

Załącznik nr 3

AUTOREFERAT

dr n. med. Marzena Skrzypczak-Zielińska

**INSTYTUT GENETYKI CZŁOWIEKA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Poznań 2019

1. Dane Wnioskodawcy

Marzena Skrzypczak-Zielińska
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Rok	Dyplom, stopień naukowy
2004	Magister inżynier biotechnologii , Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Tytuł pracy: „Zastosowanie zmodyfikowanej metody hodowli komórek Caco-2 w badaniach nad adhezją bakterii probiotycznych i transportem”, promotor dr hab. Anna Olejnik
2004	Studium Przygotowania Pedagogicznego, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
2009	Doktor nauk medycznych , Uniwersytet w Lipsku, Fakultet Medyczny Oryginalny tytuł rozprawy: „ <i>Evaluierung der HPLC und Long PCR als Verfahren zur Fragmentgrößenbestimmung bei Erkrankungen mit Trinukleotid-Repeat-Verlängerung</i> ”, tłumaczenie: ”Ewaluacja wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i <i>long PCR</i> jako metodyka do analizy długości fragmentów DNA w mutacjach dynamicznych”, promotor prof. dr hab. med. Ursula Froster Rozprawa doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Uniwersytetu w Lipsku
2011	Studia Podyplomowe w zakresie Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Uprawnienia diagnosty laboratoryjnego
2017	Kształcenie specjalizacyjne w zakresie Laboratoryjnej Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

Rok	Jednostka naukowa, stanowisko
2009-2010	Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, biolog
2010-nadal	Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, adiunkt

W latach 2004-2009 przebywałam na stażu naukowym w ramach programu Leonardo da Vinci a następnie na studiach doktoranckich w Instytucie Genetyki Człowieka na Fakultecie Medycznym Uniwersytetu w Lipsku w Niemczech (oryginalna nazwa: *Institut für Humangenetik an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig*), gdzie w całości zrealizowałam i obroniłam rozprawę doktorską.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

- a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Molekularne aspekty badań farmakogenetycznych w nieswoistych chorobach zapalnych jelit i wrażliwości na anestetyki

b) (autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

Osiągnięcie naukowe, które przedkładałam ubiegając się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna składa się z siedmiu publikacji, w tym sześciu oryginalnych artykułów i jednego pogładowego, opublikowanych w recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR) w latach 2013-2019. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (IF) podana zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wg JCR wynosi 18,058 (185 punktów MNiSW). Liczba cytowań wynosi: 17. W sześciu poniżej przedstawionych pracach z wyjątkiem pozycji nr 6 jestem autorem korespondencyjnym.

1. **Skrzypczak-Zielinska M**, Borun P, Milanowska K, Jakubowska-Burek L, Zakerska O, Dobrowolska-Zachwieja A, Plawski A, Froster UG, Szalata M, Slomski R. *High-resolution melting analysis of the TPMT gene: a study in the Polish population*. Genet Test Mol Biomarkers 2013 Feb;17(2):153-9.
IF=1,147, pkt. MNiSW=15, liczba cytowań 3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, zebraniu materiału biologicznego do badań, uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej na badania, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych z użyciem techniki HRMA, współudziale w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników HRMA i sekwencjonowania Sangera, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

2. **Skrzypczak-Zielinska M**, Borun P, Bartkowiak-Kaczmarek A, Zakerska-Banaszak O, Walczak M, Dobrowolska A, Kurzawski M, Waszak M, Lipinski D, Plawski A, Slomski R. *A Simple Method for TPMT and ITPA Genotyping Using Multiplex HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs*. Mol Diagn Ther 2016 Oct;20(5):493-9.
IF=1,909, pkt. MNiSW=25, liczba cytowań 2

Mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu układu doświadczalnego, dobraniu grupy badanej, współudziale w opracowaniu i wykonaniu badań molekularnych metodą multiplex HRMA, współudziale w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników badań, przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 55%.

3. Gabryel M*, **Skrzypczak-Zielinska M***, Kucharski MA, Slomski R, Dobrowolska A. *The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD*. Scand J Gastroenterol. 2016;51(6):654-65.
IF=2,526; pkt. MNiSW=20; liczba cytowań 7

* równy udział autorów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej i współudziale w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

4. **Skrzypczak-Zielinska M**, Gabryel M, Marszałek D, Dobrowolska A, Slomski R. *NGS study of glucocorticoids response genes in inflammatory bowel disease patients*. Arch Med Sci. 2019. doi: 10.5114/aoms.2019.84470.
IF=2,344, pkt. MNiSW=30, liczba cytowań 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wyselekcjonowaniu genów i zaplanowaniu badań, przeprowadzeniu analizy NGS, opracowaniu bioinformatycznym uzyskanych wyników NGS i ich interpretacji, analizie wyników sekwencjonowania Sangera, przygotowaniu ryciny 3-5 oraz tabel 1-5, miałam wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

5. Walczak M*, **Skrzypczak-Zielinska M***, Plucinska M, Zakerska-Banaszak O, Marszałek D, Lykowska-Szuber L, Stawczyk-Eder K, Dobrowolska A, Slomski R. *Long-Range PCR libraries and Next Generation Sequencing for pharmacogenetic studies of patients treated with anti-TNF drugs*. Pharmacogenomics J. 2018 Oct 8. doi: 10.1038/s41397-018-0058-9. (w druku)
IF=3,812, pkt. MNiSW=35, liczba cytowań 0

* równy udział autorów

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wyselekcjonowaniu genów i zaplanowaniu badań, koordynacji pracy genetyków z zespołem klinicystów i bioinformatykiem, interpretacji wyników NGS i sekwencjonowania Sangera, zaplanowaniu i koncepcji rycin 2-4 i tabel, współudział w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

6. Mikstacki A, **Skrzypczak-Zielinska M**, Zakerska-Banaszak O, Tamowicz B, Skibinska M, Molinska-Glura M, Szalata M, Slomski R. *Impact of CYP2E1, GSTA1 and GSTP1 gene variants on serum alpha glutathione S-transferase level in patients undergoing anaesthesia*. BMC Med Genet. 2016;17:40.
IF=2,198, pkt. MNiSW=20, liczba cytowań 5

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaprojektowaniu i koordynowaniu części molekularnej badań, współudziale w ogólnej koncepcji badań, przygotowaniu wniosku o zgodę na badania do Komisji Bioetycznej, analizie oraz interpretacji wyników genetycznych i ELISA, przygotowaniu ryciny nr 1, współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

7. Zakerska-Banaszak O, **Skrzypczak-Zielinska M**, Tamowicz B, Mikstacki A, Walczak M, Prendecki M, Dorszewska J, Pollak A, Lechowicz U, Oldak M, Huminska-Lisowska K, Molinska-Glura M, Szalata M, Slomski R. *Longrange PCR-based next-generation sequencing in pharmacokinetics and pharmacodynamics study of propofol among patients under general anaesthesia*. Sci Rep 2017 Nov 13;7(1):15399. doi: 10.1038/s41598-017-15657-2.
IF=4,122, pkt. MNiSW=40, liczba cytowań 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań molekularnych, zaplanowaniu i koordynacji pracy zespołów, walidacji badań molekularnych, współudziale w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników NGS i HPLC, a także współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 35%.

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

Przedmiotem moich zainteresowań naukowych ostatnich lat są przede wszystkim badania z zakresu farmakogenetyki człowieka i medycyny personalizowanej. Szczególną uwagę poświęciłam określeniu czynników zróżnicowanej odpowiedzi na leczenie polskich pacjentów w nieswoistych chorobach zapalnych jelit (NChZJ, ang. *inflammatory bowel disease, IBD*) oraz znieczuleniu ogólnym, czego dotyczy cykl przedstawionych prac. Realizując badania z tej tematyki dodatkowo opracowywałam i optymalizowałam narzędzia metodyczne z zakresu genetyki molekularnej. **Podążając za postępem technologicznym miałam na celu prowadzenie w sposób wydajny, ekonomiczny i z wysoką przepustowością ukierunkowanych badań farmakogenetycznych, które przyczyniłyby się do: 1) określenia czynników genetycznych warunkujących odpowiedź na farmakoterapię w NChZJ i środki anestetyczne w znieczuleniu ogólnym, 2) lepszego poznania mechanizmów działania leków w NChZJ i najczęściej stosowanych środków anestetycznych, 3) polepszenia predykcji i skuteczności leczenia w NChZJ oraz bezpieczeństwa anestezji.**

NChZJ stanowią grupę przewlekłych schorzeń układu pokarmowego, wśród których rozróżnia się dwie podstawowe jednostki: 1) chorobę Leśniowskiego-Crohna (ChL-C, ang. *Crohn's disease, CD*) charakteryzującą się pełnościennym, często ziarniniakowym zapaleniem, które może dotyczyć każdego odcinka przewodu pokarmowego od jamy ustnej aż do odbytu i 2) wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG, ang. *ulcerosa colitis, UC*) stanowiące rozlany nieswoisty proces zapalny błony śluzowej odbytnicy lub odbytnicy i okrężnicy, prowadzący w części przypadków do powstania owrzodzeń [Gomollón *et al.*, 2017; Harbord *et al.*, 2017]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowań na NChZJ. W przypadku ChL-C największą zachorowalność stwierdza się w rozwiniętych krajach Europy Zachodniej oraz Ameryki Północnej, gdzie średnia zapadalność wynosi 5 przypadków/100 tysięcy mieszkańców/rok, a chorobowość 40–50 przypadków/100 tysięcy mieszkańców. WZJG jest znacznie częstsze wśród osób rasy białej (Europa, Ameryka Północna) i zapadalność w Europie szacowana jest na poziomie 10 przypadków/100 tysięcy mieszkańców/rok [Cosnes *et al.*, 2011]. Do tej pory nie opublikowano danych dotyczących zapadalności na NChZJ w Polsce. Biorąc pod uwagę dane dla Europy można szacować, że w Polsce liczba chorych na ChL-C może sięgać 15 tysięcy a WZJG ok. 35 tysięcy. W krajowym rejestrze ChL-C zgłoszonych jest 6324 osób z 95 ośrodków [<http://www.chorobacrohna.pl/aktualne-dane-2/>], ale oprócz tego wiele przypadków może być niezdiagnozowanych.

Choroby te charakteryzują się występowaniem naprzemiennie okresów zaostrzeń i etapów remisji, czyli ustąpienia objawów. Dotykają najczęściej osób w młodym wieku, w 2.-3. dekadzie życia i obecne metody terapii polegają na łagodzeniu objawów, jednakże bez możliwości zupełnego wyleczenia. Etiologia NChZJ jest złożona i nadal nie do końca poznana. Pod uwagę bierze się czynniki: immunologiczne, genetyczne oraz środowiskowe. W wyniku aktywności prozapalnej komórek układu immunologicznego powstają nacieki prowadzące do destrukcji ściany przewodu pokarmowego [Thomson *et al.*, 2012]. Leczenie NChZJ jest złożone i obejmuje farmakoterapię, dietę, zmianę stylu życia oraz leczenie chirurgiczne, przy czym najważniejszym leczeniem ChL-C i WZJG jest farmakoterapia obejmująca 5 grup leków: 1) aminosalicylany, 2) glikokortykosteroidy, 3) leki immunosupresyjne (w tym tiopuryny), 4) leki biologiczne oraz 5) antybiotyki [Gomollón *et al.*, 2017; Harbord *et al.*, 2017]. Przewlekły charakter NChZJ zmusza do długotrwałego przyjmowania przez pacjentów leków przeciwzapalnych i immunosupresyjnych, których dawki podtrzymujące stosowane są zazwyczaj do końca życia.

Z praktyki można zaobserwować, że trafne dobranie farmakoterapii warunkuje dobrostan pacjenta i często pomaga uniknąć leczenia operacyjnego, chroni przed inwalidztwem, a nawet ratuje życie. Problemem jest trudna do przewidzenia odpowiedź organizmu na terapię, której efekt jest osobniczo-zmienny i w dużej mierze może zależeć od czynników genetycznych [Katsanos, Papadakis; 2014]. Wzbudziło to moje zainteresowanie jako genetyka i skłoniło mnie do podjęcia badań molekularno-genetycznych osobniczo-zmiennego działania leków tiopurynowych, glikokortykosteroidowych oraz terapii biologicznej anty TNF w NChZJ.

