

Załącznik nr 2

**AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU
I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH**

dr n. med. Krzysztof Domagalski

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

Toruń, 2019

SPIS TREŚCI

1. IMIĘ I NAZWISKO	3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE	3
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH.....	3
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO 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.).....	4
4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	4
4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	4
4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WYŻEJ WYMIENIONYCH PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW ORAZ ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....	5
4.3.1. WPROWADZENIE.....	5
4.3.2. SZCZEGÓŁOWE OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	10
4.3.3. PODSUMOWANIE	19
4.3.4. BIBLIOGRAFIA	21
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH.....	24
5.1. PODSUMOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA WPŁYWU IF, PUNKTACJI MNISW PUBLIKACJI NIE ZGŁOSZONYCH DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO.....	24
5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA.....	24
5.3. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	25

1. IMIĘ I NAZWISKO

Krzysztof Domagalski

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

- 22.07.2014 dyplom specjalisty w zakresie analityki medycznej
Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 16.01.2013 stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
tytuł dysertacji: *„Wpływ wybranych zmienności pojedynczego nukleotydu (SNP) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C na wynik terapii przeciwwirusowej”*;
promotor: prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska, Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 05.08.2008 tytuł magistra w ramach studiów II stopnia na kierunku biotechnologia
tytuł pracy magisterskiej: *„Preparatyka całkowitego RNA z komórek szpiku dzieci wznów ostrej białaczki limfoblastycznej w kontekście analiz mikromacierzowych”*;
promotor: prof. dr hab. Andrzej Tretyn, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 28.06.2006 stopień licencjata w ramach studiów I stopnia na kierunku biotechnologia
tytuł pracy dyplomowej: *„Homologi zwierzęcych protoonkogenów i genów supresorowych u roślin”*;
promotor: prof. dr hab. Andrzej Tretyn, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

- 2016 - nadal adiunkt naukowy, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 2014 - 2016 asystent naukowy, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 2012 - 2014 specjalista biolog, Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO 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.)

4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

**Determinanty odpowiedzi na standardowe terapie
stosowane w grupie pacjentów przewlekle zakażonych
wirusami zapalenia wątroby typu B lub C**

4.2. WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl czterech oryginalnych prac i jednej pogładowej, opublikowanych w latach 2014-2018 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Wartość współczynnika oddziaływania (IF) oraz liczbę punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) dla poszczególnych prac podano zgodnie z punktacją obowiązującą w roku ich opublikowania.

1. **Domagalski K**, Pawłowska M, Zaleśna A, Tyczyno M, Skorupa-Kłaput M, Tretyn A, Halota W. *The relationship between IL28B polymorphisms and the response to peginterferon alpha-2a monotherapy in anti-HBe positive patients with chronic HBV infection*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014, 33: 2025-2033.
MNiSW = 25; IF = 2,668
2. **Domagalski K**, Pawłowska M, Zaleśna A, Pilarczyk M, Rajewski P, Halota W, Tretyn A. *Impact of IL28B and OAS gene family polymorphisms on interferon treatment response in Caucasian children chronically infected with hepatitis B virus*. World J Gastroenterol. 2016; 22: 9186-9195.
MNiSW= 25; IF = 3,365
3. **Domagalski K**, Pawłowska M, Koziulewicz D, Dybowska D, Tretyn A, Halota W. *The impact of IL28B genotype and liver fibrosis on the hepatic expression of IP10, IFI27, ISG15, and MX1 and their association with treatment outcomes in patients with chronic hepatitis C*. PLoS One. 2015; 10: e0130899.
MNiSW = 40; IF = 3,057
4. Pawłowska M, **Domagalski K**, Smok B, Rajewski P, Wietlicka-Piszc M, Halota W, Tretyn A. *Continuous up to 4 years entecavir treatment of HBV-infected adolescents - a longitudinal study in real life*. Plos One. 2016; 11: e0163691.
MNiSW = 35; IF = 2,806

5. Pawłowska M, **Domagalski K.** *Risk of HBV reactivation in patients infected with HBV/HCV treated with DAA.* Hepat Mon. 2017; 17: e12317.

MNiSW = 15; IF = 1,347

SUMARYCZNY IF OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO = 13,706

SUMA PUNKTÓW MNISW OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO = 140

Oświadczenie dotyczące mojego indywidualnego wkładu autorskiego w powstanie poniżej zaprezentowanych prac zamieszczono w Załączniku nr 4, a oświadczenia współautorów o zaangażowaniu w powstanie prac w Załączniku nr 5. W Załączniku nr 6 zebrano kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WYŻEJ WYMIENIONYCH PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW ORAZ ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

4.3.1. WPROWADZENIE

Celem prac składających się na przedstawiony cykl publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, była identyfikacja czynników predykcyjnych związanych z wynikami terapii u pacjentów przewlekle zakażonych wirusami zapalenia wątroby typu B (HBV) lub C (HCV). Badania te zostały przeprowadzone wśród pacjentów diagnozowanych i leczonych w Katedrze Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Zakażenia szeroko rozpowszechnionymi wirusami hepatotropowymi są jednym z bieżących problemów epidemiologicznych w obszarze chorób zakaźnych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia, śmiertelność z powodu następstw zakażeń wirusami hepatotropowymi systematycznie wzrasta. W 2015 roku wirusowe zapalenie wątroby doprowadziło do 1,34 miliona zgonów, spośród których 96% było wynikiem powikłań przewlekłych zakażeń odpowiednio HBV (66%) i HCV (30%) [1]. Zakażenia HBV i HCV stanowią główne przyczyny raka wątrobowokomórkowego (ang. *hepatocellular carcinoma*; HCC) i marskości wątroby powodujących odpowiednio 470 000 i 720 000 zgonów rocznie [2, 3]. Wysoka śmiertelność związana jest z bezobjawowym i utajonym charakterem przewlekłych zakażeń poprzedzających etap kliniczny, co jednocześnie skutkuje trudnościami w wykrywaniu, a tym samym obliczaniu wskaźników rozpowszechnienia zakażeń w skali całego świata. Szacuje się, że blisko 260 milionów ludzi (3,5% populacji) na całym świecie cierpi na przewlekłe zapalenie wątroby typu B (pzwb). Ta wartość dla przewlekłego

zapalenia wątroby typu C (pzwC) wynosi 71 milionów (1% populacji) [1]. Zgodnie z danymi epidemiologicznymi dla Polski szacuje się, że częstość występowania antygenu HBsAg wynosi ok. 0,9% (350 tysięcy) [4], a ok. 1,9% populacji miało kontakt z HCV, z czego ok. 0,6% tj. około 200 tysięcy mieszkańców kraju może być przewlekłe zakażonych HCV [5].

