm 0,951$	
PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 400ng/ml	$-1,689 \pm 0,744$	0,06
PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 4µg/ml	$-1,187 \pm 1,267$	<0,05*



Rycina 4. Wpływ sildenafilu na produkcję osteopontyny (OPN) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMC). Wyniki przedstawiają średnie stężenie OPN w supernatantach hodowlanych. Różnice uznano za istotne statystycznie gdy $p < 0,05$. $**p < 0,001$ dla: warianty niestymulowane vs. warianty stymulowane PMA i jonomycyną; $^*p < 0,05$ dla PBMC + PMA + jonomycyna vs. PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 400 ng/ml; $^*p < 0,05$ dla: PBMC + PMA + jonomycyna vs. PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 4 µg/ml; $^{\#}p < 0,05$ dla PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 400 ng/ml vs. PBMC + PMA + jonomycyna + sildenafil 4 µg/ml. Wyniki są przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD) z 16 eksperymentów przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach.

Podsumowując, zgodnie z moją najlepszą wiedzą niniejsze badanie wykazało po raz pierwszy, iż sildenafil wpływa na obniżenie ekspresji genu *SPP1* oraz produkcję OPN przez stymulowane PMA ludzkie PBMC. PMA aktywuje kinazę białkową C (PKC, ang. protein kinase C) zależną od Ca^{2+} i fosfolipidów, która z kolei reguluje liczne procesy fizjologiczne oraz aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Zakładam, iż sildenafil przez zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu GMP przyczynia się do obniżenia stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie prowadząc do zmniejszenia aktywności PKC, a w konsekwencji NF- κ B, co przyczynia się do obniżenia produkcji OPN.

Pomimo faktu, iż publikowane dane wskazują to, że sildenafil ma właściwości immunomodulacyjne, konieczne są dalsze badania w celu ustalenia, czy lek ten wpływa na poziom cGMP i NF- κ B w PBMC. Ponadto istotna wydaje się ocena jego wpływu na PBMC pacjentów, u których obserwuje się stale podwyższony poziom OPN (np. w przebiegu cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych, niektórych chorób autoimmunologicznych i in.). Sildenafil jest lekiem często przepisywanym pacjentom starszym, u których naturalne

procesy starzenia przyczyniają się do osłabienia funkcji układu odpornościowego. Należy również pamiętać o współwystępowaniu wielu schorzeń oraz o politerapii stosowanej w tej grupie pacjentów. Dlatego istotne jest poznanie wpływu sildenafilu na komórki układu odpornościowego człowieka. Umożliwi to uniknięcie działań niepożądanych tego leku oraz potencjalnych interakcji z innymi preparatami.

Moje badania roli OPN oraz polimorfizmów jej genu w patogenezie i przebiegu wybranych schorzeń były poprzedzone napisaniem rozdziału pt. „**Osteopontin (OPN) Gene Polymorphisms and Autoimmune Diseases**” w monografii *Genetic polymorphisms*. Celem monografii było przedstawienie aktualnych danych na temat roli polimorfizmów w medycynie oraz ponowna ich ocena jako użytecznych markerów genetycznych. Rozdział którego jestem autorką był recenzowany, a ja zostałam zaproszona do jego napisania przez dr. Narasimha Reddy Parine, który jest jednym z czołowych badaczy zajmujących się molekularnymi mechanizmami progresji raka i chorób zapalnych.

Obecnie zidentyfikowano ponad 200 loci genetycznych związanych z rozwojem wielu schorzeń. Patogeneza chorób autoimmunologicznych jest złożona i wystąpienie choroby jest wynikiem kombinacji czynników środowiskowych i genetycznych, które prowadzą do wystąpienia nieprawidłowości immunologicznych. Niedawne badania asocjacyjne całego genomu (tzw. GWAS, ang. Genome-Wide Association Studies) oraz badania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) umożliwiły identyfikację wielu wariantów genetycznych związanych z chorobami autoimmunologicznymi. Polimorfizmy genetyczne mogą wpływać nie tylko na podatność na wystąpienie choroby i jej objawy kliniczne, ale również odpowiedź pacjenta na stosowaną terapię. Jak wspomniano wyżej, obecnie w kontekście chorób zapalnych i autoimmunologicznych bada się szerokie spektrum mediatorów wśród których znajduje się OPN i gen kodujący to białko.