Pierwszym zagadnieniem, na którym się skoncentrowałam, stanowiło podłoże genetyczne działania terapii tiopurynami. Leki te, których przedstawicielami są azatiopryna (AZA) o działaniu immunosupesyjnym oraz cytostatyczne preparaty: 6-merkaptopuryna (6MP) i 6-tioguanina (6TG), posiadają efektywność terapeutyczną w indukowaniu i podtrzymywaniu stanu remisji NChZJ. Stanowią zatem poważną alternatywę dla leków steroidowych i są nieporównywalnie tańsze w stosunku do nowoczesnych leków biologicznych. W praktyce lekarskiej aż ok. 60% pacjentów z ChL-C otrzymuje AZA lub 6MP. Jednakże istnieje grupa osób, która jest oporna na leki tiopurynowe (ok. 9%) i ponadto u znacznego odsetka pacjentów (do 28%) z NChZJ występują działania niepożądane tej terapii, jak hematotoksyczność, hepatotoksyczność, zapalenie trzustki i zaburzenia żołądkowo-jelitowe [Schwab *et al.*, 2002; Dubinsky *et al.*, 2002; Chaparro *et al.*, 2013; Ansari *et al.*, 2008].

Jakie czynniki genetyczne mogą warunkować osobniczo-zmienną odpowiedź na terapię lekami tiopurynowymi i jak wygląda ta sytuacja w populacji polskiej? Odpowiedzi na te pytania szukałam podczas uczestnictwa w projekcie finansowanym przez MNiSW, pt. „Czynniki genetyczne zaangażowane w reakcję na leki tiopurynowe u chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit” realizowanego w latach 2008-2012 pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Ryszarda Słomskiego (N N402 209835). Projekt odbywał się we współpracy z prof. dr hab. Agnieszką Dobrowolską i jej zespołem z Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W ramach tego grantu prowadziłam badania genu S-metylotransferazy tiopuryn (*TPMT*, numer elektronicznej bazy dziedziczenia mendelowskiego u człowieka, ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM 187680) kodującego enzym o tej samej nazwie, który jest kluczowy w metabolizmie leków tiopurynowych i katalizuje proces ich metylacji [Katsanos, Papadakis, 2014]. Gen *TPMT* składa się z 9 eksonów (w tym 8 kodujących) i zlokalizowany jest w chromosomie 6p22.3. Obecnie znane są 43 allele tego genu (*TPMT**2-41) odpowiedzialne za deficyt enzymu *TPMT* [<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles?l5en>]. Średnio jedna osoba na 300 (0,3%) ma niską lub niewykrywalną aktywność enzymu *TPMT*, podczas gdy ok. 11% jest heterozygotycznych pod względem zmian genu *TPMT* prowadzących do częściowej aktywności S-metylotransferazy tiopurynowej [Weinshilboum *et al.*, 1980]. Pozostałe 89% osób posiada wysoką aktywność *TPMT*. Zazwyczaj badane i opisywane w literaturze są trzy allele: *TPMT**2 (c.238G>C), *3A (c.460G>A, c.719A>G) i *3C (c.719A>G), które uznaje się za przyczynę 80-95% przypadków genetycznie uwarunkowanego deficytu enzymu *TPMT* na świecie [Yeates *et al.*, 1997]. Zmiany c.238G>C, c.460G>A i c.719A>G zlokalizowane są odpowiednio w eksonie 4, 6 i 9. Moje zainteresowania dotyczyły zmienności całej części kodującej genu *TPMT* i flankujących regionów intronowych, co zostało przedstawione w pierwszej pracy z cyklu:

Skrzypczak-Zielinska M, Borun P, Milanowska K, Jakubowska-Burek L, Zakerska O, Dobrowolska-Zachwieja A, Plawski A, Froster UG, Szalata M, Słomski R. High-resolution melting analysis of the *TPMT* gene: a study in the Polish population. Genet Test Mol Biomarkers 2013 Feb;17(2):153-9.

Badania te zostały wykonane pod moją opieką w ramach dwóch prac magisterskich (K. Milanowska, 2011 i P. Boruń, 2012). Po dokonaniu analizy całej sekwencji kodującej (eksony 2-9) genu *TPMT* dla 274 osób populacji polskiej zidentyfikowane zostało 11 różnych wariantów sekwencji: 4 zmiany synonimiczne nie prowadzące do zamiany aminokwasu (p.Ile10Ile, p.Ala73Ala, p.Cys133Cys, p.Ile158Ile), 4 zmiany niesynonimiczne (p.Phe67Ser, Ala154Thr, p.Tyr240Cys, p.Val199Ile), 2 intronowe (c.233+35C>T, 366+58T>C) i 1 mutacja składowania genu (c.495-1G>A). W naszej grupie badanej wykryliśmy obecność allelu *TPMT**3A, będącego układem dwóch zmian heterozygotycznych c.460G>A i c.719A>G z częstością 3,28% i nie zaobserwowaliśmy obecności alleli *TPMT**2, *3B i *3C, co koresponduje z danymi dotyczącymi rozkładu tych alleli z piśmiennictwa dla populacji kaukaskiej [Spire-Vayron De la Moureyre *et al.*, 1998; McLeod *et al.*, 1999]. Jednakże warto zaznaczyć, że substytucje w dwóch *loci*: c.200T>C (p. Phe67Ser) i c.595G>A (p.Val199Ile) okazały się nowymi wcześniej nieopisanymi zmianami. Stąd wraz z zespołem zgłosiłam je do Komitetu Nazewnictwa Alleli *TPMT* na Uniwersytecie w Linköping w Szwecji (ang. *TPMT allele nomenclature committee*) [<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles?l5en>] i znalazły się w wykazie alleli tego genu pod nazwami *TPMT**35 i *TPMT**36 (w publikacji przez nas pierwotnie nazwane jako *TPMT**30 i *TPMT**31). Obydwie te mutacje zlokalizowane są w zachowawczym regionie genu *TPMT* [Salavaggione *et al.*, 2005] i powodują wymianę aminokwasów, co wskazuje na ich prawdopodobny wpływ na obniżoną aktywność enzymu *TPMT*. Ponadto w ramach tej pracy wykryty został jeden rzadki wariant w miejscu połączenia akceptora c.495-1G>A, który prowadzi do niedoboru *TPMT*. Mutacja ta została po raz pierwszy opisana w Szwecji jako allel *TPMT**15 Lindqvist *et al.*, 2004]. Analiza całej sekwencji kodującej genu *TPMT* wykazała zatem dodatkowo obecność zmian innych niż te najczęściej badane *TPMT**2, *3A i *3C, co prowadzi do cennego wniosku, że dla populacji polskiej występuje potrzeba rozważenia analizy całej części kodującej genu *TPMT*, a nie tylko 3 *loci*. Jednocześnie zatem opracowaliśmy i zaproponowaliśmy w tej pracy bardzo czułą i mniej czasochłonną, w porównaniu ze standardowym sekwencjonowaniem Sangera, przesiewową metodykę do analizy części kodującej genu *TPMT* z użyciem analizy krzywych topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRMA, ang. *high-resolution melting analysis*). W efekcie zaprojektowane zostały startery i opracowane warunki amplifikacji dla każdego z 8 eksonów regionu kodującego genu *TPMT*. Ważną zaletą techniki HRMA, poza szybkością oznaczeń, jest także brak specyficznych barwników fluorescencyjnych oraz niskie ryzyko zanieczyszczenia i zamiany próbek podczas kolejnych etapów pracy laboratoryjnej po złożeniu reakcji, których w tym przypadku nie ma. To wszystko czyni tę metodę nadal atrakcyjną, stąd postanowiłam ją udoskonalić i użyć w dalszych badaniach. Mianowicie po dokonaniu modyfikacji HRMA poprzez łączenie par starterów w jednej reakcji technikę tę można też zastosować w formie reakcji multipleks. Jest to wprawdzie wyzwanie na etapie optymalizacji, ale stanowi bardzo ekonomiczne rozwiązanie podczas dokonywania oznaczeń dla większej grupy badanej. Takie rozwiązanie zostało przedstawione do oznaczenia alleli genów metabolizmu leków tiopurynowych w drugiej pracy cyklu:

Skrzypczak-Zielinska M, Borun P, Bartkowiak-Kaczmarek A, Zakerska-Banaszak O, Walczak M, Dobrowolska A, Kurzawski M, Waszak M, Lipinski D, Plawski A, Slomski R. A Simple Method for *TPMT* and *ITPA* Genotyping Using Multiplex HRMA for Patients Treated with Thiopurine Drugs. Mol Diagn Ther 2016 Oct;20(5):493-9.

Zawarte w piśmiennictwie informacje kliniczne i farmakogenetyczne na temat leków tiopurynowych skłoniły mnie do pracy nad stworzeniem testu, który ułatwiłby badania naukowe poprzez sprawne ustalenie podstawowych alleli genu *TPMT* oraz miałby potencjał diagnostyczny. Warto dodać, że *TPMT* jest jak do tej pory jedynym uznanym przez

amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) farmakogenem w terapii NChZJ, dla którego opracowano rekomendacje odnośnie dawkowania azatiopryny (AZA) i 6-tioguaniny (6TG) w zależności od genotypu [Relling *et al.*, 2011; Relling *et al.*, 2013]. W powyżej publikacji z cyklu oprócz *loci* c.238G>C, c.460G>A, c.719A>G genu *TPMT* oznaczana była także zmiana c.94C>A (p.P32T, rs1127354) genu trifosfatazy inozynowej (*ITPA*, OMIM 1475720), kodującego drugi istotny enzym szlaku leków tiopurynowych – ITPA. Enzym ten katalizuje pirofosfohydrolizę trifosforanu inozyny (ITP) do monofosforanu inozyny (IMP), zapobiegając akumulacji potencjalnie toksycznych ITP. Zmiana heterozygotyczna c.94C>A genu *ITPA* prowadzi do częściowej redukcji a homozygotyczna do braku aktywności enzymu wywołując hepatotoksyczne działanie 6-MP [Adam de Beaumais *et al.*, 2011]. Naszą grupę badaną stanowiło 100 pacjentów z NChZJ, u których oznaczono wcześniej metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP) lub sekwencjonowania Sangera *loci* c.238G>C, c.460G>A, c.719A>G genu *TPMT* i c.94C>A genu *ITPA*. Jeden pacjent posiadał układ alleli *TPMT**1/*2, jeden *TPMT**3A/*3A, siedmiu *TPMT**1/*3A i pozostałe 91 *TPMT**1/*1. W przypadku genu *ITPA* 12 pacjentów było heterozygotami dla pozycji c.94, dwóch homozygotami A/A i pozostałe 86 homozygotami C/C. Opracowana i zoptymalizowana metodyka stanowiła dwie reakcje multiplex HRMA, gdzie w jednej reakcji dokonywano oznaczania jednocześnie pozycji c.460 i c.719 genu *TPMT*, a w drugiej reakcji pozycji c.238G>A genu *TPMT* i c.94C>A genu *ITPA*. Uzyskane wyniki genotypów wykazały, że dla wszystkich pacjentów bez wyjątku potwierdziły się wyniki oznaczane metodą RFLP i sekwencjonowania Sangera. Opracowana technika multiplex HRMA okazała się być czułą i skuteczną metodą do określania *loci* genu *TPMT* i *ITPA* w porównaniu z konwencjonalnymi technikami genotypowania i może być stosowana jako ich szybka i tania alternatywa w przypadku planowania terapii lub w trakcie leczenia lekami tiopurynowymi.

Kolejna praca z cyklu prac wchodzących w skład przedłożonego osiągnięcia dotyczy aspektów genetycznych działania drugiej grupy leków stosowanych w leczeniu NChZJ, mianowicie glikokortykosteroidów (GKs). Analizując piśmiennictwo z tej tematyki można było dotrzeć do licznych prac dotyczących badań farmakogenetycznych leczenia GKs zawężonych do kilku genów lub konkretnych polimorfizmów. Zauważalna była potrzeba usystematyzowania tej wiedzy, co przed podjęciem eksperymentów, na etapie ubiegania o finansowanie, uczyniliśmy w postaci pracy poglądowej:

Gabryel M*, Skrzypczak-Zielinska M*, Kucharski MA, Slomski R, Dobrowolska A. *The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD*. Scand J Gastroenterol. 2016;51(6):654-65.