Zgodnie ze światowymi danymi nieliczne osoby z wirusowym zapaleniem wątroby zostały zdiagnozowane (9% z HBV i 20% z HCV). Wśród nich terapią objęto nieznaczny odsetek. W 2015 roku 8% osób (1,7 mln) z rozpoznaniem zakażenia HBV było w trakcie leczenia. Z kolei, 7,4% osób (1,1 mln) z rozpoznaniem zakażenia HCV rozpoczęło terapię, co stanowiło mniejszy odsetek w porównaniu do 1,7 miliona nowo wykrytych infekcji HCV w tym samym roku [1]. Na podstawie powyższych danych można wskazać główne obszary problemowe, obejmujące zarówno etap diagnozy, jak i objęcia terapią możliwie największej puli osób. W obliczu ograniczeń skuteczności terapii pzwC i pzwB, możliwości stosowania różnych leków, bądź niepotrzebnego narażania pacjenta na działania niepożądane potencjalnie nieskutecznych terapii, szczególnie tych opartych na interferonie, naturalnym kierunkiem badań było poszukiwanie oraz ocena czynników prognostycznych skuteczności terapii, celem lepszego dostosowania programu terapeutycznego do indywidualnych predyspozycji pacjenta.

Ze względu na brak swoistej szczepionki istotnym sposobem zapobiegania, zarówno rozprzestrzeniania się infekcji HCV, jak i progresji choroby jest leczenie pacjentów zdiagnozowanych [6]. Zasadniczym celem terapii zakażeń HCV jest eliminacja wirusa, wykazywana brakiem obecności jego materiału genetycznego (HCV RNA) we krwi, powiązana z normalizacją biochemiczną choroby wątroby. Punktem końcowym terapii jest uzyskanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej (ang. *sustained virologic response*; SVR), tj. niewykrywalnego HCV RNA obecnie 12, a dawniej 24 tygodnie po zakończeniu leczenia. Terapie oparte na stosowaniu pegylowanego interferonu alfa (PegIFN α) i rybawiryny (RBV) były podstawą leczenia wszystkich pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C do 2015 roku, kiedy to zarejestrowano terapie bezinterferonowe, oparte wyłącznie na lekach o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. *direct acting antivirals*; DAA), charakteryzujących się bardzo wysoką skutecznością, sięgającą 95-100%.

Mimo pewnej indywidualizacji, terapia dwulekowa PegIFN α +RBV charakteryzowała się skutecznością wynoszącą około 50%, w przypadku pacjentów zakażonych trudnymi do leczenia genotypami 1 i 4 HCV, i zdawała się być zależna od czynników osobniczych gospodarza [7]. W Polsce dominuje genotyp 1, odpowiadający za blisko 80% przypadków zachorowań [8]. W związku z niesatysfakcjonującą skutecznością klasycznej terapii

PegIFN α +RBV, a także niezadowalającym profilem jej bezpieczeństwa, prowadzono badania skoncentrowane na poszukiwaniu czynników wpływających na istotne różnice w odpowiedzi na leczenie, dawniej w celach praktycznych, obecnie głównie poznawczych. Ze względu na ograniczone znaczenie znanych już czynników prognostycznych skuteczności terapii ustalanych przed jej rozpoczęciem, związanych ze zmiennością wirusa jak i gospodarza (takich jak: genotyp wirusa, wysokość wyjściowej wirerii wiek, pochodzenie etniczne, płeć, zaawansowanie zmian morfologicznych w wątrobie, choroby współistniejące [9]), dążono się do dalszej personalizacji leczenia, opartej między innymi na indywidualnej zmienności genetycznej każdego pacjenta. Był to kierunek badań, który dawał szanse odpowiedzi na pytanie, dlaczego pacjenci charakteryzujący się podobnymi parametrami klinicznymi, różnią się w swoich reakcjach na leczenie. Przyjęto koncepcję, że podłożem zróżnicowanej odpowiedzi na terapię interferonową osób zakażonych HCV o tym samym genotypie, mogą być pierwotne właściwości genetyczne komórek układu immunologicznego, jak i hepatocytów. Mimo iż ówczesne wyniki badań wydawały się potwierdzać istnienie takich uwarunkowań genetycznych, z których najbardziej znanym była zmienność w obrębie genu interleukiny 28B (IL28B) [10], to w późniejszym czasie, wraz ze wzrostem znaczenia terapii bezinterferonowych, straciły swój wymiar praktyczny w ocenie skuteczności terapii.

PegIFN α nadal pozostaje lekiem z wyboru w leczeniu pzwB. Interferon alfa jest czynnikiem, który powoduje aktywację układu immunologicznego gospodarza stąd jego zastosowanie w terapii pzwC oraz pzwB. Aktywność przeciwwirusowa interferonów polega na aktywacji genów odpowiedzi na interferony (ang. *IFN-stimulated genes*; *ISG*), których produkty biorą udział w bezpośrednim hamowaniu replikacji wirusa w komórkach [11]. Dlatego poszukuje się czynników predykcyjnych skuteczności terapii interferonowych w obrębie genów *ISG* [12, 13]. Jest to także obszar prowadzonych przeze mnie badań, których wyniki zaprezentowane zostaną w ramach omówienia dwóch prac, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Ponieważ nie istnieje skuteczna metoda eliminacji przewlekłej infekcji HBV (utruty antygeny HBs wraz z pojawieniem się przeciwciał anti-HBs), aktualnym realistycznym celem terapii przeciwwirusowej jest ograniczanie replikacji wirusa do poziomu umożliwiającego zahamowanie lub spowolnienie stanu zapalnego i dalszego włóknienia wątroby, w celu zapobiegania klinicznym długookresowym powikłaniom w konsekwencji zakażenia. Dlatego w analizie skuteczności terapii pzwB ocenia się osiągnięcie serologicznych, wirusologicznych i biochemicznych punktów końcowych, tj. serokonwersji HBe (HBe(-), anti-HBe(+)), redukcji HBV DNA w surowicy do określonego poziomu oraz normalizacji

aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT). Jednak u pacjentów z wykrywalną wiremią po leczeniu, nie ustalono optymalnie docelowego poziomu supresji HBV DNA, zapobiegającego długoterminowym konsekwencjom zakażenia HBV. Silne powiązanie stężenia HBV DNA w surowicy z ryzykiem marskości i HCC zostało wykazane w szeroko zakrojonych, prospektywnych badaniach kohortowych [14, 15]. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że pacjenci z wysokim poziomem DNA HBV (>2000 IU/ml) mają większe ryzyko rozwoju HCC niż pacjenci z niższym poziomem DNA HBV. Stąd trwała supresja HBV DNA, najlepiej na poziomie niewykrywalnym lub przynajmniej na poziomie <2000 UI/ml, jest powszechnie akceptowalnym wskaźnikiem sukcesu terapeutycznego. Dlatego też jako wskaźnik odpowiedzi na terapię zastosowałem HBV DNA <2000 UI/ml w pracach przedstawianego osiągnięcia naukowego.