W rozdziale, którego jestem autorką szczegółowo opisałam strukturę genu kodującego OPN oraz jego dotychczas zidentyfikowane polimorfizmy. Ponadto przedstawiłam aktualny stan wiedzy na temat udziału poszczególnych polimorfizmów genu *SPPI* w patogenezie toczenia rumieniowatego układowego, stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów, twardziny układowej, nieswoistych zapaleń jelit, cukrzycy typu 1, astmy oraz sarkoidozy. Opracowanie to stanowi ważny wkład w usystematyzowanie wiedzy na temat

funkcjonalnych implikacji poznanych dotychczas wariantów polimorficznych genu *SPP1* oraz ich udział w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym. Stanowi ponadto punkt wyjścia do dalszych badań nad w/w zagadnieniami.

PODSUMOWANIE ORAZ PRAKTYCZNE IMPLIKACJE PRZEPROWADZONYCH ANALIZ

Mniej lub bardziej specyficzne markery biologiczne, pomocne w diagnostyce wielu chorób przewlekłych, odgrywają istotną rolę w nowoczesnej medycynie. Są również ważne w ocenie prawdopodobieństwa wystąpienia tych schorzeń. Co więcej poszerzenie wiedzy na temat patomechanizmów chorób jest istotne, gdyż umożliwia tworzenie nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych (np. leki biologiczne, które blokują wybrane ścieżki immunologicznych).

Prace prowadzone przeze mnie wpisują się w powyższy nurt. OPN jest glikoproteiną biorącą udział w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Wiele danych wskazuje na to, iż białko to odgrywa istotną rolę w immunomodulacji. Ponadto wyniki analiz przeprowadzonych na zwierzęcych modelach wielu chorób, w tym autoimmunologicznych i nowotworowych, sugerują, iż OPN może mieć wpływ na patogenezę tych schorzeń. Badania nad immunomodulacyjnym działaniem OPN u ludzi oraz poznanie roli polimorfizmu genu *SPP1* umożliwią lepsze zdefiniowanie tego białka jako potencjalnego markera prognostycznego, diagnostycznego i terapeutycznego.

Warto podkreślić, iż wszystkie analizy oraz uzyskane rezultaty badań, które przedstawiam jako moje główne osiągnięcie naukowe, dotyczą zagadnień zupełnie nowych lub nieopisywanych dotychczas w populacji polskiej. Najistotniejsze wnioski przeprowadzonych prac można podsumować w następujący sposób:

- Stosunkowo niewielka ilość dostępnych danych dotyczących udziału OPN w rozwoju niewydolności nerek, sugeruje konieczność przeprowadzenia analiz, które pomogą stwierdzić czy białko to może być wartościowym markerem prognostycznym chorób nerek.
- Po raz pierwszy wykazano, iż część polskiej populacji jest nosicielami wariantów rs1126616 oraz rs9138 genu *SPP1*, które mogą zwiększać ryzyko rozwoju nefropatii IgA oraz wpływać na wydzielanie OPN do moczu. Uzyskane wyniki skłaniają do

wniosku, iż genotypowanie rs1126616 i rs9138 wraz z oznaczeniem poziomu OPN w moczu może być pomocniczo wykorzystywane w ocenie ryzyka wystąpienia choroby oraz w celu podejmowania wczesnych działań zapobiegających i ich większej personalizacji.

- Wiele danych wskazuje na to, iż OPN może mieć udział w patogenezie SLE ale związek polimorfizmów genu *SPP1* z rozwojem i aktywnością choroby jest nadal słabo poznany.
- Po raz pierwszy w populacji polskiej wykazano, iż warianty recesywne polimorfizmu rs1126616 genu *SPP1* występują częściej w grupie pacjentów z SLE ale nie mają związku z aktywnością choroby.
- OPN w sposób zależny od dawki nasila proliferację ludzkich limfocytów stymulowanych allogenicznie, co może przyczyniać się do patogenezy i postępu GVHD. Uzyskane wyniki skłaniają do wniosku, iż oznaczenie poziomu OPN w surowicy pacjentów przed i po HSCT może być przydatne w ocenie ryzyka wystąpienia GVHD.
- Po raz pierwszy wykazano, iż jednym z czynników, które istotnie wpływają na zmniejszenie poziomu ekspresji genu *SPP1* i produkcji OPN jest sildenafil.