Syntetyczne GKs pomimo wieloletniej historii stosowania i obecności nowoczesnych leków biologicznych wydają się niezastąpione w terapii NChZJ. Znane są z szybkiego działania przeciwzapalnego i immunomodulującego. Używane są jako leki pierwszego rzutu w leczeniu zaostrzeń NChZJ. Jednakże w sytuacji stosowania GKs podobnie jak w przypadku leków tiopurynowych nie wszyscy pacjenci reagują pozytywnie na terapię. Blisko 40% wykazuje zależność od GKS, a około 20% chorych jest opornych na to leczenie [Munkholm *et al.*, 1994]. Z piśmiennictwa wynika, że jako przyczynę zróżnicowanej reakcji na terapię GKs upatruje się wiele czynników, w tym nasilenie choroby i powikłania oraz czynniki środowiskowe, ale składnik genetyczny odgrywa najważniejszą rolę, szacowaną nawet do 95% [Pierik *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2003]. W pracy poglądowej opisaliśmy wyniki dotyczące badań wpływu czynników genetycznych na odpowiedź na leczenie GKS pacjentów z NChZJ, a także mając do dyspozycji nowe technologie, jak sekwencjonowanie następnej

generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) wskazaliśmy kierunki, które należy rozważyć w badaniach farmakogenetycznych tych leków z uwagi na mnogość białek i cząsteczek zaangażowanych w działanie, transport i metabolizm leków GKs [De Iudicibus *et al.*, 2011]. Wśród najczęściej badanych znalazł się gen receptora GKs - *NR3C1* (OMIM 138040), odpowiedzialny za wiązanie GKs w komórce oraz gen glikoproteiny *ABCB1* (OMIM 171050) przeprowadzającej transbłonowy transport GKs. Okazało się, że wyniki badań różnych grup naukowców nie zawsze potwierdzają uzyskane korelacje odpowiedzi na leczenie GKs dla poszczególnych badanych *loci* tych genów. Według ówczesnego stanu wiedzy tylko pojedyncze prace dotyczyły jeszcze genu *FKBP5* (OMIM 602623) kodującego immunofilinę FKBP51 wchodzącą w skład kompleksu receptora GKs, genu czynnika martwicy nowotworu *TNF* (OMIM 191160) oraz genu *NLRP1* (OMIM 606636) kodującego cytoplazmatyczny receptor odpowiedzialny za rozpoznawanie liposacharydów ścian komórkowych bakterii. Analizując szlak działania GKs wskazaliśmy, że warianty sekwencji wielu innych genów, które nie były wówczas obiektem badań farmakogenetycznych mogą warunkować wystąpienie zjawiska steroido-zależności i steroido-oporności oraz efektów ubocznych. Należą do nich przede wszystkim: 1) geny *HSPA4* (OMIM 601113), *HSP90AA1* (140571) i *STIP1* (605063) kodujące białka kompleksu receptora GKs, tzn. białka opiekuńcze szoku cieplnego HSP 90-alfa i HSP 70 kDa oraz białko fosfoproteiny 1 indukowanej stresem, 2) geny *JUN* (OMIM 165160), *NFKB1A* (OMIM 164008) i *MAPK14* (OMIM 600289) czynników biorących udział w kontroli hormonalnej transkrypcji docelowego genu w jądrze, czyli czynnik transkrypcyjny AP-1, podjednostka czynnika jądrowego NF-kB p105 oraz kinaza 14 aktywowana mitogenem, 3) geny efektorowe działania leków GKs, jak *IL1A* (OMIM 147760), *IL1B* (OMIM 147720), *IL2* (OMIM 147680), *IL4* (OMIM 147780), *CXCL8*, (OMIM 146930) *IL10* (OMIM 124092), *MIF* (OMIM 153620) kodujące cytokiny prozapalne i przeciwzapalne, w tym: interleukiny IL-1, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 oraz czynnik hamujący migrację makrofagów, 4) geny *CYP3A4* (OMIM 124010) i *CYP3A5* (OMIM 605325) kodujące enzymy z grupy cytochromu P450 odpowiedzialnych za biotransformację GKs w organizmie, oraz 5) gen *IPO13* (OMIM 610411) kodujący białko importyny uczestniczącej w transporcie GKs do jądra komórkowego. Wiedzy ta skłoniła nas do przeprowadzenia nowatorskich badań panelu wyżej wymienionych 21 genów z użyciem technologii NGS, których wyniki zostały przedstawione w publikacji:

Skrzypczak-Zielinska M, Gabryel M, Marszalek D, Dobrowolska A, Slomski R. NGS study of glucocorticoids response genes in inflammatory bowel disease patients. Arch Med Sci. 2019. doi: 10.5114/aoms.2019.84470.

Badania te zostały zrealizowane w ramach projektu Preludium z Narodowego Centrum Nauki (2015/17/N/N25/00689), pt. „Analiza czynników genetycznych zaangażowanych w reakcję na leki glikokortykosteroidowe w populacji polskich pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit”, którego kierownikiem był dr Marcin Gabryel. Z tematyki tej powstała także praca doktorska Marcina Gabryela, w której pełniłam funkcję promotora pomocniczego. Grupę badaną stanowiło 139 pacjentów z NChZJ, w tym 77 (55,4%) z ChL-C i 62 (45,6%) z WZJG. Wszyscy pacjenci byli leczeni GKs (metyloprednizolonem, hydrokortyzonem lub budesonidem) oraz monitorowani pod względem odpowiedzi i wystąpienia skutków ubocznych terapii. Spośród badanej grupy, 77 (56%) pacjentów zostało zakwalifikowanych jako steroido-wrażliwi, 38 (27%) pacjentów było steroido-zależnych i 24 (17%) wykazywało steroido-oporność. Przeprowadzona analiza molekularna polegała na powieleniu sekwencji nukleotydowej DNA wyżej wymienionych 21 genów dla wszystkich pacjentów z użyciem techniki *long* PCR w 54 fragmentach, które następnie zostały przygotowane jako biblioteka amplikonowa i poddane sekwencjonowaniu

NGS. Uzyskane wyniki wykazały obecność średnio 430 ± 63 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide variation*, SNV) na próbkę, z czego 121 zostało zakwalifikowanych jako warianty funkcjonalne. Biorąc pod uwagę kryterium częstości występowania rzadkiego allelu powyżej 2% w badanej grupie 139 pacjentów oraz uwzględnienie także badanych wcześniej przez innych naukowców *loci* w kontekście odpowiedzi na leczenie GKs w NChZJ, dla analiz korelacji włączyliśmy 31 wariantów polimorficznych. Na podstawie wyników korelacji dla całej grupy badanej zaobserwowaliśmy znamienne różnice w odpowiedzi na leczenie GKs w przypadku jednej zmiany: c.2685+49T>C (rs2032583) w genie *ABCB1*, która wykazała związek z wystąpieniem oporności ($p = 0,046$). Dalsze analizy z uwzględnieniem podziału na diagnozę ChL-C i WZJG wykazały, że istotność statystyczna dla tej zmiany utrzymuje się tylko dla pacjentów z ChL-C. Zaobserwowaliśmy, że w grupie pacjentów z opornością allelu C w ogóle nie występował w przeciwieństwie do grupy steroido-wrażliwych (17,3%) i steroido-zależnych pacjentów (13,6%). Genotyp T/C istotnie rzadziej był obecny w porównaniu z homozygotą T/T u pacjentów steroido-opornych w porównaniu z pozostałymi pacjentami z ChL-C ($p = 0,034$). Można więc wysunąć wniosek, że allelu C wywiera ochronny wpływ przed zjawiskiem steroido-oporności u pacjentów z ChL-C. Nasze wyniki częściowo potwierdzają jedyne wcześniejsze badania dla tego *locus* przeprowadzone przez kanadyjskich naukowców, którzy wykazali ochronną rolę allelu C przed steroido-zależnością [Krupoves *et al.*, 2011].

W przypadku WZJG nasze wyniki wskazują na znamienny związek odpowiedzi na leczenie GKs z występowaniem wariantów c.1088G>A (p.Asn363Ser, rs56149945) w genie *NR3C1* ($p = 0,019$), c.241+6A>G (rs2817033) w genie *FKBP5* i c.306-7delT (rs61763106) w genie *MAPK14*. Mianowicie allelu G w pozycji c.1088 genu *NR3C1* zidentyfikowaliśmy częściej w grupie steroido-opornych 19,2% w porównaniu do 1,35% u pozostałych pacjentów. Ponadto pacjenci WZJG z genotypem AG i homozygoty GG wykazywali istotnie zwiększoną steroido-oporność w porównaniu z resztą pacjentów WZJG ($p < 0,001$). Gen *NR3C1* jak już wspomniałam jest stosunkowo częstym tematem badań opisywanych w literaturze w odniesieniu do odpowiedzi na leczenie GKs. Wcześniejsze wyniki włoskich naukowców dla tej pozycji u pacjentów z NChZJ leczonych GKs potwierdzają przez nas wykrytą zależność [Malatese *et al.*, 2012], w przeciwieństwie do innych prac [Krupoves *et al.*, 2011a; Koper *et al.*, 2014]. W przypadku zmiany c.241+6A>G w genie *FKBP5*, nie ma w literaturze podobnych badań farmakogenetycznych dla tego *locus*. Co zaskakujące, nasze wyniki wskazują, że wystąpienie tej substytucji sprzyja wrażliwości na leczenie ($p = 0,040$), co może być związane z utrzymaniem optymalnych proporcji w wiązaniu produktu genu *FKBP5* (białka FKBP-51) z aktywną i nieaktywną izoformą receptora GK. Białko to ma bowiem kluczowe znaczenie dla prawidłowego wiązania GKs z receptorem GKs i transportem receptorem GKs do jądra komórkowego. Można przypuszczać, że obserwowany w naszych badaniach wariant *splicingu* w genie *FKBP5* zmienia poziom funkcjonalnego białka FKBP-51 lub je modyfikuje i dlatego przyczynia się do wyższej wrażliwości na GKs. W przypadku delekcji c.306-7delT w genie *MAPK14* zauważyliśmy, że nosiciele i homozygoty z delecją T posiadają zwiększoną steroido-zależność lub steroido-oporność (OR = 9,722, $p = 0,002$). GKs blokują szlak sygnałowy MAPK poprzez indukcję fosfatazy MAPK 1 (MKP1), która w konsekwencji hamuje ekspresję genów zapalnych [Clark *et al.*, 2003]. Można więc przypuszczać, że wariant intronowy c.306-7delT genu *MAPK14* modyfikuje kodowane białko, w ten sposób, że nie może ono być skutecznie hamowane przez MKP1, a w konsekwencji występuje steroido-oporność i steroido-zależność.

Na podstawie uzyskanych wyników nasuwają się dodatkowe wnioski, że na osobniczo-zmienną reakcję mają wpływ wcześniej niebadane polimorfizmy, jak w przypadku zmiany c.241+6A>G w genie *FKBP5*, a także warianty dotychczas nieanalizowanych w tym aspekcie genów, jak ma to miejsce dla *MAPK14*, którego delekcja c.306-7delT okazała się

znamienna. Ponadto zaobserwowaliśmy, że różne czynniki genetyczne warunkują odpowiedź na GKs u pacjentów z ChL-C i WZJG. Choroby te wywodzą się z jednej grupy NChZJ i ich etiologia jest jeszcze nie do końca poznana, ale różnią się podłożem genetycznym i prawdopodobnie farmakogenetyką [Malatese *et al.*, 2012; Wędrychowicz *et al.*, 2018].

Wdrożenie leczenia biologicznego w NChZJ i obserwacje współpracujących ze mną lekarzy gastroenterologów zainspirowały mnie również do podjęcia badań z zakresu leków anty TNF, których dotychczasowe wyniki zawiera praca:

Walczak M*, Skrzypczak-Zielinska M*, Plucinska M, Zakerska-Banaszak O, Marszalek D, Lykowska-Szuber L, Stawczyk-Eder K, Dobrowolska A, Slomski R. *Long-Range PCR libraries and Next Generation Sequencing for pharmacogenetic studies of patients treated with anti-TNF drugs*. Pharmacogenomics J. 2018 Oct 8. doi: 10.1038/s41397-018-0058-9.