Leczenie przeciwwirusowe w pzwB należy rozważać u każdego chorego, jednak ze względu na heterogenność choroby, na ostateczną decyzję o rozpoczęciu terapii i wyborze leku ma wpływ poziom wiremii HBV, aktywność ALT oraz stopień uszkodzenia wątroby w ocenie histopatologicznej. W kwalifikacji do terapii bierze się także pod uwagę wcześniejszą historię leczenia przeciwwirusowego [16]. Jednak 48-tygodniowe podawanie pegylowanego interferonu alfa jest zalecane jako leczenie pierwszego rzutu dla dorosłych chorych na pzwB, zarówno HBeAg(+) jak i HBeAg(-). W przypadku przeciwwskazań lub braku skuteczności terapii opartej na IFN zaleca się monoterapię analogami nukleozydowymi (entekawir) lub terapię skojarzoną z analogiem nukleotydom (tenofowir). Terapia oparta na pegIFN α jest umiarkowanie skuteczna w redukcji poziomu HBV DNA w surowicy w przeciwieństwie do analogów nukleoz(t)ydowych (AN), które są wysoce skuteczne w hamowaniu replikacji HBV. Jednak w przeciwieństwie do analogów nukleoz(t)ydów, terapia oparta na pegIFN α daje bardziej trwałe efekty oraz ma wyższą efektywność serokonwersji HBsAg (zarówno w czasie leczenia, jak również po kilku latach od jego zakończenia), co stanowi najbardziej pożądany punkt końcowy jakiejkolwiek terapii przeciwwirusowej pzwB [17, 18]. W jednym z badań prezentowanego cyklu, w wyniku podjęcia leczenia pegIFN α , dwóch pacjentów (3,8%) trwale wyeliminowało wirusa. Dlatego niezbędna jest wstępna kwalifikacja osób z najwyższym prawdopodobieństwem sukcesu, skutkująca optymalizacją zastosowania danego leku w praktyce klinicznej. Podjęto wiele prób identyfikacji czynników odpowiedzi na leczenie pegIFN α u pacjentów z pzwB, co doprowadziło do identyfikacji wysokiej aktywności ALT, niskiego stężenia DNA HBV, wieku i genotypu wirusa, jako istotnych czynników predykcyjnych [19]. Jednak wszystkie te markery są dość słabymi wskaźnikami odpowiedzi IFN i mają ograniczone zastosowanie klinicznie. Dlatego

identyfikacja nowych czynników predykcyjnych odpowiedzi na leczenie oparte na IFN jest tematem podejmowanych prac. W odróżnieniu od pacjentów z pzwC wpływ polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphisms*; SNPs) *IL28B* na wyniki terapii interferonowej w pzwB jest nadal słabo poznany. W części tych badań wykazano związek między SNP *IL28B* a odpowiedziami wirusologicznymi, biochemicznymi i serologicznymi [20, 21], natomiast w innych nie stwierdzono istnienia takich zależności w końcowej ocenie wyników terapii [22, 23]. Dlatego celem moich dwóch badań było wyjaśnienia potencjalnego znaczenia SNPs *IL28B* w predykcji skuteczności terapii pegIFNα u chorych na pzwB.

Mechanizm działania AN polega na blokowaniu polimerazy HBV DNA. Mimo korzyści leczenia doustnymi AN (takich jak: silne bezpośrednie działanie przeciwwirusowe, dobra kliniczna tolerancja oraz możliwość stosowania u chorych z zaawansowaną chorobą wątroby), ma ona także swoje wady (do których należą: nieokreślony czas leczenia, nawrotowość po odstawieniu terapii, mogąca przebiegać z ciężkim zaostrzeniem choroby wątroby oraz możliwość indukcji lekooporności). U większości chorych wskazane jest długotrwałe leczenie, które można zakończyć dopiero przy zupełnym zahamowaniu replikacji. Jednak jedynym pewnym punktem docelowym dla zakończenia podawania AN, jest utrata HBsAg, optymalnie z serokonwersją do anty-HBs [16]. Brak pełnej supresji wirerii HBV DNA w trakcie terapii wiąże się z ryzykiem wystąpienia lekoopornych mutacji HBV. Ryzyko lekooporności nowszych AN, jak entekawiru (ETV) lub tenefowiru (TDF), jest niskie z uwagi na ich wysoką barierę genetyczną w terapii pierwszorazowej, jednak może wzrastać u pacjentów wcześniej leczonych analogami nukleoz(t)ydowymi [24, 25]. Ze względu na te ograniczenia prowadzone są badania nad czynnikami różnicującymi prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie AN [26, 27], co stanowi przedmiot analiz jednej z przedstawionych prac cyklu.

Pacjenci pediatryczni (<18 lat), omówieni w dwóch pracach przedstawianego cyklu, są szczególną grupą, zarówno pod względem przebiegu historii naturalnej choroby, jak i możliwości terapeutycznych. Infekcje HBV u małych dzieci często obejmują długą fazę immunotolerancji, w której pacjenci mają stwierdzoną obecność HBsAg, HBeAg, wysoki poziom HBV DNA, prawidłową aktywność ALT i brak lub tylko łagodne zapalenie wątroby w obrazie histopatologicznym wątroby [28]. Leczenie pzwB u dzieci i młodzieży budzi kontrowersje z powodu niezadowalających wyników terapii w stanach tolerancji immunologicznej w jakiej często się znajdują, a także możliwości nabycia oporności przez wirusa, z którym to ryzykiem należy się liczyć w przypadku zastosowania AN [29, 30].

Jednak postępujący przebieg pzwB u części pacjentów pediatrycznych wymaga podjęcia leczenia przeciwwirusowego, zapobiegającego odległym następstwom zakażenia, umożliwiającego ocenę wykładników skuteczności zastosowanej terapii w tej grupie pacjentów. Czas trwania leczenia oraz monitorowanie jej skuteczności są analogiczne jak w przypadku dorosłych pacjentów.

4.3.2. SZCZEGÓŁOWE OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

PUBLIKACJA 1: *The relationship between IL28B polymorphisms and the response to peginterferon alpha-2a monotherapy in anti-HBe positive patients with chronic HBV infection*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014, 33: 2025-2033.

Znaczenie SNPs genu *IL28B* w predykcji SVR u pacjentów z pzwC poddawanych leczeniu pegIFN α +RBV jest powszechnie znane. Dlatego postanowiłem sprawdzić czy istnieją ewentualne zależności między polimorfizmami *IL28B* (rs12979860, rs12980275 i rs8099917) a odpowiedzią biochemiczną i wirusologiczną na monoterapię pegIFN alfa-2a w grupie polskich pacjentów z pzwB, HBeAg(-). W tym badaniu do finalnej oceny skuteczności terapii zastosowano połączone wskaźniki odpowiedzi, jeden standardowy oraz drugi, stworzony przeze mnie na podstawie otrzymanych wyników wiremii, tj. stężenie HBV DNA <2000 IU/ml z normalizacją ALT (<40 IU/l) oraz stężenie HBV DNA <400 IU/ml z normalizacją ALT, mierzone 24 tygodnie po zakończeniu leczenia.

W analizach uwzględniających klasyczne wykładniki kliniczne stwierdzono, że wyjściowe wartości aktywności ALT i stężenia HBV DNA oraz wiek, umożliwiają przewidywanie odpowiedzi na zastosowane leczenie pegIFN α ($p < 0,05$). Ustalono, że niska wyjściowa aktywność ALT, niskie wyjściowe stężenie DNA HBV oraz młodszy wiek były predyktorami osiągnięcia połączonej odpowiedzi wirusologicznej i biochemicznej. W wyniku dalszych analiz w niniejszej pracy wykazano, że polimorfizmy *IL28B* nie wpływają na wartości analizowanych czynników prognostycznych ustalanych przed leczeniem.