CYTOWANA LITERATURA

- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. 2000; 287: 860-4.
- Chiu YW, Tu HF, Wang IK, et al. The implication of osteopontin (OPN) expression and genetic polymorphisms of OPN promoter in oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 2012; 46: 302-6.
- Cho HJ, Cho HJ, Kim HS. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep* 2009; 11: 206-13.
- Clemente N, Raineri D, Cappellano G, et al. Osteopontin Bridging Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res* 2016; 7675437.
- Comi C, Cappellano G, Chiochetti A, et al. The impact of osteopontin gene variations on multiple sclerosis development and progression. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 6.

- Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, et al. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 460-5.
- Gazal S, Sacre K, Allanore Y, et al. Identification of secreted phosphoprotein1 gene as a new rheumatoid arthritis susceptibility gene. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74: e19.
- Glas J, Seiderer J, Bayrle C, et al. The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn's disease. *PLoS One.* 2011; 6: e29309.
- Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018; 59: 17-24.
- Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, et al. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol.* 2003;136: 125-29.
- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: Role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 79-87.
- Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, et al. Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 4473-75.
- Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2302-09.
- Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 1979; 16: 885-93.
- Subraman V, Thiagarajan M, Malathi N, et al. OPN - Revisited. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: ZE10-13.

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

Opis aktywności naukowej (poza osiągnięciem, o którym mowa w art. 291 ust. 1 pkt. 2 Ustawy, opisanym w pkt. 4 autoreferatu):

A. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z jednostkami Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM)

- Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej (kierownik – prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło)

Od roku 2012 do chwili obecnej jestem członkinią grupy badawczej analizującej immunomodulacyjne właściwości polisacharydów pochodzenia grzybowego w ramach projektów: „Selenowane polisacharydy - badania nad biosyntezą i zależnością pomiędzy strukturą a aktywnością immunologiczną” (grant Narodowego Centrum Nauki nr 2013/09/B/NZ7/03978) oraz „Nowa wielkocząsteczkowa molekula pochodzenia naturalnego o selektywnej aktywności immunosupresyjnej” (grant na prowadzenie prac przedwdrożeniowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności +”, nr MNiSW/2017/DIR/71/IIt). Powyższe badania te są prowadzone we współpracy z Katedrą i Zakładem Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej. Wyniki dotychczasowych analiz zostały opublikowane w formie następujących prac oryginalnych:

- Kaleta B, Górski A, Zagożdżon R, Cieślak M, Kaźmierczak-Barańska J, Nawrot B, Klimaszewska M, Malinowska E, Górski S, Turło J. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes* - biological activity. *Carbohydr Polym* 2019; 223, 115078 (IF = 6,044)
- Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Turło J. Biological activity of selenium-enriched polysaccharide (Se-Le-30) isolated from *Lentinula edodes* mycelium in human immune cells. *Macromolecules* (IF = 5,997) (praca ukaze się pod koniec 2020 roku)

- *I Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii (kierownik – prof. dr hab. n. med. Mirosław Wielgoś)*

W latach 2014 – 2015 współpracowałam z I Katedrą i Kliniką Położnictwa i Ginekologii w zakresie badań nad immunomodulacyjnymi właściwościami komórek macierzystych i ich potencjalnymi możliwościami zastosowania w ginekologii i położnictwie. Wyniki prac prowadzonych w ramach projektu „Wpływ przedimplantacyjnego podania komórek macierzystych na leczenie niepłodności” (grant Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego nr 1W51/PM11D/14/14) zostały opublikowane w formie dwóch prac oryginalnych, których jestem współautorką:

- Dąbrowski F, Burdzińska AM, Kulesza A, Chlebus M, Kaleta B, Borysowski JJ, Zolocińska A, Pączek L, Wielgoś MZ. Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane and Umbilical Cord Can Diminish Immunological Response in an in vitro Allograft Model. *Gynecol Obstet Invest* 2017; 82 (3): 267-275 (IF = 1,183)
- Dąbrowski F, Burdzińska AM, Kulesza A, Kaleta B, Pączek L, Wielgoś MZ. Premature fetal tissues are possible source of valuable mesenchymal stem cells. *Ginekol Pol* 2017; 88 (4): 191-197 (IF = 0,621)

- *Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych (kierownik – prof. dr hab. n. med. Leszek Pączek)*