W patogenezie ChL-C podstawową rolę pełnią komórki układu immunologicznego. W wyniku ich aktywności prozapalnej dochodzi do powstawania nacieku i destrukcji ściany przewodu pokarmowego [Thomson *et al.*, 2012]. Podstawową cytokiną, o udowodnionej roli w patogenezie ChL-C, jest czynnik martwicy nowotworów TNF (ang. *tumor necrosis factor*). Podwyższoną ekspresję tej cytokiny znajduje się zarówno w naciekach zapalnych jelit jak i w surowicy pacjentów. W ostatnich kilku latach w terapii przewlekłych chorób zapalnych coraz szerzej stosuje się leki działające poprzez blokowanie cytokiny TNF z użyciem przeciwciał anty TNF alfa wytworzonych technikami inżynierii genetycznej. Istnieje grupa pacjentów, która nie reaguje na ten typ terapii. Pomimo podawania anty TNF u ok. 30% nie obserwuje się poprawy stanu klinicznego i braku zahamowania procesu zapalnego w obrazie endoskopowym [Roberts *et al.*, 2012, Atzeni *et al.*, 2013]. Mimo intensywnych badań prowadzonych na całym świecie mechanizmy działania przeciwciał anty TNF i ich efekty kliniczne nie są w pełni zrozumiałe. W niniejszej pracy na podstawie piśmiennictwa wyłoniliśmy 16 genów: *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *ADAM17*, *CASP9*, *FCGR3A*, *LTA*, *TNF*, *FAS*, *IL1B*, *IL17A*, *IL6*, *MMP1*, *MMP3*, *S100A8*, *S100A9* i *S100A12* zaangażowanych w działanie, kaskadę ekspresji, transmisję sygnału i metabolizm TNF [Prieto-Pérez *et al.*, 2013; Prieto-Pérez *et al.*, 2016; Hlavaty *et al.*, 2001; Bek *et al.*, 2016; Dideberg *et al.*, 2006; Ternant *et al.*, 2015; Mascheretti *et al.*, 2002]. Opracowaliśmy metodykę tworzenia biblioteki amplikonowej dla powielenia kodującej sekwencji tych genów wraz z flankującymi regionami intronowymi, sekwencji promotorowej oraz regionów 5' i 3' niepodlegających translacji (ang. *untranslated region*, UTR) w celu sekwencjonowania NGS. Jako model do badań posłużył materiał DNA od trzech pacjentów populacji polskiej z ChL-C leczonych lekiem infliksimab. Jednakże metodyka może mieć zastosowanie także do badań nad leczeniem anty TNF w różnych innych zaburzeniach. Amplifikacja sekwencji wszystkich 16 genów została przeprowadzona w 23 fragmentach o długości od 3578 do 21 995 pz. Nasze wyniki analizy NGS wskazały obecność zmian polimorficznych w każdym z fragmentów DNA dając łącznie liczbę 592 SNV z ilością odczytów 5–1089. Zaobserwowaliśmy, że największą zmiennością genetyczną na poziomie DNA charakteryzował się gen *FCGR3A* kodujący receptor dla fragmentu krystalizującego przeciwciała oraz region zawierający eksony od 2-10 genu *TNFRSF1B*. Natomiast niską zmienność wykryliśmy w genie *S100A12*, który koduje białko kalprotektyny. Największa liczba zmian występowała w intronach, ale co ciekawe, stosunkowo wysoki polimorfizm cechował też regiony 5' i 3' UTR, których celowość oznaczania uzasadniono w aspekcie miejsc wiązania sekwencji miRNA na przykładzie ostatnich badań farmakogenetycznych GKs [De Iudicibus 2018]. W efekcie została opracowana czuła i ekonomiczna metodyka do wielogenowych badań działania terapii

anty TNF, która opiera się na reakcji *long* PCR i może być przeprowadzana w podstawowych laboratoriach, a NGS umożliwia analizę dużej liczby genów. Ponadto, w dobie zwiększającej się liczby rodzajów cząstek leków biologicznych, badania farmakogenetyczne leków anty TNF są bardzo ważne do personalizacji leczenia (doboru leku do pacjenta). Obiecujące wyniki być może w niedalekiej przyszłości pozwolą uniknąć ryzykowej ingerencji w układ immunologiczny.

W swojej pracy naukowej poza poszukiwaniem czynników farmakogenetycznych odpowiedzi na leczenie polskich pacjentów z NChZJ skupiałam się także na podłożu genetycznym wrażliwości na powszechnie stosowane w znieczuleniu ogólnym anestetyki, do których należą sewofluran i propofol. Badania te były prowadzone w latach 2010-2014 we współpracy z pracownikami Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu w ramach grantu z MNiSW, pt. „Analiza polimorfizmów genów warunkujących reakcję na środki anestetyczne u pacjentów w znieczuleniu ogólnym oraz reakcję na środki przeciwbólowe w okresie pooperacyjnym” (N N401 037838), kierowanym przez dr hab. Adama Mikstackiego. Wyniki dotyczące wpływu zmian genetycznych na międzyosobnicze różnice w funkcjonowaniu komórek wątroby pacjentów po zabiegu w znieczuleniu ogólnym sewofluranem zostały przedstawione w publikacji:

Mikstacki A, Skrzypczak-Zielinska M, Zakerska-Banaszak O, Tamowicz B, Skibinska M, Molinska-Glura M, Szalata M, Slomski R. *Impact of CYP2E1, GSTA1 and GSTP1 gene variants on serum alpha glutathione S-transferase level in patients undergoing anaesthesia. BMC Med Genet.* 2016;17:40.

Sewofluran sprawdza się przy wprowadzeniu i podtrzymywaniu znieczulenia do krótkich zabiegów, ze względu na swoje właściwości, przede wszystkim krótki czas indukcji (1-2 minuty), co też zapewnia szybkie wybudzenie. Jako, że światowe piśmiennictwo donosiło o przypadkach zaburzenia integralności hepatocytów u znieczulanych sewofluranem, w przedstawianej pracy podjęliśmy się analizę wpływu czynników genetycznych na poziom wskaźników wątrobowych u pacjentów poddanych anestezji tym środkiem. Stąd też, badania prowadzone były na grupie 86. pacjentów, dobranych w ten sposób, aby reprezentowali tylko I–II klasę według skali Amerykańskiego Towarzystwa Anestezjologicznego (ang. *American Society of Anaesthesiology*, ASA) oraz z będącymi w normie wskaźnikami wątrobowymi: aminotransferaza alaninowa i aminotransferaza asparaginowa (ALAT, AspAT). Kryterium wykluczenia stanowił alkoholizm i nikotynizm oraz przyjmowanie leków istotnie wpływających na funkcję wątroby. Pacjenci poddani byli krótkim zabiegom laryngologicznym, gdzie średni czas ekspozycji na sewofluran wynosił 39,15 min. U znieczulanych monitorowano ewentualne występowanie działań niepożądanych.

Mierzonym wskaźnikiem integralności hepatocytów był w przedstawianej pracy wątrobowy enzym α -GST. Jego poziom określaliśmy metodą ELISA w surowicy pacjentów wyizolowanej z krwi obwodowej, która była pobierana w trzech punktach czasowych: przed indukcją znieczulenia, po zakończeniu znieczulenia i po dobie od znieczulenia. Część molekularna badań objęła analizę zmian polimorficznych w genach *GSTA1* i *GSTP1* kodujących enzym GST oraz w genie *CYP2E1* kodującym enzym uczestniczący w biotransformacji sewofluranu. W genie *GSTA1* sekwencjonowaliśmy część promotorową obejmującą istotne zmiany -567T>G, -69C>T oraz -52G>A. Natomiast z użyciem pirosekwencjonowania genotypowaliśmy warianty c.313A>G oraz c.341C>T w genie *GSTP1* determinujące aktywność enzymu, zaś w genie *CYP2E1* zmianę -1053T (rs2031920) odpowiedzialną za zwiększoną ekspresję [Hayashi *et al.*, 1991].

Uzyskane wyniki wykazały istnienie międzyosobniczych, jak i zarówno dobowych różnic w stężeniach enzymu α -GST w surowicy. Analiza korelacji profili dobowych enzymu

z poszczególnymi genotypami pacjentów wskazała na istotnie wyższy poziom enzymu α -GST u homozygot ze zmianą c.313A>G i c.341C>T w genie *GSTP1* bezpośrednio po zakończeniu znieczulenia w stosunku do początkowego oraz mierzonego po dobie od zakończenia anestezji. Ponadto, po dobie od zakończenia znieczulenia obserwowaliśmy zwiększoną wartość stężenia enzymu α -GST wśród pacjentów o genotypie *GSTA1* typu dzikiego. Przeprowadzone badania dowiodły, że zmiany polimorficzne w genie *GSTP1* warunkują tymczasowe zaburzenie integralności hepatocytów u pacjentów znieczulanych sewofluranem bezpośrednio po zakończonym znieczuleniu, zaś zmiany w genie *GSTA1* są związane (choć nie istotnie statystycznie) z podwyższonym poziomem α -GST po upływie doby od znieczulenia. Analizowany wariant promotorowy genu *CYP2E1* nie miał natomiast wpływu na okołooperacyjne zmiany poziomu enzymu w badanej grupie pacjentów.

Drugim powszechnie używanym środkiem anestetycznym jest dożylny propofol, podczas stosowania którego obserwowane są w praktyce jak i opisywane w piśmiennictwie parametry farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Postanowiliśmy sprawdzić czy mogą one być uwarunkowane czynnikami genetycznymi stosując pionierski schemat badań z użyciem analizy NGS panelu 9 genów, a wyniki zostały zawarte w pracy doktorskiej dr Oliwii Zakerskiej-Banaszak (2015 r.), której byłam promotorem pomocniczym, oraz w publikacji poniżej:

Zakerska-Banaszak O, Skrzypczak-Zielinska M, Tamowicz B, Mikstacki A, Walczak M, Predecki M, Dorszewska J, Pollak A, Lechowicz U, Oldak M, Huminska-Lisowska K, Molinska-Glura M, Szalata M, Slomski R, Longrange *PCR-based next-generation sequencing in pharmacokinetics and pharmacodynamics study of propofol among patients under general anaesthesia. Sci Rep 2017 Nov 13;7(1):15399. doi: 10.1038/s41598-017-15657-2.*

Z uwagi na to, że propofol ulega złożonej kilkustapowej biotransformacji, w skład panelu analizowanych genów wchodziły te, które kodują enzymy ze szlaku działania propofolu (*CYP2C9*, *CYP2B6*, *UGT1A9*, *SULT1A1*, *NQO1*), jak i zarówno białka transportowe (*ABCB1*, *ALB*), a także receptorowe (*GABRA1*, *ADRA1A*). Badania przeprowadziliśmy na grupie 87 pacjentów populacji polskiej reprezentujących I i II klasę w skali ASA, którzy do zabiegów poddawani byli znieczuleniu ogólnemu dożylnym propofolem. W okresie okołooperacyjnym monitorowano wskaźniki kardiologiczne i oddechowe.

Parametr farmakodynamiczny propofolu stanowił czas wybudzenia ze znieczulenia. Farmakokinetykę anestetyku charakteryzowaliśmy natomiast za pomocą średniego czasu retencji (ang. *mean retention time*, MRT), który wyznaczaliśmy na podstawie dawki, czasu infuzji anestetyku i pomiarów HPLC stężenia propofolu w osoczu pobranym od pacjentów w pięciu punktach czasowych: bezpośrednio po zakończonej infuzji propofolu oraz po upływie 5, 10, 20 i 30 min. od zakończenia infuzji. Ponadto, monitorowaliśmy powstawanie w czasie dwóch głównych metabolitów propofolu – glukuronidu propofolu oraz 4-hydroksypropofolu.

Wyniki uzyskane z przeprowadzonej analizy NGS pozwoliły na identyfikację łącznie 1513 wariantów sekwencji w badanych genach. Ostatecznie 37 z nich (mutacje i zmiany aminokwasu) poddano analizie statystycznej z farmakokinetyką i dynamiką propofolu. Na podstawie dokonanych pomiarów HPLC wykazaliśmy, że wartość MRT propofolu waha się w badanej grupie pacjentów w przedziale 8,0–504,1 min. Stosując rangę centylową wyszczególniliśmy trzy profile tempa metabolizmu propofolu: szybcy, umiarkowani i wolni metabolizerzy anestetyku, które w badanej grupie stanowiły odpowiednio: 27%, 48% and 22%. Ponadto, zaobserwowaliśmy istotne różnice w profilach powstawania metabolitów

propofolu - glukuronidu propofolu oraz 4-hydroksypropofolu u badanych. Czas wybudzenia znieczulanych mieścił się w zakresie 0,5–45 min.

Dokonana analiza korelacji wariantów sekwencji nukleotydowej w genach receptorowych z farmakodynamiką propofolu oraz w genach enzymów i białek transporterowych z farmakokinetyką anestetyku pozwoliła wskazać dwie zmiany: c.516G>T (p.Q172H) w genie *CYP2B6* oraz c.2677T>G (p.S893A) w genie *ABCB1*, jako związane z profilem tempa biotransformacji propofolu. Mianowicie, homozygoty c.516 T/T były częściej obecne w grupie szybkich metabolizerów, podczas gdy heterozygoty c.2677 T/G dominowały wśród umiarkowanych i wolnych metabolizerów propofolu.

Wyniki dotychczasowych badań światowych podkreślały szczególne znaczenie genów *CYP2B6*, *CYP2C9* and *UGT1A9* w zmiennej farmakokinetyce i dynamice propofolu, jednakże nasze badania tylko częściowo podzieliły te wnioski. W przeciwieństwie do zespołu Kansaku oraz Mastrogianni, którzy zaobserwowali związek podwyższonego stężenia propofolu w surowicy z allelem c.516T genu *CYP2B6* [Kansaku *et al.*, 2012; Mastrogianni *et al.*, 2014], my zidentyfikowaliśmy homozygoty c.516T/T częściej w grupie szybko-metabolizujących propofol. Z drugiej strony, w dwóch niezależnych pracach nie wykazano żadnego związku tej zmiany sekwencji z poziomem propofolu lub jego metabolitów we krwi [Loryanet *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2014]. Przeprowadzone w omawianej pracy badania stanowiły jedną z pierwszych tak szeroko zakrojonych analiz uwzględniających podłoże genetyczne w kontekście zróżnicowanej reakcji na działanie propofolu, znacznie wzbogacając stan światowej wiedzy odnośnie personalizowanej anestezji z zastosowaniem tego anestetyku.