W następnym etapie oceniono częstość występowania wybranych polimorfizmów *IL28B* porównując rozkład genotypu CC względem genotypów CT-TT dla markera rs12979860, AA względem AG-GG dla markera rs12980275 oraz TT względem TG-GG dla markera rs8099917 w badanych podgrupach pacjentów, ustalonych względem kryteriów finalnej odpowiedzi na leczenie. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, iż tylko marker rs12979860 znacząco wpływał na szanse powodzenia monoterapii pegIFN α , przy zastosowaniu punktu odcięcia 400 IU/ml dla stężenia HBV DNA, zarówno oddzielnie

($p=0,022$), jak i w połączeniu z normalizacją aktywności ALT ($p=0,025$). Pacjenci o genotypie CC posiadali ponad 3-krotnie mniejsze szanse uzyskania korzystnej odpowiedzi terapeutycznej w porównaniu do pacjentów posiadających genotyp CT lub TT ($OR=0,31$). Natomiast marker ten nie był związany z szeroko stosowanym punktem odcięcia HBV DNA 2000 IU/ml, ale miał istotny związek z połączoną odpowiedzią HBV DNA <2000 IU/ml + normalizacja ALT ($p=0,044$). Jednak analizy regresji logistycznej skorygowane względem wieku, wyjściowych wartości aktywności ALT oraz stężenia HBV DNA pozwoliły wykazać, że rs12979860 niezależnie prognozuje tylko jedną połączoną odpowiedź, tj. HBV DNA <400 IU/ml + normalizacja ALT oraz potwierdzić znaczenie genotypu CC rs12979860 w obniżaniu szans osiągnięcia sukcesu terapeutycznego ($OR=0,024$; $p=0,026$). Niezależnie od osiągnięcia istotności statystycznej dla różnic rozkładów genotypów analizowanych markerów zaobserwowano, że obecność homozygotycznych genotypów CC dla rs12979860, TT dla rs8099917 i AA dla rs12980275 nie jest związana z wyższym odsetkiem korzystnych odpowiedzi na stosowany lek, jak ma to miejsce w przypadku pacjentów z pzwC leczonych pegIFN α +RBV. Negatywny związek tych genotypów z podanymi wskaźnikami odpowiedzi jest sprzeczny z niektórymi badaniami przeprowadzonymi wśród pacjentów HBeAg(-) i jednocześnie zgodny z innymi opublikowanymi pracami. Porównanie otrzymanych wyników z prezentowanymi w innych badaniach światowych, przeprowadzonych wśród pacjentów HBeAg ujemnych, obarczone jest ograniczeniami ze względu na niejednorodność analizowanych kohort. Heterogenna grupa etniczna jest ściśle powiązana zarówno z genotypem *IL28B*, jak i genotypami HBV, co wpływa na zróżnicowany wpływ predykcyjny *IL28B* w różnych populacjach, co wykazano wcześniej w badaniach prognozowania wyników terapii w pzwC. Dlatego wśród badaczy istnieje pogląd, iż badania genotypu *IL28B* i odpowiedzi na pegIFN α w pzwB powinny być stratyfikowane względem genotypów HBV oraz badanej populacji. Ideę tę potwierdza fakt, iż nosiciele genotypów A i B HBV są bardziej wrażliwi na terapię IFN niż zakażeni genotypem D HBV. W badaniach europejskich moc predykcyjna SNP *IL28B* była badana w populacji zakażonej głównie genotypem D HBV, bądź w grupach mocno heterogennych pod tym względem. Mimo że w niniejszym badaniu nie określono genotypów HBV, to badania epidemiologiczne wskazują, że polscy pacjenci zakażeni są w ponad 70% genotypem A HBV. Brak przeprowadzonych badań w populacji pacjentów europejskich, gdzie dominującym wariantem jest genotyp A HBV, nadaje pewnej unikatowości uzyskanym wynikom przedstawionym w niniejszej pracy.

PUBLIKACJA 2: *Impact of IL28B and OAS gene family polymorphisms on interferon treatment response in Caucasian children chronically infected with hepatitis B virus*. World J Gastroenterol. 2016; 22: 9186-9195.

W poprzednim badaniu, obejmującym grupę dorosłych, wykazano, że markery *IL28B* wiążą się z odpowiedzią na terapię interferonową u pacjentów z pzwB, HBeAg(-). Kontynuując rozważania podjęte w pierwszej publikacji cyklu, poszukiwałem kolejnych genetycznych predyktorów powodzenia terapii interferonowej w grupie pacjentów HBeAg(-). Do badań wytypowałem syntetazy 2'-5'-oligoadenyłowe (*OAS*), należące do rodziny genów *ISG*, zaangażowane w trawienie wirusowego RNA. Ponieważ stwierdzono, że interferony alfa jak i interferony lambda, do których należy interleukina 28B mają działanie aktywujące *OAS* w komórkach hepatocytów, łączna analiza zmienności w obrębie tych genów stawała się interesującym zagadnieniem. Dodatkowo, obserwacje innych autorów wskazujące, na związek polimorfizmów typu SNP w genach rodziny *OAS* z podatnością na infekcje wirusowe, skłoniły mnie do zbadania znaczenia zmienności genów *OAS* w monoterapii pegIFN α chorych na pzwB. Dlatego celem niniejszej pracy było określenie związku pomiędzy polimorfizmami *IL28B* oraz rodziny genów *OAS* a odpowiedzią biochemiczną i wirusologiczną w grupie polskich dzieci z pzwB, HBeAg(-), leczonych pierwszorazowo monoterapią pegIFN alfa-2a przez okres 48 tygodni. Dostępna ówczesnie wiedza o związkach między polimorfizmami genów *OAS* a skutecznością leczenia pegIFN α pochodziła tylko z badań przeprowadzonych w azjatyckiej populacji pacjentów z pzwB. Niniejsza praca po raz pierwszy przedstawiła związek polimorfizmów genów *OAS* z wynikami terapii pegIFN α przeprowadzonej w grupie europejskich pacjentów z pzwB. Wybrano cztery SNPs zlokalizowane w genach *OAS1* (rs1131476), *OAS2* (rs1293747), *OAS3* (rs2072136) i *OASL* (rs10849829) oraz standardowe trzy dla *IL28B* (rs12979860, rs8099917 i rs12980275).

Skuteczność terapeutyczna została oceniona za pomocą wykładników odpowiedzi wirusologicznej i biochemicznej, uwzględniających poziom HBV DNA i aktywność ALT, 24 tygodnie po zakończeniu terapii. Granica HBV DNA 2000 IU/ml, jako najczęściej stosowana w literaturze, została przyjęta do analizy odpowiedzi wirusologicznej. Skuteczność leczenia oceniano na podstawie pełnej odpowiedzi (ang. *complete response*; CR). CR zdefiniowano jako supresję replikacji wirusa do poziomu HBV DNA <2000 IU/ml oraz normalizację aktywności ALT (<40 IU/L), mierzone 24 tygodnie po zakończeniu leczenia. Badani zostali podzieleni na grupy zależnie od uzyskanej CR.