Od roku 2017 współpracuję z Kliniką Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych w zakresie badań mających na celu porównanie immunomodulacyjnych właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł oraz ich modyfikacje. Prace są prowadzone w ramach projektów: „Ocena wpływu czynnika indukowanego hipoksją 1 na immunomodulacyjne właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu (grant Narodowego Centrum Nauki nr 2017/25/B/NZ6/01380) oraz „Nowatorskie metody inżynierii tkankowej wspomagające gojenie i regenerację ścięgien i więzadeł” (grant Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Strategmed nr STRATEGMED1/233224/10/NCBR/2014). Dotychczasowe wyniki badań zostały opublikowane w pracy oryginalnej, której jestem współautorką:

- Zarychta-Wiśniewska W, Burdzińska AM, Kulesza A, Gala K, Kaleta B, Zielniok K, Siennicka K, Sabat MW, Pączek L. Bmp-12 activates tenogenic pathway in human

adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties. BMC Cell Biol 2017; 18 (1): 13 (IF = 2,769)

- *Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej (kierownik – prof. dr hab. n. farm. Grażyna Nowicka)*

W latach 2009 - 2014 współpracowałam z zespołem z Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej w ramach licznych prac związanych z analizą wariantów polimorficznych genu kodującego receptor witaminy D (VDR), receptor CD14 i receptor TLR4 w alkoholowym stłuszczeniu wątroby, w alkoholowej marskości wątroby, czy z poziomem impulsywności u pacjentów uzależnionych od alkoholu. Wyniki w/w analiz zostały przedstawione w następujących pracach:

- Wrzosek M, Jakubczyk AJ, Wrzosek M, Kaleta B, Łukaszkiwicz J, Matsumoto H, Brower K, Nowicka GJ, Wojnar M. Association between Fok I vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism and impulsivity in alcohol-dependent patients. Mol Biol Rep 2014; 41 (11): 7223-7228 (IF = 2,024)
- Kaleta B, Łukaszkiwicz J, Kubiak-Tomaszewska G, Tomaszewski P. Polimorfizm C-159T receptora CD14 i C-1196T jego koreceptora TLR4 u pacjentów z alkoholowym stłuszczeniem i alkoholową marskością wątroby. Post Nauk Med 2012; 25(3): 190-193

- *Katedra i Klinika Ortopedii i Traumatologii Narządów Ruchu (kierownik – prof. dr hab. med. Paweł Małyk)*

W roku 2017 uczestniczyłam w badaniach prowadzonych w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Narządów Ruchu. Prace te miały na celu ocenę potencjalnej roli progranuliny (PGRN) w mechanizmach leżących u podstaw patogenezy artropatii hemofilowej. Wyniki analizy zostały opublikowane w następującej pracy:

- Kotela A, Wojdasiewicz PD, Łęgosz P, Sarzyńska S, Drela K, Pulik Ł, Kaleta B, Kniotek MJ, Borysowski JJ, Poniatowski Ł, Kotela I. Increased serum levels of progranulin (PGRN) in patients with haemophilic arthropathy. Clin Exp Pharmacol Physiol 2019; 46(4): 373-379 (IF = 2,336)

- *Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii (kierownik – prof. dr hab. n. med. Paweł Piątkiewicz)*

W latach 2016-2018 współpracowałam z zespołem Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Diabetologii w celu oceny profilu cytokin w surowicy krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2 i współistniejącym rakiem jelita grubego. Współpraca zaowocowała prezentacją wyników na dwóch konferencjach: XVII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (5-7.05.2016, Kielce) i XIX Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (24-26.05.2018, Katowice) oraz powstaniem trzech prac oryginalnych:

- Bosek I, Sulich A, Rabijewski MS, Kaleta B, Kniotek MJ, Miłek TA, Piątkiewicz PJ. Levels of interleukin-2 in patients with colon cancer and diabetes type 2. *J Pre Clin Clin Res* 2016; 10(1): 1-5
- Bosek I, Kuczerowski R, Miłek TA, Sulich A, Kaleta B, Kniotek MJ, Piątkiewicz PJ. Evaluation of Interferon-Gamma in Patients with Type 2 Diabetes and Colorectal Cancer. *J Diabetes Metab* 2016; 7(1): 1-4
- Bosek I, Kuczerowski R, Miłek TA, Rabijewski MS, Kaleta B, Kniotek MJ, Ciostek PJ, Piątkiewicz PJ. The levels of interleukin-2 and interleukin-10 in patients with type 2 diabetes and colon cancer. *Clin Diabet* 2018; 7(2): 114-121