Na podstawie uzyskanych wyników w przedstawionym cyklu prac można wysunąć następujące wnioski:

1. Analiza genu *TPMT* wykazała, że w populacji polskiej poza powszechnie badanymi allelami *TPMT**2, *3A i *3C aktywność enzymu TPMT mogą warunkować też inne allele: *TPMT**15, *TPMT**35 i *TPMT**36. W przypadku polskich pacjentów należy rozważyć dwustopniową analizę genu *TPMT* rozszerzoną o całą część kodującą tego genu. Pierwszy etap analizy obejmujący najczęściej określenie powszechnie badanych na świecie alleli *TPMT**2, *3A i *3C oraz zmianę genu *ITPA* c.94C>A można szybko i z wysoką czułością przeprowadzić z użyciem techniki multiplexs HRMA.
2. W grupie pacjentów z NChZJ oraz z ChL-C na podstawie badań sekwencji 21 genów zaobserwowano związek wariantu polimorficznego c.2865+49T>C (rs2032583) w genie *ABCB1* z opornością na leczenie GKs. Zależność ta nie wystąpiła wśród pacjentów z WZJG, co może świadczyć o różnym podłożu reakcji na leczenie GKs pacjentów z ChL-C i WZJG.
3. W badanej grupie pacjentów z WZJG wpływ na odpowiedź na leczenie GKs mają trzy warianty: c.1088G>A (rs56149945) w genie *NR3C1*, c.241+6A> G (rs2817033) w genie *FKBP5* oraz c.306-7delT (rs61763106) w genie *MAPK14*.
4. Analiza panelu 16 genów: *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *ADAM17*, *CASP9*, *FCGR3A*, *LTA*, *TNF*, *FAS*, *IL1B*, *IL17A*, *IL6*, *MMP1*, *MMP3*, *S100A8*, *S100A9* i *S100A12*, z użyciem bibliotek amplikonowych i NGS, pozwoliła na wykrycie we wszystkich amplikonach wariantów polimorficznych w łącznej liczbie 592, co świadczy o wysokiej czułości opracowanej metodyki, która może być wydajnym narzędziem do szerokich badań farmakogenetycznych leków anty TNF.
5. Polimorfizmy genu *GSTP1* c.313A>G i c.341C>T wykazały wpływ na okołooperacyjne stężenie α -GST w surowicy i stan integralności hepatocytów u pacjentów poddawanych znieczuleniu sewofluranem.

6. Analiza genów *CYP2C9*, *CYP2B6*, *UGT1A9*, *SULT1A1*, *NQO1*, *ABCB1*, *ALB*, *GABRA1* i *ADRA1A* pozwala stwierdzić, że warianty polimorficzne genów *CYP2B6* i *ABCB1* silniej korelują z profilem metabolicznym propofolu w porównaniu z pozostałymi 7 badanymi genami i mogą odgrywać potencjalnie ważną rolę w wrażliwości na ten środek anestetyczny.

Piśmiennictwo

- Adam de Beaumais** T, Fakhoury M, Medard Y, *et al.* Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy. *Br J Clin Pharmacol.* **2011**;71(4):575–84.
- Ansari** A, Arenas M, Greenfield SM, *et al.* Prospective evaluation of the pharmacogenetics of azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2008**;28:973–83.
- Atzeni** F, Talotta R, Salaffi F, *et al.* Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev.* **2013** May;12(7):703-8.
- Bek** S, Nielsen JV, Bojesen AB, *et al.* Systematic review: genetic biomarkers associated with anti-TNF treatment response in inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* **2016**;44:554–67.
- Chaparro** M, Ordas I, Cabre E, *et al.* Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis* **2013**;19:1404–10.
- Cosnes** J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* **2011** May;140(6):1785-94.
- Clark** AR. MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol* **2003**;178:5-12.
- De Iudicibus** S, Franca R, Martelossi S, *et al.* Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2011**;17:1095-108.
- De Iudicibus** S, Lucafò M, Vitulo N, *et al.* High-throughput sequencing of microRNAs in glucocorticoid sensitive paediatric inflammatory bowel disease patients. *Int J Mol Sci* **2018**;19:E1399.
- Dideberg** V, Théâtre E, Farnir F, *et al.* The TNF/ADAM 17 system: implication of an ADAM 17 haplotype in the clinical response to infliximab in Crohn's disease. *Pharm Genom.* **2006**;16:727–34.
- Dubinsky** MC, Yang H, Hassard PV, *et al.* 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2002**;122:904–15.
- Evans** WE, McLeod HL. Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* **2003**; 348:538-49.
- Gomollón** F, Dignass A, Annese V, *et al.* 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: diagnosis and medical management. *J Crohns Colitis* **2017**;11:3-25.
- Harbord** M, Eliakim R, Bettenworth D, *et al.* Third European Evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* **2017**;11:769-84.
- Hayashi** S, Watanabe J, Kawajiri K, *et al.* Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem.* **1991**;110:559-65.
- Hlavaty** T, Pierik M, Henckaerts, *et al.* Polymorphisms in apoptosis genes predict response to infliximab therapy in luminal and fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* **2005**;22:613–26.
- <http://www.chorobacrohna.pl/aktualne-dane-2/> (Krajowy Rejestr ChL-C)
- <http://www.imh.liu.se/tpmtalleles?l5en> (wykaz alleli genu *TPMT*)
- Kansaku** F, Kumai T, Sasaki K. Individual differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anesthetic agent propofol with regard to *CYP2B6* and *UGT1A9* genotype and patient age. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2011**;26:532–7.

- Katsanos KH**, Papadakis KA. Pharmacogenetics of inflammatory bowel disease. *Pharmacogenomics*. **2014** Dec;15(16):2049-62.
- Khan**, Khan MS, Zetterlund EL, Gréen H *et al.* Pharmacogenetics, plasma concentrations, clinical signs and EEG during propofol treatment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **2014**;115:565–70.
- Koper JW**, van Rossum EF, van den Akker EL. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*. **2014**;92:62–73.
- Krupoves A**, Mack D, Deslandres C, *et al.* Variation in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) may be associated with corticosteroid dependency and resistance in children with Crohn's disease. *Pharmacogenet Genomics*. **2011a**;21:454–460.
- Krupoves A**, Mack D, Seidman E, *et al.* Associations between variants in the ABCB1 (MDR1) gene and corticosteroid dependence in children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **2011**;17:2308-17.
- Maltese P**, Palma L, Sfara C, *et al.* Glucocorticoid resistance in Crohn's disease and ulcerative colitis: an association study investigating GR and FKBP5 gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J* **2012**;12:432-8.
- Mascheretti S**, Hampe J, Kühbacher T, *et al.* Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNFreceptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharm J*. **2002**;2:127–36.
- Mastrogianni O**, Gbandi E, Orphanidis A, *et al.* Association of the CYP2B6 c.516G>T polymorphism with high blood propofol concentrations in women from northern Greece. *Drug Metab Pharmacokinet*. **2014**;29:215–8.
- McLeod HL**, Pritchard SC, Githang'a J, *et al.* Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics* **1999**;9:773–776.
- Munkholm P**, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut*. **1994**;35:360–362.
- Lindqvist M**, Haglund S, Almer S, *et al.* Identification of two novel sequence variants affecting thiopurine methyltransferase enzyme activity. *Pharmacogenetics* **2004**;14:261–265.
- Loryan I**, Lindqvist M, Johansson I, *et al.* Influence of sex on propofol metabolism, a pilot study: implications for propofol anesthesia. *Eur J Clin Pharmacol* **2012**;68:397–406.
- Pierik M**, Rutgeerts P, Vlietinck R, *et al.* Pharmacogenetics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2006**;12:3657-67.
- Prieto-Pérez R**, Almoguera B, Cabaleir, *et al.* Association between genetic polymorphisms and response to anti-TNFs in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci*. **2016**;17:e225.
- Prieto-Pérez R**, Cabaleiro T, Daudén E, *et al.* Genetics of psoriasis and pharmacogenetics of biological drugs. *Autoimmune Dis*. **2013**;2013:e613086.
- Relling MV**, Gardner EE, Sandborn WJ, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther*. **2011** Mar;89(3):387-91.
- Relling MV**, Gardner EE, Sandborn WJ, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther*. **2013**;93(4):324-5.
- Roberts RL**, Barclay ML. Current relevance of pharmacogenetics in immunomodulation treatment for Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. **2012** Oct;27(10):1546-54.
- Salavaggione OE**, Wanga L, Wiepertb M, *et al.* Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allele functional and comparative genomics. *Pharmacogenet Genomics* **2005**;15:801–815.
- Schwab M**, Schaffeler E, Marx C, *et al.* Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics* **2002**;12:429–36.
- Spire-Vayron de la Moureyre C**, Debuysere H, Mastain B, *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of the polymorphic thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT) in a European population. *Br J Pharmacol* **1998**;125:879–887.
- Ternant D**, Berkane Z, Picon L, *et al.* Assessment of the influence of inflammation and FCGR3A genotype on infliximab pharmacokinetics and time to relapse in patients with Crohn's disease. *Clin Pharmacokinet*. **2015**;54:551–62.

Thomson AB, Gupta M, Freeman HJ. Use of the tumor necrosis factor-blockers for Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. **2012** Sep 21;18(35):4823-54

Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet*. **1980**;32:651–62.

Wędrychowicz A, Tomasik P, *et al*. Prognostic value of assessment of stool and serum IL-1beta, IL-1ra and IL-6 concentrations in children with active and inactive ulcerative colitis. *Arch Med Sci* **2018**; 14:107-14.

Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, *et al*. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Ann Intern Med*. **1997**;126:608–14.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

W roku 1999 podjęłam studia na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, na kierunku biotechnologia. Realizacja pracy magisterskiej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności pt. „Zastosowanie zmodyfikowanej metody hodowli komórek Caco-2 w badaniach nad adhezją bakterii probiotycznych” pod kierunkiem dr hab. Anny Olejnik stanowiła pierwsze moje doświadczenie naukowo-badawcze. Uzyskane wówczas wyniki badań transportu atrazyny i adhezji bakterii probiotycznych dla zmodyfikowanej hodowli 6-dniowej i tradycyjnej hodowli 21-dniowej komórek Caco-2 wykazały, że zmodyfikowana krótkoterminowa hodowla komórek Caco-2 stanowi alternatywę dla długoterminowej hodowli tradycyjnej i jest w pełni przydatna w badaniach nad procesami adhezji i transportu. Wyniki zostały w późniejszym czasie opublikowane w pracy oryginalnej:

- 1) Olejnik A, Marecik R, **Skrzypczak M**, Czaczyk K, Grajek W. Application of rapid Caco-2 cell culture system in the studies on the bacterial adhesion and transepithelial transport. Polish Journal of Food And Nutrition Sciences 2008;58 (3):365-371.

Badania wykonane podczas pobytu na stażu naukowym na Uniwersytecie w Lipsku

Bezpośrednio po zakończeniu studiów w 2004 roku jako magister inżynier biotechnologii uzyskałam stypendium dla absolwentów na siedmiomiesięczny staż zagraniczny w ramach programu Leonardo da Vinci nr PL/04/A/Plc/174130 pt. „Europejska jakość w genetyce molekularnej”, który odbyłam w Instytucie Genetyki Człowieka na Uniwersytecie w Lipsku. Podczas tego pobytu w porozumieniu z Instytutem Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, z którego uzyskałam wsparcie merytoryczne i materiał DNA do badań, poza zdobyciem cennego doświadczenia zawodowego, zrealizowałam zadanie badawcze z zakresu genetyki molekularnej pt. „Częstość i spektrum mutacji w populacji polskiej z syndromem MAP (*MutYH-Associated Polyposis*)”. Zadanie badawcze polegało na określeniu mutacji w genie *MUTYH* zaangażowanym w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA u pacjentów z polipowatością rodzinną (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP), u których nie wykryto mutacji w genie supresorowym nowotworów *APC*. Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto wnioski: 1) mutacje genu *MUTYH* w badanej grupie nie warunkują występowania choroby FAP, ale nie można wykluczyć, że mogą modyfikować fenotyp; 2) kryteria stosowane w Polsce w procesie kwalifikacji FAP są bardziej rygorystyczne niż stosowane w innych krajach.