W pierwszym etapie przeanalizowano wpływ standardowo oznaczanych przed leczeniem czynników klinicznych na sukces terapeutyczny. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic dla wyjściowych parametrów klinicznych, tj. wieku, płci, stężenia wirerii HBV DNA, aktywności ALT oraz zaawansowania zmian histopatologicznych wątroby pomiędzy pacjentami różniącymi się uzyskaną CR na zastosowane leczenie w analizowanej grupie.

W dalszym etapie sprawdzono częstość występowania alleli i genotypów badanych markerów u pacjentów z osiągniętą CR i w grupie z niepowodzeniem pełnej odpowiedzi. Wykazano statystycznie istotną zależność między rozkładem genotypów markera rs12979860 a częstością uzyskiwania CR (CC-CT vs TT; $p=0,033$). Zgodnie z uzyskanymi wynikami potwierdzono znaczenie niekorzystnego genotypu TT w szacowaniu ryzyka niepowodzenia leczenia (żaden z pacjentów o genotypie TT nie osiągnął CR). Przeprowadzone analizy genów OAS pozwoliły stwierdzić, że tylko marker OASL rs10849829 ma wpływ na ostateczny sukces terapeutyczny zdefiniowany jako CR. Mimo że nie wykazano istotnych różnic w rozkładzie alleli rs10849829 (A vs G) między pacjentami różniącymi się uzyskaniem CR, to na podstawie analizy rozkładu genotypów (AA vs AG-GG) stwierdzono, że genotyp AA rs10849829 był związany z niepowodzeniem terapii (OR=0,26; $p=0,026$). Kilku badaczy sugeruje w swoich badaniach największy wpływ markera rs2072136, jednak wyniki prezentowanej pracy nie potwierdziły jego znaczenia.

W kolejnym etapie badania przeprowadzono analizę haplotypów czterech badanych polimorfizmów genów OAS oraz trzech IL28B. Na podstawie globalnych analiz haplotypowych IL28B wykazano, że frekwencje haplotypów nie różniły się istotnie statystycznie między pacjentami o odmiennych wynikach uzyskania CR w wyniku leczenia pegIFN α . Potwierdzono natomiast korelację między haplotypami OAS a CR ($p=0,001$). Stwierdzono istnienie największych różnic w częstości występowania haplotypu GAGG OAS pomiędzy chorymi różniącymi się uzyskaniem CR (CR vs brak CR; 28% vs 3%). Haplotyp GAGG zwiększał szanse powodzenia terapii 12 razy w stosunku do pozostałych haplotypów (OR=11,96; $p=0,0003$). Reasumując, wyniki przedstawione w niniejszej pracy umożliwiły wykazanie znaczenia genotypów markera rs10849829 OASL w ocenie skuteczności terapii u pacjentów rasy kaukaskiej.

PUBLIKACJA 3: *The impact of IL28B genotype and liver fibrosis on the hepatic expression of IP10, IFI27, ISG15, and MX1 and their association with treatment outcomes in patients with chronic hepatitis C*. PLoS One. 2015; 10: e0130899.

Zagadnienie zmienności genetycznej w obrębie genów ISG i jej wpływu na wyniki protokołów terapeutycznych opartych na podawaniu interferonu, przeanalizowałem także u pacjentów z pzwC, leczonych pegIFN α /RBV. W oparciu o przesłanki literaturowe wytypowałem 4 geny ISG, potencjalnie związane z predykcją sukcesu terapeutycznego w pzwC takie jak: ISG15 (ang. *interferon-stimulated gene 15*), IFI27 (ang. *interferon alpha-inducible protein 27*), MxA (ang. *myxovirus resistance A*) oraz IP10 (ang. *interferon gamma-inducible protein 10*). Ponieważ wykazano, że aktywność przeciwwirusowa indukowana przez interferony lambda, do których należy IL28B, podobnie jak w przypadku interferonów alfa związana jest z aktywacją tych samych kluczowych genów ISG, celem niniejszego badania była analiza wpływu wątrobowej ekspresji genów IP10, IFI27, ISG15 i MX1 na wyniki leczenia pegIFN α /RBV u pacjentów z pzwC z uwzględnieniem znaczenia predykcyjnego polimorfizmów genu IL28B (rs8099917 i rs12979860). Do badania zostali włączeni pacjenci zakażeni genotypem 1 lub 4 HCV, wcześniej nieleczeni, od których pozyskano przed rozpoczęciem terapii fragment biopsji wątrobowej na potrzeby analiz molekularnych. Ze względu na badanie poziomu ekspresji genów w tkance wątrobowej istotne było uwzględnienie cech potencjalnie związanych z jej funkcjonowaniem. Określono wpływ danych klinicznych, a szczególnie zaawansowania zmian histopatologicznych w wątrobie (włóknienia i zapalenia) na różnice w ekspresji analizowanych genów oraz rozkład genotypów IL28B.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że poziomy ekspresji IP10, IFI27 i ISG15 były statystycznie istotnie wyższe u pacjentów, którzy nie osiągnęli SVR niż u pacjentów z SVR. Według tych danych pacjenci, którzy lepiej odpowiadają na leczenie, to ci o obniżonym poziomie kluczowych genów odpowiedzi układu immunologicznego na endogenne działanie interferonu. Stan ten jest korzystny, gdyż umożliwia silną indukcję odpowiedzi przeciwwirusowej przez podawany pegIFN α w momencie rozpoczęcia terapii. Jednak w przeciwieństwie do wyników prezentowanych w innych pracach, nie potwierdzono, że odpowiedź na leczenie jest istotnie związana także z ekspresją MX1. W kolejnym kroku analiz określono czy zróżnicowane poziomy ekspresji genów oraz rozkłady genotypów polimorfizmów IL28B są skorelowane z wykładnikami klinicznymi, a tym samym mogą wpływać na wyniki terapii. Wykazano, że ekspresja IP10 jest silnie związana z zaawansowaniem włóknienia wątroby ($p=0,030$), przy czym takiej zależności z innymi

danymi klinicznymi nie obserwowano dla pozostałych genów, a także dla markerów *IL28B* w analizowanej grupie pacjentów. Zaobserwowano korelację pomiędzy podwyższoną ekspresją *IP10* a progresją włóknienia. W analizach rozkładu genotypów polimorfizmów *IL28B* potwierdzono również wyższe odsetki SVR u pacjentów z genotypem rs12979860 CC i rs8099917 TT leczonych pegIFN α /RBV, przy czym znaczącą statystycznie różnicę osiągnięto dla rs12979860 (OR=6,29; p=0,004).