- *Zakład Immunologii (kierownik – prof. dr hab. n. med. Jakub Goląb)*

W roku 2019 wraz z zespołem Zakładu Immunologii badałam wpływ czynników immunomodulacyjnych na ludzkie limfocyty T regulatorowe (Treg). Wyniki naszych analiz zostały zaprezentowane w postaci plakatu na w konferencji „Polish Scientific Networks: Science & Medicine” (21-23.06.2018, Łódź) oraz opisane w pracy:

- „Comparative study of immunomodulatory agents to induce human T regulatory (Treg) cells: preferential Treg-stimulatory effect of prednisolone and rapamycin”. *Arch Immunol Ther Exp (IF = 2.878)* (praca ukaze się pod koniec 2020 roku).

B. Aktywność naukowa realizowana we współpracy z innymi niż WUM instytucjami naukowymi

- Wojskowy Instytut Medyczny, Klinika Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej

Od 2018 roku współpracuję z Kliniką Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej Wojskowego Instytutu Medycznego. Prowadzimy badania oceniające związek poziomu witaminy D, czynnika anti-Müllerowskiego (AMH) oraz wariantów polimorficznych genu receptora witaminy D i genu AMH i AMH2R z patogenezą i objawami klinicznymi zespołu policystycznych jajników. Wynikiem prowadzonych analiz są dwie prace oryginalne, których jestem współautorką:

- Dziech E, Szafarowska M, Kaleta B, Kniotek MJ, Jerzak M. Korelacja stężenia witaminy D3 i czynnika anti-Müllerowskiego (AMH) u pacjentek z zespołem policystycznych jajników. *Alergol Immun Współcz* 2018; 40: 35-44
- Szafarowska M, Dziech E, Kaleta B, Kniotek MJ, Rogowski A, Segiet-Święcicka A, Jerzak M. Anti-Müllerian hormone level is associated with vitamin D receptor polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36(6): 1281-1289 (IF = 2,820)

- Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Klinika Dermatologii i Wenerologii

Z Kliniką Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi jestem naukowo związana od 2011 roku, czyli jeszcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora. Współpracujemy w zakresie badań mających na celu ocenę przydatności oznaczania poziomu witaminy D oraz polimorfizmu genu kodującego receptor witaminy D u pacjentów z chorobami skóry, m.in. toczeniem rumieniowatym układowym i atopowym zapaleniem skóry. Wyniki badań zostały opublikowane w następujących pracach oryginalnych:

- Bogaczewicz J, Sysa-Jędrzejowska A, Łukaszewicz J, Kaleta B, Woźniacka A. Prevalence of vitamin D receptor gene Fok 1 polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus-a preliminary report. *Adv Dermatol Allergol* 2011; 28(5):368-371 (IF = 0,357)
- Bogaczewicz A, Sobow T, Bogaczewicz J, Kaleta B, Sysa-Jędrzejowska A, Robak E, Łukaszewicz J, Dariusz S, Woźniacka A. Toll-like receptor 4 gene polymorphism

1196 C/T does not influence the risk of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus in Polish population – a preliminary report. *Lupus* 2013; 22(14): 1504-1508 (IF = 2,481)

- Bogaczewicz J, Kaleta B, Sysa-Jedrzejowska A, Robak E, Łukaszewicz J, Sitkiewicz D, Wozniacka A. Vitamin D receptor gene polymorphism Fok I in the Polish population does not contribute to the risk of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22(7): 750-751 (IF = 2,481)
- Kaleta B, Bogaczewicz J, Robak E, Sysa-Jędrzejowska A, Wrzosek M, Szubierajska W, Mróz P, Łukaszewicz J, Woźniacka A. Vitamin D Receptor Gene BsmI Polymorphism in Polish Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *ISRN Endocrinol* 2013; 2013: 1-5

Ponadto, w 2014 roku zostaliśmy uhonorowani nagrodami Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:

- Nagroda naukowa pierwszego stopnia za cykl publikacji pt. „Witamina D i zjawiska immunologiczne w chorobach skóry”
- Nagroda naukowa drugiego stopnia za cykl publikacji pt. „Determinanty psychologiczne i polimorfizm Fok I genu VDR w chorobach skóry”

- *Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej*

W 2012 roku we współpracy z Zakładem Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” prowadziłam analizy mające na celu poznanie wpływu zaopatrzenia w witaminę D oraz wariantów polimorficznych genu receptora witaminy D na patogenezę stwardnienia rozsianego u dzieci. Wyniki naszych badań zostały zaprezentowane na konferencji naukowej: „Witamina D - minimum, maksimum, optimum” (19-20.10.2012, Warszawa).