Pod koniec stażu w Niemczech pojawiła się możliwość kontynuacji pobytu w Instytucie Genetyki Człowieka na Uniwersytecie w Lipsku i pełnienia funkcji głównego wykonawcy projektu pt. „*Evaluierung der DHPLC als Verfahren zur Fragmentgrößenbestimmung bei Erkrankungen mit Trinukleotid Repeat-Verlängerung und zur Analyse hochpolymorpher Mikrosatellitenmarker für die Allelotypisierung*” finansowanego przez Max-Buchner Forschungsförderung (grant nr 2498, kierownik Prof. Ursula Froster). Podczas realizacji projektu, w styczniu 2006 roku, rozpoczęłam studia doktoranckie na Fakultecie Medycznym Uniwersytetu w Lipsku. Promotorem została pani prof. dr hab. Ursula Froster, ówczesny dyrektor Instytutu Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Lipsku. Temat pracy doktorskiej „*Evaluierung der HPLC und Long PCR als Verfahren zur Fragmentgrößenbestimmung bei Erkrankungen mit Trinukleotid-Repeat-Verlängerung*” stanowił kontynuację projektu finansowanego przez Max-Buchner Forschungsförderung. Badania miały na celu opracowanie i ocenę (walidację) nowych metod oznaczania długości

fragmentów DNA w chorobach neurodegeneracyjnych wywołanych mutacją dynamiczną, które w zależności od długości powtórzeń trinukleotydowych dzieli się na dwie grupy: a) z powtórzeniami CAG mogącymi osiągnąć ekspansję do 100, jak rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (SBMA), ataksja rdzeniowo-mózdkowa (SCA) typu 1, 2, 3, 6, 17 i choroba Huntingtona (HD) i b) z pozostałymi powtórzeniami, np. CTG w dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1), które mogą osiągnąć liczbę kilku tysięcy. Różnorodna liczba powtórzeń CAG i CTG, stawia szczególne wymagania molekularno-genetycznym metodom detekcji, które wówczas nie były zautomatyzowane. W pracy doktorskiej wykazałam, że nowe metody są czułe i dostarczają precyzyjnych wyników w porównaniu do klasycznych technik. Osiągnięcie w szczególności dotyczyło CTG z ponad 1000 powtórzeniami, których analiza została z powodzeniem przeprowadzona za pomocą znakowania fluorescencyjnego wypierając znakowanie radioaktywne. Ponadto, opracowałam metodykę syntezy sondy digoksygeninowej. Wykazano, że analizę Southern blot można całkowicie zastąpić alternatywnymi technikami, takimi jak ilościowa fluorescencyjna reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *quantitative fluorescent polymerase chain reaction*, QF PCR) połączona z reakcją typu long PCR. We wszystkich próbkach DNA z diagnozą DM1 nowa technika dała taki sam wynik, jak Southern blot.

Krótsze sekwencje powtórzeń CAG (do 100 powtórzeń) mogą być z wysoką precyzją analizowane z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), która stanowi alternatywę do standardowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE). Pomiary HPLC wykazały wysoką dokładność ± 1 powtórzenie dla prawidłowych alleli i ± 3 powtórzenia dla alleli z ekspansją w określaniu mutacji dynamicznych w SBMA, SCA1, SCA2, SCA6, SCA17 i HD w porównaniu ze standardowymi metodami. Zmierzone różnice są zgodne z zaleceniami standardów technicznych i wytycznych amerykańskiej organizacji (*American College of Medical Genetics*, ACMG) oraz wytycznymi europejskiej organizacji ds. jakości w genetyce molekularnej (*European Molecular Genetics Quality Network*, EMQN).

Jednym z istotnych wyników było innowacyjne zastosowanie metody HPLC i opracowanie metodyki do określania długości fragmentów trinukleotydowych w chorobie Huntingtona, co ma znaczenie w diagnostyce choroby i rokowaniu jej przebiegu. Metodyka umożliwiała detekcję powyżej 50 powtórzeń CTG z wysoką dokładnością w stosunku do analizy długości fragmentów z użyciem rozdziału elektroforetycznego na sekwenatorze płytowym lub kapilarnym. Osiągnięciem tym zainteresowała się firma Euro-Gene GmbH, będąca w konsorcjum z Instytutem Genetyki Człowieka Uniwersytetu w Lipsku. Przedsiębiorstwo EuroGene GmbH zostało inwestorem zgłoszenia patentowego DE20071057340, pt. *"Detecting mutations involving trinucleotide repeat sequences in genomic DNA comprises amplifying a section of the DNA and analyzing the product by denaturing HPLC"* w Europejskim Urzędzie Patentowym, w którym widnieją jak wynalazca. Prowadząc badania w Niemczech nawiązałam współpracę z Zakładem Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie (dr Anna Piątkowska-Sulek), dzięki której wzbogacona została grupa badana o próbki DNA z dużymi ekspansjami trinukleotydów w SBMA, SCA1, SCA3 i DM1.

W trakcie trwania studiów doktoranckich w 2006 roku zostałam laureatką dwóch stypendiów dla doktorantów: 1) Niemieckiej Centrali Wymiany Akademickiej (*niem. Deutscher Akademischer Austauschdienst*, DAAD) i 2) Katolickiej Centrali Wymiany Akademickiej (*niem. Katholische Akademische Ausländer-Dienst*, KAAD). Wymogi pozwalały na korzystanie z jednego stypendium, stąd przez 18 miesięcy pobierałam finansowanie z organizacji KAAD, co widoczne jest w powyżej opisanych pracach w podziękowaniach.

Z okresu pobytu w Niemczech powstały jeszcze inne prace, które ukazały się po doktoracie i powrocie do Polski. W latach 2007 i 2008 pełniąc funkcję kierownika Pracowni Genetyki Molekularnej Instytutu Genetyki Człowieka na Uniwersytecie w Lipsku prowadziłam m.in. diagnostykę molekularną dla zespołu Brooke'a-Spieglera, podczas której wykryliśmy nieopisaną wcześniej mutację przesunięcia ramki odczytu prowadzącą do przedwczesnego kodonu stop w genie *CYLD* i skrócenia białka u pacjentki afrykańskiego pochodzenia ze złośliwymi rozrostami nowotworowymi skóry twarzy. Moja rola polegała na interpretacji i opisie wyniku molekularno-genetycznego. Ten ciekawy przypadek został opisany w formie krótkiego raportu we współpracy z zespołem z Portugalii.

Uczestniczyłam również w badaniach podłoża genetycznego raka piersi finansowanych przez niemiecką organizację wspierającą walkę z rakiem *Deutsche Krebshilfe*, które dotyczyły analizy genu *CHEK2* - kinazy zaangażowanej w naprawę DNA. W ramach tych badań została opracowana metodyka do analizy najczęstszych wariantów c.1100delC, p.Ile157Thr i c.444+1G>A (IVS2+1G>A). Oznaczenia na 251 próbkach niemieckich kobiet z Saksonii, Turyngii i Saksonii-Anhalt z rakiem piersi i zdrowych wykazały, że częstości badanych *loci* genu *CHEK2* odbiegają od danych dla Niemiec, a są zbliżone z częstościami dla Polski, co może wynikać ze względów historycznych i obecności na terenach tych trzech krajów związkowych ludności pochodzenia słowiańskiego. Mój wkład polegał na opracowaniu metodyki do detekcji wyżej wymienionych zmian z użyciem DHPLC, współudziale w pisaniu manuskryptu i nawiązaniu współpracy z Zakładem Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, który udostępnił materiał referencyjny od osób z mutacjami.

Dorobek publikacyjny z pobytu na stażu obejmuje:

- 1) **Skrzypczak M**, Podralska M, Heinritz W, Froster UG, Lipiński D, Słomski R, Pławski A, MYH Gene Status in Polish FAP Patients without APC Gene Mutations. *Hered Cancer Clin Pract*. 2006 Jan 15;4(1):43-7. doi: 10.1186/1897-4287-4-1-43.
- 2) **Skrzypczak M**, Heinritz W, Froster UG. Bedeutung von Mutationen im *MYH*-Gen bei Familiärer Adenomatöser Polyposis coli (FAP). *Mitteilungsblatt der Sächsischen Krebsgesellschaft e.V.* 2006;1:16-20.
- 3) Froster UG, **Skrzypczak M**. Das Fragile-X-Syndrom. *Pädiatrische Praxis* 2007;70:481-490.
- 4) **Skrzypczak M**, Kobelt A, Froster UG. Molekulargenetische Diagnostik der Myotonen Dystrophie Typ1. Fluoreszenz contra radioaktiv markierte Southern Blot Analyse. *BIOspektrum* 2009;1(15): 44-46.
- 5) **Skrzypczak-Zielinska M**, Sulek-Piatkowska A, Mierzejewski M, Froster UG. New analysis method of myotonic dystrophy 1 based on quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Oct;13(5):651-5.
- 6) **Skrzypczak M**, Heinritz W, Schulz AM, Mierzejewski M, Froster UG. Evaluation of IP-RP-HPLC for length determination of the trinucleotide repeat fragments in Huntington's disease, *J Chromatogr Sci*, 2010 Jan;48(1):55-8.
- 7) Amaro C, Freitas I, Lamarão P, Afonso A, **Skrzypczak M**, Heinritz W. Multiple trichoepitheliomas--a novel mutation in the *CYLD* gene. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Jul;24(7):844-6
- 8) Scharrer U, **Skrzypczak-Zielinska M**, Wituszynska W, Mierzejewski M, Krause K, Cybulski C, Froster UG. A simple method of investigating mutations in *CHEK2* by

DHPLC: a study of the German populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 May;199(1):48-52.

- 9) **Skrzypczak M**, EuroGene GmbH. Zgłoszenie patentowe, numer DE20071057340, pt. Detecting mutations involving trinucleotide repeat sequences in genomic DNA comprises amplifying a section of the DNA and analyzing the product by denaturing HPLC. Europejski Urząd Patentowy 2007.

Od zakończenia doktoratu do chwili obecnej prowadzę działalność naukową w Polsce w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu w Zespole Funkcji Kwasów Nukleinowych. Po uzyskaniu stopnia doktora podejmowane przeze mnie kierunki badań molekularno-genetycznych i powstałe publikacje spoza osiągnięcia habilitacyjnego można pogrupować w 4 obszary.

Badania z zakresu zmienności genetycznej bliźniąt

Zostałam włączona do wcześniej prowadzonych przez zespół prof. dr hab. Ryszarda Słomskiego we współpracy z Zakładem Anatomii Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu (AWF) (dr hab. Małgorzata Waszak, prof. AWF dr hab. Krystyna Cieślik) badań analizy zmienności genetycznej bliźniąt, w których analizowałam polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA, heteroplazmę mitochondrialnego DNA oraz występowanie chimeryzmu komórek krwi obwodowej u bliźniąt. W latach 2010-2014 badania te uzyskały finansowanie jako projekt badawczy nr NN 303457238 pt. „Określenie stopnia determinacji genetycznej w auksologicznych badaniach prenatalnych – analiza zmienności genetycznej bliźniąt”, w którym byłam wykonawcą, a kierownikiem była prof. AWF dr hab. Krystyna Cieślik. W Polsce nie było wcześniej prowadzonych tak szerokich badań zygotywności i zmienności genetycznej bliźniąt, w celu ustalenia proporcji między zmiennością genetyczną, a środowiskową oraz określenia względnego udziału zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej cechy przy pomocy współczynników odziedziczalności. Badaniami antropologicznymi i molekularnymi objętych zostało 890 par bliźniąt pochodzących z Kliniki Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Materiałem wyjściowym do badań molekularnych była krew pępowinowa badanych bliźniąt. W Instytucie Genetyki Człowieka PAN przeprowadzona została izolacja materiału DNA i profile genetyczne w obrębie łącznie 21 *loci* zlokalizowanych na różnych chromosomach. W celu określenia stopnia heteroplazmii wykonywaliśmy również analizy porównawcze sekwencji pętli D mitochondrialnego DNA u badanych bliźniąt populacji polskiej.

Korelacja wyników badań molekularnych z monitorowaniem bliźniąt dostarcza wniosków, które pozwalają na wczesne wykrywanie zaburzeń rozwojowych występujących w ciążach wielopłodowych. Przy okazji przeprowadzania analizy, mających na celu rozstrzygnięcie zygotywności bliźniąt, wykazane zostało występowanie chimeryzmu komórek krwi na skutek przenikania komórek matki do płodu. Jest to ważna obserwacja, gdyż mikrochimeryzm może wpływać na stan zdrowia, przebieg chorób i ma ważny charakter poznawczy, np. w przypadku terapii chorób immunologicznych. Nasze obserwacje potwierdzają, że liczba błon kosmówkowych w ciąży bliźniaczej różnicuje rozwój płodów i jednokosmówkowość można uznać za istotny czynnik zagrożenia rozwoju płodu. Trafne rozpoznanie ryzyka wystąpienia powikłań może wpłynąć na zdrowie dziecka i matki. W celu zabiegów profilaktycznych i właściwej opieki w medycynie perinatalnej jest potrzeba precyzyjnej oceny tego ryzyka, czemu służyły przeprowadzone analizy zmienności genetycznej.