Dalsza analiza, pozwoliła odpowiedzieć na pytanie czy genotypy *IL28B* i ekspresja badanych *ISG* w wątrobie są ze sobą powiązane w predykcji odpowiedzi terapeutycznej. W pierwszej części analiz stwierdzono, że nie było istotnych różnic w ekspresji *IP10* między genotypami *IL28B*, podczas gdy ekspresja *IFI27*, *ISG15* i *MX1* była zależna od genotypu *IL28B*. Korzystne genotypy CC rs12979860 i TT rs8099917 były istotnie związane ze obniżoną ekspresją *IFI27*, *ISG15* i *MX1*, w porównaniu do pacjentów z genotypami CT-TT rs12979860 lub TG-GG rs8099917 (p<0,001 dla wszystkich). Zaobserwowano, że rs12979860, silniej niż rs8099917 różnicuje ekspresję analizowanych genów oraz, że największe różnice poziomu ekspresji dotyczyły *IFI27*. Następnie, wykazano za pomocą analizy regresji logistycznej, że genotyp *IL28B* (p=0,03) i ekspresja *IP10* (p=0,01) są niezależnymi wskaźnikami odpowiedzi na IFN. Zaobserwowano, że połączenie genotypu *IL28B* z wątrobową ekspresją *IP10* przed leczeniem, wyraźnie poprawia trafność przewidywania SVR u pacjentów z niekorzystnymi genotypami CT lub TT (p=0,007), zwiększając globalnie możliwości przewidywania końcowego wyniku terapii. Ustalenie związku między profilem ekspresji genów *ISG* w tkance wątrobowej a genotypami *IL28B* było tematem kilku badań, niemniej jednak wyniki przeprowadzonych analiz nie dały jednoznacznych odpowiedzi. Część prac sugeruje obecność związku, część wskazuje, że genotyp *IL28B* i ekspresja *ISG* w nie są ze sobą bezpośrednio związane i stanowią niezależne predyktory SVR. Wyniki przedstawianej pracy zdają się potwierdzać te rozbieżności i sugerują istnienie takich zależności, ale nie dla wszystkich genów *ISG*, co implikuje możliwość dalszego poszukiwania w tej grupie genów kolejnych predyktorów skuteczności terapii opartych na interferonie.

PUBLIKACJA 4: *Continuous up to 4 years entecavir treatment of HBV-infected adolescents - a longitudinal study in real life.* Plos One. 2016; 11: e0163691.

Badania opublikowane w Publikacji 1 oraz Publikacji 2 dotyczyły analiz predykcji wyników monoterapii pegIFN α u pacjentów z pzwB. Jednak nie zawsze jej użycie jest możliwe, bądź skuteczne, wskutek czego kolejną opcją terapeutyczną jest leczenie analogami

nukleoz(t)ydowymi. Dlatego w poszukiwaniu czynników prognostycznych terapii bezinterferonowych pzwB postanowiłem przeanalizować grupę dzieci i młodzieży z pzwB, leczoną entekawirem. Związek pomiędzy czynnikami ustalonymi przed, jak i w trakcie leczenia z wynikami terapii ETV nie był szeroko badany u pacjentów pediatrycznych, ze względu na niewielką liczebność badanych grup i ograniczony czas trwania terapii ETV (1-2 lata). Niniejsze badanie podłużne po raz pierwszy umożliwiło przedstawienie danych dotyczących 4-letniej monoterapii ETV w leczeniu pzwB u dzieci i młodzieży, tym samym przyczyniło się do możliwości wskazania czynników związanych z jej powodzeniem.

Badaniem podłużnym objęto 44 pacjentów objętych monoterapią ETV przez co najmniej 48 tygodni, w większości przypadków zakażonych HBV w okresie dziecięcym. Pacjentów włączono do badania z uwzględnieniem ówczesnych kryteriów kwalifikacji do leczenia. Do grupy badanej zakwalifikowano 30 dzieci, u których uprzednio wdrożono leczenie przeciwwirusowe (u 9-ciorga - interferonem (IFN), 5-ciorga - lamiwudyną (LAM) i 16-ciorga IFN i LAM). Tylko pacjenci bez obecności mutacji LAM zostali włączeni do badania. W określeniu skuteczności leczenia uwzględniono odpowiedzi wirusologiczną, serologiczną i biochemiczną, które oceniano na podstawie analizy stężenia HBV DNA, statusu HBeAg i aktywności ALT przed leczeniem oraz w trakcie leczenia (w 4, 12 i 24 tygodniu oraz co 6 miesięcy, aż do 48 miesiąca leczenia). Dodatkowo, w oparciu o wytyczne literaturowe, skuteczność leczenia określano za pomocą kryterium wskaźnika trwałej odpowiedzi (ang. *sustained response rate*; SRR). SRR zdefiniowano jako supresję replikacji wirusa do niewykrywalnego poziomu HBV DNA (<20 IU/ml), połączoną z serokonwersją HBeAg do anty-HBe (HBeAb) i normalizacją aktywności ALT (<40 IU/L) u pacjentów HBeAg(+) [8]. U pacjentów HBeAg(-), SRR zdefiniowano jako niewykrywalny poziom HBV DNA i normalizację ALT.

W pierwszym etapie analiz, określono zadane skumulowane wskaźniki skuteczności terapii ETV. Następnie oceniono wpływ poszczególnych czynników klinicznych na wyniki leczenia w kolejnych miesiącach trwania terapii ETV, tworząc modele za pomocą uogólnionych równań estymacyjnych (ang. *generalized estimating equation*; GEE). Modele GEE uwzględniają korelację między wielokrotnymi obserwacjami od tej samej osoby w wielu punktach czasowych, dlatego też są używane do analiz danych podłużnych. W pracy modelowano osiągnięcie supresji wirusologicznej do poziomu HBV DNA <20 IU/ml, normalizacji aktywności ALT, serokonwersji HBeAg i SRR podczas terapii ETV. W modelu uwzględniono współzmiennie, opisujące wyjściową charakterystykę pacjenta, takie jak: obecność HBeAg, stężenie HBV DNA, aktywność ALT, płeć, wcześniejsza terapia AN,

wyniki histopatologiczne obrazu wątroby, wiek w chwili zakażenia oraz podjęcia leczenia, a także czas trwania terapii ETV. Współzmiennie, które na podstawie statystyki Walda okazywały się wyjściowo istotne ($p < 0,05$) dla oceny danej odpowiedzi terapeutycznej, stanowiły składowe końcowego modelu predykcyjnego.

Uwzględniając modele GEE dla podgrup HBeAg(+) i HBeAg(-) wykazano, że czas terapii ETV był najważniejszym czynnikiem w prognozowaniu eliminacji HBV DNA, co potwierdza znaczenie nieprzerwanego długoletniego podawania leku w celu utrzymania niewykrywalnej wirerii. Każdego miesiąca po rozpoczęciu leczenia szanse utraty DNA HBV rosły średnio o około 5% w całej analizowanej grupie ($OR=1,05$; $p < 0,0001$). Dodatkowo na podstawie analiz stwierdzono, że obecność wirerii HBV DNA ≥ 20000 IU/ml miała niekorzystny wpływ na jej negatywizację tylko w grupie pacjentów HBeAg(+) ($OR=0,14$; $p=0,011$). Ponadto w grupie pacjentów HBeAg(-), wykorzystując analizę GEE wykazano, że zakażeni ≥ 10 lat mieli 3 razy większe szanse na osiągnięcie niewykrywalnego HBV DNA w porównaniu do zakażonych w młodszym wieku ($OR=3,67$; $p=0,028$). Wyniki te zdają się wspierać tezę, że nie jest właściwe leczenie młodszych dzieci. Z kolei wiek w momencie rozpoczęcia terapii okazał się nieistotny w modelu, co konfrontując z wysokimi wynikami supresji HBV DNA sugeruje, że leczenie młodzieży może być tak samo skuteczne, jak u dorosłych.