- *Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Klinika Geriatrii, Chorób Wewnętrznych i Chorób Metabolicznych Kości*

W latach 2013-2015 współpracując z Kliniką Geriatrii, Chorób Wewnętrznych i Chorób Metabolicznych Kości Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego wykonywałam genotypowanie receptora witaminy D oraz receptora TLR4 w grupie pacjentów z otyłością obłązkiem, którzy byli kwalifikowani do operacji bariatrycznej, a także w grupie pacjentek z

osteoporozą pomenopauzalną. Wyniki w/w analiz zostały przedstawione w następujących pracach:

- Kaleta B, Walicka M, Sawicka A, Wrzosek M, Bogołowska-Stieblich A, Nowicka GJ, Górski A, Łukaszkiwicz J, Marcinowska-Suchowierska E. Vitamin D receptor gene polymorphism in Polish patients with morbid obesity. *Post Nauk Med* 2014; 27(1): 65-69
- Kaleta B, Walicka M, Sawicka A, Bogołowska-Stieblich A, Górski A, Łukaszkiwicz J, Marcinkowska-Suchowierska E. Toll-like receptor 4 gene polymorphism C1196T in Polish women with postmenopausal osteoporosis - preliminary investigation. *Adv Clin Exp Med*. 2015; 24 (2), 239-243 (IF = 1.127)

C. Pozostała aktywność naukowa

Byłam recenzentką 12 publikacji w czasopismach międzynarodowych:

- *Biomarkers in Medicine* – recenzja jednego manuskryptu w 2020 roku
- *Genes* – recenzja jednego manuskryptu w 2020 roku
- *Asian Journal of Research and Reports in Gastroenterology* - recenzja jednego manuskryptu w 2020 roku
- *International Journal of Dermatology* - recenzja jednego manuskryptu w 2019 roku
- *Lupus* - recenzja jednego manuskryptu w 2018 roku
- *International Journal of Rheumatoid Diseases* – recenzja dwóch manuskryptów w 2018 roku
- *Clinical and Experimental Medicine* - recenzja jednego manuskryptu w 2018 roku
- *Polish Archives of Internal Medicine* - recenzja jednego manuskryptu w 2018 roku
- *Cellular Physiology and Biochemistry* - recenzja jednego manuskryptu w 2017 roku
- *The Journal of Clinical and Laboratory Medicine* - recenzja jednego manuskryptu w 2017 roku
- *Lupus* - recenzja jednego manuskryptu w 2016 roku
- *Scleroderma* - recenzja jednego manuskryptu w 2016 roku
- *Molecular Biology Reports* - recenzja jednego manuskryptu w 2016 roku

Jak wspomniano wyżej, jestem autorką rozdziału: „Osteopontin (OPN) Gene Polymorphisms and Autoimmune Diseases” w monografii *Genetic polymorphisms*. IntechOpen, 2017.

Od 2015 roku jestem członkinią Rady Redakcyjnej czasopisma Austin Journal of Clinical Immunology.

Ponadto jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim mgr Agnieszki Boguskiej (obrona pracy doktorskiej odbędzie się w 2020 roku).

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

Od 2012 roku jestem pracownikiem naukowo – dydaktycznym w Zakładzie Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie odpowiadam za całościową organizację zajęć dydaktycznych (przygotowanie sylabusów, planów zajęć, kolokwiów i egzaminów, uczestnictwo w Radach Pedagogicznych). Ponadto prowadzę zajęcia dydaktyczne (w formie wykładów, seminariów i ćwiczeń) dla studentów Wydziału Lekarskiego (dawnego I i II Wydziału Lekarskiego), Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej oraz dla studentów English Division. Opracowałam szereg autorskich materiałów dydaktycznych do zajęć z immunologii klinicznej (dla studentów polsko- i anglojęzycznych), immunopatologii, immunopatologii z immunodiagnostyką oraz immunologii (dla studentów anglojęzycznych). W 2020 roku przygotowałam kursy e-learningowe i egzaminy z przedmiotów nauczanych w Zakładzie Immunologii Klinicznej (immunopatologia, immunopatologia z immunodiagnostyką, immunologia kliniczna, clinical immunology oraz immunology).