Dorobek publikacyjny z analizy zmienności genetycznej bliźniąt:

- 1) Waszak M, Cieślik K, Kempiać J, Słomski R, Szalata M, Wielgus K, **Skrzypczak-Zielińska M**, Bręborowicz G. Monochorionicity in twin pregnancy as a possible factor endangering fetal development. *Pediatrics Polska* 2011;86(3):228-235.
- 2) Waszak M, Cieślik K, Bręborowicz G, Kempiać J, Jasiński P, Słomski R, Wielgus K, Szalata M, **Skrzypczak-Zielińska M**. The impact of factors limiting maternal-fetal blood exchange on fetal development in twin pregnancy. *Archives of Perinatal Medicine*, 2012;18(3):142-147.
- 3) Waszak M, Cieślik K, Gadzinowski J, Bręborowicz G, Kempiać J, Szalata M, Wielgus K, **Skrzypczak-Zielińska M**, Słomski R. A health burden risk in newborns from bigeminal pregnancies conceived in vitro. *Archives of Perinatal Medicine* 2013;19(2), 107-112.
- 4) Waszak M, Cieślik K, Wielgus K, Słomski R, Szalata M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Kempiać J, Bręborowicz G. Microchimerism in twins. *Arch Med Sci.* 2013 Dec 30;9(6):1102-6.
- 5) Waszak M, Cieślik K, **Skrzypczak-Zielińska M**, Szalata M, Wielgus K, Kempiać J, Bręborowicz G, Słomski R. Heritability estimates for somatic traits determined perinatally with the twin method. *Homo.* 2015 Aug;66(4):332-42.
- 6) Waszak M, Cieślik K, **Skrzypczak-Zielińska M**, Szalata M, Wielgus K, Kempiać J, Bręborowicz G, Słomski R. Ecosensitivity and genetic polymorphism of somatic traits in the perinatal development of twins. *Homo.* 2016 Apr;67(2):138-49.
- 7) Waszak M, Cieślik K, **Skrzypczak-Zielińska M**, Szalata M, Wielgus K, Zakerska-Banaszak O, Bręborowicz G, Słomski R. Effects of Intrauterine Environment on the Magnitude of Differences Within the Pairs of Monozygotic and Dizygotic Twins. *Twin Res Hum Genet.* 2017 Feb;20(1):72-83.
- 8) Nawrocki M, Wielgus K, Szalata M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Gawrońska B, Waszak M, Cieślik K, Bręborowicz G, Seremak-Mrozikiewicz A, Słomski R. Badania DNA u bliźniąt, W: Analiza DNA – praktyka, Red, R, Słomski, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 181-216, 2014 ISBN 978-83-7160-793-9.

Określenie polimorfizmów genów warunkujących reakcję na środki anestetyczne u pacjentów w znieczuleniu ogólnym

Drugi obszar badań, dotyczący analizy polimorfizmów genów powiązanych z reakcją na środki anestetyczne u pacjentów w znieczuleniu ogólnym, był związany z rozwijającymi się po doktoracie moimi zainteresowaniami farmakogenetyką i wynikał z nawiązania współpracy z dr hab. Adamem Mikstackim oraz dr n. med. Barbarą Tamowicz z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu. Współpraca ta została ugruntowana i nabyła możliwości prowadzenia części eksperymentalnej poprzez uzyskanie finansowania z MNiSW na projekt N N401 037838, pt. „Analiza polimorfizmów genów warunkujących reakcję na środki anestetyczne u pacjentów w znieczuleniu ogólnym oraz reakcję na środki przeciwbólowe w okresie pooperacyjnym”, realizowany w latach 2010-2014 pod kierunkiem dr hab. Adama Mikstackiego. Po zapoznaniu z literaturą dokonaliśmy zarysowania problematyki, podsumowania wiedzy i opisu potencjalnych kierunków badań w dwóch pracach poglądowych: 1) dotyczącej znaczenia zmian genetycznych w działaniu powszechnie stosowanych anestetyków (sewofluranu i propofolu) oraz 2) oceny wpływu polimorfizmu genetycznego genów *CYP2E1* (cytochrom P450, rodzina 2, podrodzina E1,

podrodzina E1), *GSTA1* (S-transferaza glutationowa klasy alfa), *GSTP1* (S-transferaza glutationowa klasy pi) i znieczulenia sewofluranem na stan hepatocytów. W drugim etapie działań, podczas gromadzenia danych klinicznych i próbek od pacjentów przeprowadziliśmy badania populacyjne dla Polski w zakresie *loci* genu *UGT1A9* kodującego enzym UDP-glukuronylotransferazlukuroniltransferazę 1-9 (UGT1-9) o największym udziale w metabolizmie dożylnego środka anestetycznego - propofolu oraz genów *GSTA1* i *GSTP1* kodujących enzymy α -GST i π -GST, opisywanych jako czulsze markery uszkodzenia komórek wątroby w stosunku do wykorzystywanych standardowo w diagnostyce aminotransferaz: alaninowej i asparaginianowej (ALAT i AspAT). Właściwości te planowaliśmy wykorzystać w dalszych badaniach do monitorowania pacjentów i wystąpienia działań niepożądanych po znieczuleniu wziewnym anestetykiem - sewofluranem.

Badania 308 osób z populacji polskiej dla najczęściej opisywanych wariantów genu *UGT1A9*: *UGT1A9**3 (p.Met33Thr, c.98T>C), *UGT1A9**4 (p.Tyr242X, c.726T>G), *UGT1A9**5 (p.Asp256Asn, c.766G>A) genu *UGT1A9* z użyciem pirosekwencjonowania wykazały, że allel *UGT1A9**3 wystąpił z częstością 1,6%, wskazując na potencjalny udział w warunkowaniu międzyosobniczych zmian profilu farmakokinetycznego substancji egzogennych jak propofolu. Jednakże nie zaobserwowano w badanej grupie pozostałych zmian *UGT1A9**4 i *UGT1A9**5. Natomiast na podstawie sekwencjonowania części promotorowej i kodującej genu *GSTA1* dla 160 losowo wybranych osób populacji polskiej zidentyfikowaliśmy 8 polimorfizmów: -52G>A (rs3957356), -69C>T (rs3957357), -513A>G (rs11964968), -567T>G (rs4715332), -631G>T (rs4715333), 1066A>T (rs3756983), -1142G>C (rs58912740) i -1245G>A (rs143523660). Substytucje -52G>A, -69C>T i -567T>G stanowią 2 podstawowe allele *GSTA1**A (-52G, -69C, -567T) i *GSTA1**B (-52A, -69T, -567G), które występowały w naszej grupie populacyjnej z częstością 43,1%. Ponadto zaobserwowaliśmy, że 4 zmiany w pozycjach: -52, -69, -567 i -631 par zasad, były w silnej nierównowadze sprzężeń tworząc jeden haploblok oraz 2 zmiany: -A1066T i -G1245A, tworzą drugi haploblok. W przypadku genu *GSTP1* częstości alleli *GSTP1**A, *B i *C w populacji polskiej są zgodne z danymi z innych badaniach przeprowadzonych dla rasy kaukaskiej. W trzecim etapie badań prowadziliśmy analizy molekularne dla scharakteryzowanej klinicznie grupy 85 pacjentów poddanych znieczuleniu ogólnemu propofolem oraz 86 pacjentów poddanych znieczuleniu ogólnemu sewofluranem podczas zabiegów laryngologicznych. Pacjenci posiadali grupy I–II według skali ASA, nie mieli poważnych schorzeń i byli monitorowani w kierunku wystąpienia działań niepożądanych po znieczuleniu. Analizy korelacji wykazały, że polimorfizm c.516G>T genu *CYP2B6* warunkuje tempo metabolizmu propofolu i zmiany w tym genie mogą odgrywać istotną rolę w optymalizacji znieczulenia propofolem.

Dorobek publikacyjny z analizy polimorfizmów genów warunkujących reakcję na środki anestetyczne u pacjentów w znieczuleniu ogólnym:

- 1) Mikstacki A, **Skrzypczak-Zielinska M**, Tamowicz B, Zakerska-Banaszak O, Szalata M, Slomski R. The impact of genetic factors on response to anaesthetics. *Adv Med Sci.* 2013;58(1):9-14.
- 2) Mikstacki A, Zakerska-Banaszak O, **Skrzypczak-Zielinska M**, Tamowicz B, Szalata M, Slomski R. Glutathione S-transferase as a toxicity indicator in general anesthesia: genetics and biochemical function. *J Clin Anesth.* 2015 Feb;27(1):73-9.
- 3) Zakerska O, **Skrzypczak-Zielinska M**, Mikstacki A, Tamowicz B, Malengowska B, Szalata M, Slomski R. Genotype and allele frequencies of polymorphic *UGT1A9* in the Polish population. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2013 Sep;38(3):217-21.

- 4) **Skrzypczak-Zielinska M**, Zakerska-Banaszak O, Tamowicz B, Sobieraj I, Drweska-Matelska N, Szalata M, Slomski R, Mikstacki A. Polymorphisms and allele frequencies of glutathione S-transferases A1 and P1 genes in the Polish population. *Genet Mol Res*. 2015 Mar 31;14(1):2850-9.
- 5) Mikstacki A, Zakerska-Banaszak O, **Skrzypczak-Zielinska M**, Tamowicz B, Predecki M, Dorszewska J, Molinska-Glura M, Waszak M, Slomski R. The effect of UGT1A9, CYP2B6 and CYP2C9 genes polymorphism on individual differences in propofol pharmacokinetics among Polish patients undergoing general anaesthesia. *J Appl Genet*. 2017 May;58(2):213-220.

Określenie czynników genetycznych warunkujących nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) oraz współwystępowanie z nimi osteoporozy

Zaburzenia metabolizmu kostnego, które prowadzą do rozwoju osteoporozy, a w jej następstwie do złamań kości, stanowią jedno z częstych powikłań pacjentów z NChZJ. U blisko 60% kobiet i ok. 22% mężczyzn z NChZJ obserwuje się osteopenię, a u 15-40% dorosłych pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohn'a występuje osteoporoza. W ramach wieloletniej współpracy z pracownikami Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Dietetyki i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu jestem zaangażowana w badania nad udziałem komponenty genetycznej w występowaniu tego zjawiska u pacjentów z NChZJ. Utrzymanie prawidłowej struktury tkanki kostnej jest złożonym, wieloetapowym procesem, kontrolowanym przez wiele genów. Nasze zainteresowania skupiły się na analizie genów zaangażowanych w regulację szlaku RANKL/RANK/OPG, mianowicie gen osteoprotegeryny (*TNFRSF11B*) z rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor receptor*, TNFR), gen białka morfogenezy układu kostnego *BMP2* oraz gen transformującego czynnika wzrostu beta 1 (*TGFB1*). Moja rola w tych badaniach polegała przede wszystkim na analizie i interpretacji wyników genetycznych.

Grupę badaną stanowiło 198 chorych z NChZJ w tym 100 chorych z chorobą Leśniowskiego-Crohn'a (49 kobiet i 51 mężczyzn) i 98 chorych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (52 kobiet i 46 mężczyzn). Grupę kontrolną składała się z 41 zdrowych osób (20 kobiet i 21 mężczyzn). U wszystkich badanych przeprowadzono badanie densytometryczne kości określając gęstość mineralną kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa (L1-L4), gęstość mineralną kości szyjki kości udowej (SKU), informacje o wystąpieniu złamania lub jego braku, wagę, wzrost oraz wiek pacjenta. Analiza wyników oznaczeń parametrów klinicznych pozwoliła na stwierdzenie niższych wartości BMD odcinka L2-L4 kręgosłupa, L2-L4 *T-score*, L2-L4 *Z-score*, BMD szyjki kości udowej, *T-score* szyjki kości udowej i *Z-score* szyjki kości udowej u chorych z NChZJ w stosunku do grupy kontrolnej.