Nie stwierdzono istotnych czynników związanych z osiąganiem normalizacji ALT w całej grupie badanej oraz w podgrupach HBeAg(+) i HBeAg(-). Mimo że czas trwania leczenia ETV nie miał istotnego wpływu na normalizację aktywności ALT, to jednak marginalna wartość statystyki ($p=0,053$) w podgrupie HBeAg(+) może sugerować potencjalne powiązanie czasu trwania leczenia ETV z normalizacją aktywności ALT.

Czas terapii i stężenie HBV DNA stanowiły zmienne modelu istotnie wpływające na osiągnięcie serokonwersji HBeAg w grupie pacjentów HBeAg(+). Zgodnie z przedstawionym modelem wyjściowy HBV DNA ≥ 20000 IU/ml zmniejsza 5-krotnie, a każdy kolejny miesiąc terapii zwiększa o 3% szanse serokonwersji HBeAg ($OR=0,19$; $p=0,009$ i $OR=1,03$; $p=0,001$, odpowiednio). Podobnie modelowanie dla SRR wykazało, że tylko kolejne miesiące leczenia zwiększają szanse uzyskania SRR dla pacjentów HBeAg(+) ($OR=1,04$; $p=0,007$), w przeciwieństwie do pacjentów HBeAg(-), dla których żaden z analizowanych czynników nie ujawniał związku z osiągnięciem SRR. Należy wspomnieć, że wśród uwzględnionych parametrów znajdowała się zmienna wskazująca na obecność wcześniejszego leczenia LAM, jednak nie była ona istotna w przewidywaniu analizowanych odpowiedzi terapeutycznych.

Czynnikami oceniającymi skuteczności terapii są często parametry ustalane w trakcie początkowych faz leczenia. W przypadku protokołów bazujących na AN, stosowanych u pacjentów dorosłych, parametrem takim jest niewykrywalny HBV DNA w 12 miesiącu leczenia. Na podstawie analiz zaobserwowano, że pacjenci z niewykrywalnym HBV DNA (<20 IU/ml) w 6 oraz 12 miesiącu terapii posiadali istotnie statystycznie większe szanse osiągnięcia niewykrywalnych wartości HBV DNA, a także SRR w późniejszych miesiącach niż pacjenci z HBV DNA ≥ 20 IU/ml. Niewykrywalne stężenie DNA HBV w 48 miesiącu terapii stwierdzano u 93,3% i 94,4% pacjentów, którzy mieli niewykrywalny HBV DNA odpowiednio w 6 i 12 miesiącu leczenia. Istotne statystycznie zróżnicowanie obserwowano także dla wyników wirerii w 24 i 36 miesiącu terapii. Kilku pacjentów z HBV DNA ≥ 20 IU/ml w 6 i 12 miesiącu terapii osiągnęło supresję wirusologiczną w kolejnych miesiącach. Te obserwacje sugerują, że niektórzy pacjenci potrzebują więcej czasu na eliminację HBV DNA, i że wykrywalne stężenie HBV DNA w 6 lub 12 miesiącu nie przesądza o braku skuteczności leczenia. Co więcej, pacjenci z niewykrywalnym HBV w 6 lub 12 miesiącu mają większe szanse osiągnięcia SRR w 2 i 3 roku terapii niż pacjenci z HBV DNA ≥ 20 IU/ml. Na podstawie wyników przeprowadzonego badania wykazano tym samym, że niewykrywalny HBV DNA już w 6 miesiącu leczenia może być również używany w ocenie predykcji skuteczności leczenia dla kolejnych lat terapii ETV.

PUBLIKACJA 5: *Risk of HBV reactivation in patients infected with HBV/HCV treated with DAA*. Hepat Mon. 2017; 17: e12317.

Omawiane wcześniej prace oryginalne dotyczyły problemu prognozowania wyników leczenia przewlekłych infekcji HBV lub HCV. Celem niniejszej pracy poglądowej było usystematyzowanie wiedzy pochodzącej z ostatnich lat na temat reaktywacji HBV i czynników z nią związanych u pacjentów współzakażonych HCV i HBV, których poddano terapii HCV za pomocą leków przeciwwirusowych działających bezpośrednio (DAA). Wiadomo, że u współzakażonych pacjentów zakażenie HCV prowadzi do hamowania replikacji HBV, jednak do tej pory mechanizmy wirusologiczne i immunologiczne odpowiedzialne za ten stan nie zostały w pełni scharakteryzowane. Reaktywacja HBV wiąże się z możliwością tworzenia przez wirusa postaci przetrwalnikowej, którą stanowi zamknięta, kolistą nić DNA (ang. *covalently closed circular DNA*; cccDNA). W obliczu coraz powszechniej stosowanych terapii DAA opublikowano prace, w których wskazywano, że leczenie DAA u współzakażonych HCV i HBV może wywoływać zagrażającą życiu reaktywację zakażenia HBV. Możliwość reaktywacji infekcji HBV jest znana i została

udokumentowana w przypadku leczenia immunosupresyjnego pacjentów, a także podczas leczenia interferonem przeciw HCV. Jednak w przypadku zastosowania DDA jest to nowość, która wymaga zweryfikowania w badaniach klinicznych. Biorąc pod uwagę silne przeciwwirusowe działanie DAA i brak działania wobec HBV, ryzyko reaktywacji HBV może być większe w przypadku stosowania DAA w porównaniu do wcześniejszych terapii przeciw HCV opartych na bazie interferonu. Zgromadzone dotychczas dane dowodzą, że reaktywacja dotyczy głównie pacjentów z wykrywalnym HBsAg i aktywną replikacją HBV, ale może wystąpić także u pacjentów bez wykrywalnego HBsAg, z wykrywalnymi przeciwciałami anti-HBc, z aktywną replikacją HBV na różnym poziomie. Na podstawie zarejestrowanych przypadków FDA sugeruje, że reaktywacja HBV jest niezależna od genotypu HCV oraz zastosowanego schematu DAA. Mechanizm, w którym terapia DAA anti-HCV może spowodować reaktywację HBV, nie jest wyjaśniony i nie zidentyfikowano jego genetycznych markerów predykcyjnych. Sugeruje się, że ryzyko reaktywacji HBV, zależy od szeregu czynników, zlokalizowanych zarówno po stronie wirusa, jak i gospodarza. Na podstawie ogółu badań nad reaktywacją HBV można przypuszczać, że przede wszystkim jest ona uzależniona od stężenia HBV DNA. Ryzyko reaktywacji HBV jest najwyższe u pacjentów z obecnym HBsAg, najniższe u osób bez wykrywanego HBsAg, posiadających wysoki poziom neutralizujących przeciwciał anti-HBs. Zależność ta jest podstawą zaleceń w profilaktyce reaktywacji zakażenia HBV.

Wobec poważnego charakteru opisanych epizodów wytyczne Europejskiej Agencji Leków (ang. *European Medicines Agency*; EMA) dotyczące terapii zakażeń HCV odwołują się do potencjalnego ryzyka reaktywacji HBV w trakcie lub po eliminacji HCV, zalecając aby wszystkich pacjentów poddawać badaniom przesiewowym pod kątem zakażenia HBV przed rozpoczęciem leczenia DAA, jak również aby pacjentów wykazujących współzakażenie HBV/HCV monitorować i leczyć według aktualnych wytycznych klinicznych. Zalecenia te zostały także ujęte w wytycznych leczenia pzwB Polskiej Grupy Ekspertów HBV.