W 2020 roku zostałam członkinią Zespołu powołanego do opracowania Regulaminu nowopowstałego Centrum Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

W 2019 roku zostałam powołana do Rady Programowej ds. przedmiotów przedklinicznych Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Od 2018 roku prowadzę wykłady dotyczące tematyki ochrony zdrowia dla słuchaczy Ostrołęckiego Uniwersytetu Trzeciego Wieku.

Od 2019 roku prowadzę zajęcia popularnonaukowe dla uczniów szkoły podstawowej w Legionowie. Przedstawiam w nich zagadnienia dotyczące podstaw budowy i funkcjonowania układów narządów człowieka.

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

A. Uczestnictwo w projektach badawczych

- 2015 do 2016 – „Wpływ cytrynianu sildenafilu na produkcję osteopontyny (OPN) przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka”. Projekt nr 1MG/PM11/15 finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Udział jako kierownik projektu.

-2020 – „Immunomodulacyjne działanie selenowanego polisacharydu (Se-Le-30) izolowanego z grzybni *Lentinula edodes* na ludzkie limfocyty T”. Projekt finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Udział jako kierownik projektu.

- od 2017 – „Nowa wielocząsteczkowa molekula pochodzenia naturalnego o selektywnej aktywności immunosupresyjnej”. Projekt nr MNSiW/2017/DIR/71/II+ dofinansowany w ramach konkursu na grant na prowadzenie prac przedwdrożeńowych, w ramach programu „Inkubator Innowacyjności +” . Udział jako wykonawca.

- od 09.2019 – „Immunomodulacyjny wpływ bakteriofagów na funkcje komórek układu immunologicznego”. Projekt nr 2018/31/B/NZ6/03999 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS. Udział jako wykonawca.

- od 01.2018 – „Ocena wpływu czynnika indukowanego hipoksją 1 na immunomodulacyjne właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu”. Projekt nr 2017/25/B/NZ6/01380 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS. Udział jako wykonawca.

- 2014 do 2018 - „Nowatorskie metody inżynierii tkankowej wspomagające gojenie i regenerację ścięgien i więzadeł”. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu Strategmed. Udział jako wykonawca.
- 2016 - 2018 – „Wpływ przedimplantacyjnego podania komórek macierzystych na leczenie niepłodności”. Projekt nr 1W51/PM11D/14 finansowany przez Warszawski Uniwersytet Medyczny. Udział jako wykonawca.
- 2013 do 2016 – „Selenowane polisacharydy- badania nad biosynteza i zależnością pomiędzy strukturą a aktywnością immunologiczną”, projekt nr 2013/09/B/NZ7/03978 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS. Udział jako wykonawca.
- 2015 do 2017 – „Rola polimorfizmów genu receptora witaminy D3 u pacjentek z zespołem policystycznych jajników”. Projekt finansowany przez Wojskowy Instytut Medyczny. Udział jako główny wykonawca.

B. Nagrody

- 2014 rok - nagroda naukowa pierwszego stopnia za cykl publikacji pt. „Witamina D i zjawiska immunologiczne w chorobach skóry” (nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi)
- 2014 rok - nagroda naukowa drugiego stopnia za cykl publikacji pt. „Determinanty psychologiczne i polimorfizm Fok I genu VDR w chorobach skóry” (nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

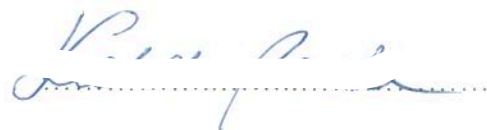
C. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego (stan na dzień 26.05.2020 roku)

Poniżej przedstawiam tabelaryczne zestawienie mojego dorobku naukowego z podziałem na prace opublikowane przed i po uzyskaniu stopnia doktora.

	PRZED DOKTORATEM			PO DOKTORACIE		
	Liczba	IF	MNiSW	Liczba	IF	MNiSW
Prace oryginalne pełnotekstowe	1	0,357	20	22	37,733	947
Prace pogładowe	-	-	-	2	6,237	95
Listy do redakcji	1	2,481		0	-	-
RAZEM	2	2,838	20	24	43,970	1042

LICZBA CYTOWAŃ publikacji z bazy Web of Science (bez autocytowań) z dnia 25.05.2020 roku = 73

Indeks Hirscha z bazy Web of Science z dnia 25.05.2020 roku = 6



(podpis wnioskodawcy)