Wykazaliśmy, że w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego niskie poziomy osteoprotegeryny mogą być związane z osteoporozą, ale nie są one skorelowane z polimorfizmem -223C>T w genie *TNFRSF11B*. U pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna obserwowano zwiększone poziomy liganda receptora aktywującego jądrowy czynnik NF-κB (RANKL). Nasze obserwacje potwierdzają różną patogenezę ChL-C i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, jak również różne podłoża molekularne osteoporozy związane z tymi dwoma chorobami. Ponadto nie wykryliśmy związku pomiędzy złamaniami niskoenergetycznymi a polimorfizmami *TGFB1* u pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącymi zapaleniami jelita grubego. Nie zaobserwowaliśmy zależności między zmianą polimorficzną c.29T>C genu *TGFB1* a gęstością mineralną kości w kościach gąbczastych i korowych (odpowiednio L2-L4 i szyjka kości udowej) lub występowaniem złamań u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. W przypadku polimorfizmu c.570A>T

genu *BMP2* również nie zaobserwowaliśmy statystycznie istotnej zależności gęstością mineralną kości lub częstością występowania złamań u pacjentów z NChZJ. Natomiast badania polimorfizmu TaqI genu *VDR* wykazywały, że pacjenci z genotypem tt posiadają znamienne wyższą gęstość mineralną szyjki kości udowej niż homozygoty TT i nosiciele Tt ($p = 0,02$). Ponadto genotyp tt genu *VDR* był obecny z większą częstością u pacjentów z WZJG niż w grupie kontrolnej i u pacjentów z ChL-C (odpowiednio 23% vs 7,7% i 16,5%).

Dorobek publikacyjny z analizy polimorfizmów genów warunkujących NChZJ oraz współwystępowanie z nimi osteoporozy:

- 1) Krela-Kaźmierczak I, Kaczmarek-Ryś M, Szymczak A, Michalak M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Drwęska-Matelska N, Marcinkowska M, Eder P, Łykowska-Szuber L, Wysocka E, Linke K, Słomski R. Bone Metabolism and the c.-223C > T Polymorphism in the 5'UTR Region of the Osteoprotegerin Gene in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Calcif Tissue Int.* 2016 Dec;99(6):616-624.
- 2) Krela-Kaźmierczak I, Wawrzyniak A, Szymczak A, Eder P, Łykowska-Szuber L, Michalak M, Drwęska-Matelska N, Kaczmarek-Rys M, **Skrzypczak-Zielinska M**, Szalata M, Słomski R. Bone mineral density and the 570A>T polymorphism of the bone morphogenetic protein 2 (BMP2) gene in patients with inflammatory bowel disease: a cross-sectional study. *J Physiol Pharmacol.* 2017 Oct;68(5):757-764.
- 3) Krela-Kaźmierczak I, Michalak M, Wawrzyniak A, Szymczak A, Eder P, Łykowska-Szuber L, Kaczmarek-Ryś M, Drwęska-Matelska N, **Skrzypczak-Zielińska M**, Linke K, Słomski R. The c.29T>C polymorphism of the transforming growth factor beta-1 (TGFB1) gene, bone mineral density and the occurrence of low-energy fractures in patients with inflammatory bowel disease. *Mol Biol Rep.* 2017 Dec;44(6):455-461.
- 4) Szymczak-Tomczak A, Krela-Kaźmierczak I, Kaczmarek-Ryś M, Hryhorowicz S, Stawczyk-Eder K, Szalata M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Łykowska-Szuber L, Eder P, Michalak M, Dobrowolska A, Słomski R. Vitamin D receptor (VDR) TaqI polymorphism, vitamin D and bone mineral density in patients with inflammatory bowel diseases. *Adv Clin Exp Med.* 2019 Mar 28. doi: 10.17219/acem/97376.
- 5) Jakubowska-Burek L, **Skrzypczak-Zielińska M**, Słomski R, Dobrowolska A. Podłoże genetyczne w nieswoistych chorobach zapalnych jelit. W: *Leczenie biologiczne w dermatologii, gastroenterologii i reumatologii u dorosłych i dzieci*. Red.: Adamski Z, Linke K, Samborski W. Termedia Wydaw. Med., Poznań 2015:227-241.
- 6) **Skrzypczak-Zielińska M**, Zakerska-Banaszak O, Kaczmarek-Ryś M, Dobrowolska-Zachwieja A, Jakubowska-Burek L, Pławski A, Boruń P, Hoppe-Gołębiewska J, Hryhorowicz S, Szalata M, Hnatyszyn A, Łykowska-Szuber L, Eder P, Gabryel M, Linke K, Słomski R. Badania DNA w nieswoistych chorobach zapalnych jelit, W: *Analiza DNA – praktyka*, Red, R, Słomski, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 165-180, 2014 ISBN 978-83-7160-793-9.

Określenie czynników genetycznych zaangażowanych w rozwój nowotworów jelita grubego, żołądka i tarczycy

Moje dotychczasowe zainteresowania naukowe dotyczyły również genetyki nowotworów. Dołączyłam do badań dotyczących poszukiwania czynników genetycznych rozwoju raka żołądka u pacjentów zakażonych bakterią *Helicobacter pylori* prowadzonych przez prof. dr hab. Ryszarda Słomskiego we współpracy z dr. Andrzejem Hnatyszynem z Wielospecjalistycznego Szpitala Samodzielnego Publicznego, Zakładu Opieki Zdrowotnej

w Nowej Soli. W badaniach prowadzonych na grupie 144 pacjentów z dyspepsją czynnościową wykazaliśmy, że zmiany w genach *NOD2/CARD15* (c.802C>T) i *IL1B* (c.315C>T i c.3954C>T) zwiększają podatność na odpowiedź zapalną błony śluzowej żołądka u pacjentów zakażonych *Helicobacter pylori* i odgrywają ważną rolę w rozwoju przewlekłego aktywnego zapalenia żołądka, atrofii, metaplastji jelitowej, dysplazji i jelitowego typu raka żołądka. Wykazaliśmy, że nasilenie uszkodzenia błony śluzowej żołądka koreluje z obecnością mutacji w błonie śluzowej żołądka i wieku pacjentów. Mój udział w pracach z tego zakresu polegał na interpretacji wyników genetycznych. Ponadto uczestniczyłam w badaniach genów *CCND1* i *CHEK2* w zróżnicowanym raku tarczycy (ang. *differentiated thyroid cancer*, DTC) prowadzonych przez dr Martę Kaczmarek-Ryś we współpracy z prof. dr hab. Katarzyną Ziemnicką z Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W tych badaniach obejmujących 602 pacjentów z DTC i 829 osób grupy populacyjnej wykazaliśmy, że zmiana c.470 T>C (p.I157T, rs17879961) genu *CHEK2* w postaci heterozygoty występuje 2 razy częściej, a homozygota 13 razy częściej wśród pacjentów w stosunku do populacji. Moje zainteresowania genetyką nowotworów dotyczą też podłoża rodzinnej polipowatości gruczolakowatej (ang. *familial adenomatous polyposis*, FAP), co stanowi kontynuację badań podjętych podczas stażu absolwenckiego w Niemczech. Z tej tematyki uczestniczyłam również w opracowaniu metodyki szybkiego wykrywania mutacji punktowych i jednocześnie wariantów liczby kopii u pacjentów z FAP z zastosowaniem porównawczej wysokorozdzielczej analizy topnienia (ang. *comparative-high resolution melting*, C-HRM).

Dorobek publikacyjny z analizy polimorfizmów genów warunkujących rozwój nowotworów jelita grubego, żołądka i tarczycy:

- 1) Hnatyszyn A, Wielgus K, Kaczmarek-Ryś M, **Skrzypczak-Zielinska M**, Szalata M, Mikołajczyk-Stecyna J, Stanczyk J, Dziuba I, Mikstacki A, Słomski R. Interleukin-1 gene polymorphisms in chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* as risk factors of gastric cancer development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2013 Dec;61(6):503-12.
- 2) Hnatyszyn A, Szalata M, **Skrzypczak-Zielinska M**, Wielgus K, Stanczyk J, Dziuba I, Mikstacki A, Dobrowolska A, Waszak M, Hnatyszyn PT, Słomski R. DNA variants in *Helicobacter pylori* infected patients with chronic gastritis, dysplasia and gastric cancer. *Adv Med Sci*. 2018 Dec 13;64(1):79-84. doi:10.1016/j.advms.2018.12.002.
- 3) Hryhorowicz S, Ziemnicka K, Kaczmarek-Ryś M, Hoppe-Gołębiewska J, Pławski A, **Skrzypczak-Zielińska M**, Szkudlarek M, Gołąb M, Budny B, Ruchała M, Słomski R. *CCND1* gene polymorphic variants in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Oncol Lett*. 2015 Jan;9(1):442-448.
- 4) Kaczmarek-Ryś M, Ziemnicka K, Hryhorowicz ST, Górczak K, Hoppe-Gołębiewska J, **Skrzypczak-Zielińska M**, Tomys M, Gołąb M, Szkudlarek M, Budny B, Siatkowski I, Gut P, Ruchała M, Słomski R, Pławski A. The c.470 T>C *CHEK2* missense variant increases the risk of differentiated thyroid carcinoma in the Great Poland population. *Hered Cancer Clin Pract*. 2015 Mar 1;13(1):8.
- 5) Pławski A, Banasiewicz T, Borun P, Kubaszewski L, Krokowicz P, **Skrzypczak-Zielinska M**, Lubinski J. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Hered Cancer Clin Pract*. 2013 Oct 22;11(1):15.
- 6) Pławski A, Boruń P, **Skrzypczak-Zielińska M**, Krokowicz P, Drews M, Paszkowski J, Lubiński J, Banasiewicz T. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Post. Nauk Med*. 2015;28(1):25-33.

- 7) Borun P, Kubaszewski L, Banasiewicz T, Walkowiak J, **Skrzypczak-Zielinska M**, Kaczmarek-Rys M, Plawski A. Comparative-high resolution melting: a novel method of simultaneous screening for small mutations and copy number variations. Hum Genet. 2014 May;133(5):535-45.

Inne prace

Pozostałe prace dotyczą m.in. zastosowań metod diagnostyki molekularnej. Przykładem jest identyfikacja osobnicza człowieka w medycynie sądowej i kryminalistyce oraz analizie pokrewieństwa świń. Współuczestniczyłam w opracowaniach dotyczących diagnostyki molekularnej chorób neuromięśniowych, uwarunkowaniami genetycznymi w leczeniu łuszczycy jak również charakterystyką molekularną genów zaangażowanych w odczuwanie gorzkiego smaku kapustowatych. W ostatnim czasie moje zainteresowania naukowe dotyczyły farmakogenetycznego wpływu kannabinoidów na organizm człowieka, co związane jest z realizacją zadania nr 7 pt. „Ocena polimorfizmu i ekspresji genów uczestniczących w metabolizmie kannabinoidów i odpowiedzi na ich podanie w populacji polskiej” w projekcie „Opracowanie technologii pozyskiwania kannabinoidów z konopi o niskiej zawartości THC jako środków wspomagających leczenie pacjentów onkologicznych”.

- 1) Słomski R, Wielgus K, Gawrońska B, Szalata M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Kaczmarek-Rys M, Hoppe-Golebiewska J, Badania DNA w medycynie sądowej i kryminalistyce. W: Analiza DNA – praktyka. Red. R. Słomski. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 2014 ISBN 978-83-7160-793-9.
- 2) Gajda B, **Skrzypczak-Zielińska M**, Gawrońska B, Słomski R, Smorąg Z. Successful production of piglets derived from mature oocytes vitrified using OPS method. Cryo Letters. 2015 Jan-Feb;36(1):8-18.
- 3) Kaczmarek-Rys M, Hoppe-Golebiewska J, Plawski A, **Skrzypczak-Zielińska M**, Boruń P, Hryhorowicz S, Napierała D, Wigowska-Sowińska J, Słomski R, Badania DNA w chorobach neuromięśniowych, W: Analiza DNA – praktyka, Red, R. Słomski, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań, 165-180, 2014 ISBN 978-83-7160-793-9.
- 4) Wieczorek MN, Walczak M, **Skrzypczak-Zielińska M**, Jeleń HH, Bitter taste of Brassica vegetables: The role of genetic factors, receptors, isothiocyanates, glucosinolates, and flavor context. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(18):3130-3140. doi: 10.1080/10408398.2017.1353478.
- 5) Osmola-Mańkowska A, Teresiak-Mikołajczak E, **Skrzypczak-Zielińska M**, Adamski Z, Genetic polymorphism in psoriasis and its meaning for the treatment efficacy in the future, Postepy Dermatol Alergol. 2018 Aug; 35(4):331-337. doi: 10.5114/ada.2018.77661.
- 6) Hryhorowicz S, Walczak M, Zakerska-Banaszak O, Słomski R, **Skrzypczak-Zielińska M**, Pharmacogenetics of Cannabinoids. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2018 Feb;43(1):1-12. doi:10.1007/s13318-017-0416-z.

Szczegółowy wykaz opublikowanych prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik (nr 5) do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Marzena Skrzypczak-Zielińska