4.3.3. PODSUMOWANIE

Oporność terapii przeciwwirusowych jest złożonym wieloczynnikowym problemem, będącym konsekwencją wzajemnego oddziaływania zmienności wirusa oraz uwarunkowań organizmu człowieka związanych z odpowiedzią na zakażenie. Heterogenność populacji chorych, jak i wirusa, sprawia, że badania muszą obejmować poszczególne populacje pacjentów, szczególnie w przypadku prognozowania wyników terapii opartych na interferonie, którego działanie polega na aktywacji istniejących w organizmie szlaków

odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusowe. W niniejszych pracach oryginalnych opisano znaczenie wytypowanych polimorfizmów genów, będących elementami tych szlaków w ocenie skuteczności leczenia opartego na interferonie w grupach polskich pacjentów. Do najważniejszych rezultatów o charakterze poznawczym i praktycznym możemy zaliczyć wykazanie znaczenia *IL28B* w prognozowaniu odpowiedzi na terapię u pacjentów z pzwB, HBeAg(-). W przeciwieństwie do szeroko zakrojonych analiz dla pzwC, przedstawiających znaczenie korzystnych genotypów *IL28B* (CC dla rs12979860, TT dla rs8099917) w zwiększaniu szans uzyskania SVR, w niniejszych badaniach wykazano, iż nie są one w taki sam sposób skorelowane z korzystnymi odpowiedziami terapeutycznymi. Kolejnym osiągnięciem było udowodnienie, że zmienność w genach *OAS* (rs1131476 *OAS1*, rs1293747 *OAS2*, rs2072136 *OAS3* i rs10849829 *OASL*) także może wpływać na skuteczność leczenia pegIFN α u pacjentów z pzwB, HBeAg(-). Całościowy rozkład wszystkich 4 badanych polimorfizmów u danego pacjenta, ujęty w formie haplotypów, istotnie zmieniał szanse skuteczności terapii. Jednak spośród wszystkich analizowanych genów *OAS*, tylko marker rs10849829 *OASL* miał istotne znaczenie w samodzielnej predykcji efektów leczenia, zatem może on okazać się przydatny jako nowym marker prognostyczny.

W wyniku przeprowadzonych analizy ekspresji genów *ISG* wśród pacjentów z pzwC, będących przedmiotem trzeciej pracy cyklu, potwierdzono znany już, z pozoru paradoksalny, związek lepszej odpowiedzi terapeutycznej u pacjentów z obniżoną aktywnością grupy genów indukowanych interferonem oraz skorelowano go z obecnością korzystnych genotypów analizowanych markerów *IL28B*, jednak nie we wszystkich przypadkach. Nowością było wykazanie, że wątrobowa ekspresja genu *IP10*, wpływająca na końcowy wynik terapii okazała się być niezależna od markerów *IL28B*, choć zależna od stopnia zwłóknienia wątroby w pzwC. Najważniejszym osiągnięciem tej pracy o charakterze poznawczym i praktycznym, było zwrócenie uwagi na fakt, że wspólna analiza SNP *IL28B* oraz ekspresji *IP10* prowadzi do istotnego zwiększenia predykcji końcowego efektu terapeutycznego, szczególnie w grupie pacjentów o niekorzystnym genotypie markera rs12979860. W związku z tym predykcja ekspresji genu *IP10*, mogłaby stać się kolejnym użytecznym klinicznie markerem genetycznym skuteczności terapii, zwiększającym właściwości predykcyjne *IL28B*.

Wprowadzenie leczenia bezinterferonowego pzwC z wykorzystaniem DAA, znacząco poprawiło skuteczność terapii, osiągającą niekiedy 100%, co tym samym ograniczyło potrzebę poszukiwania czynników prognostycznych terapii DAA. Jednak u pacjentów współzakażonych HBV/HCV wprowadzenie wyżej wymienionego protokołu wiąże się z większym ryzykiem reaktywacji zakażenia HBV, w porównaniu do wcześniejszych terapii

przeciw HCV opartych na bazie interferonu. Mechanizm, w którym terapia DAA może spowodować reaktywację HBV, nie jest wyjaśniony. Dotychczas nie zidentyfikowano genetycznych markerów predykcyjnych reaktywacji HBV.

W prognozowaniu skuteczności leczenia bezinterferowego, zmienność szlaków interferonowych ma bardzo ograniczone znaczenie. Mechanizm działania AN (takich jak ETV) i związane z nimi schematy terapii wskazują, że skuteczność trwałej supresji replikacji HBV zwiększa się wraz z długością trwania leczenia. Na podstawie przedstawionego badania longitudinalnego wykazano, że czas trwania terapii ETV miał silny wpływ zarówno na osiągnięcie supresji wirusologicznej, serokonwersji HBeAg, jak i SRR u młodzieży. Każdego miesiąca po rozpoczęciu leczenia szanse utraty DNA HBV rosły średnio o około 5%, zaś serokonwersji HBeAg oraz SRR o około 3%. Także wyjściowa wiremia HBV DNA <20000 IU/ml oraz niewykrywalny HBV DNA w 6 miesiącu leczenia ETV miały istotne znaczenie w przewidywaniu utrzymującej się supresji wirusologicznej. Dodatkowo, elementem nowości naukowej tej pracy można także uznać wykazanie, że zakażeni ≥ 10 lat posiadali 3 razy większe szanse na osiągnięcie niewykrywalnego HBV DNA niż pacjenci zakażeni w młodszym wieku. Wyniki tego badania wspierają stanowisko części badaczy mówiące o niepodejmowaniu leczenia przeciwwirusowego u młodszych dzieci.

4.3.4. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017. Accessed by August 12, 2018. Available from: URL: <http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
2. El-Serag HB: Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012; 142: 1264-73 e1.
3. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F: Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology*, 2004; 127: S35-50.
4. Collaborators TPO: Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018; 3: 383-403.
5. Flisiak R, Halota W, Horban A, Juszczak J, Pawlowska M, Simon K: Prevalence and risk factors of HCV infection in Poland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011; 23: 1213-7.
6. Chen DS, Hamoudi W, Mustapha B, Layden J, Nersesov A, Reic T, et al: Strategies to manage hepatitis C virus infection disease burden-Volume 4. *J Viral Hepat*, 2017; 24 Suppl 2: 44-63.

7. Flisiak R, Pogorzelska J, Berak H, Horban A, Orłowska I, Simon K, et al: Efficacy of HCV treatment in Poland at the turn of the interferon era - the EpiTer study. *Clin Exp Hepatol*, 2017; 2: 138-43.
8. Panasiuk A, Flisiak R, Mozer-Lisewska I, Adamek A, Tyczyno M, Halota W, et al: Distribution of HCV genotypes in Poland. *Przegl Epidemiol*, 2013; 67: 11-6, 99-103.
9. Asselah T, Estrabaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Vidaud M, et al: Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. *Liver Int*, 2010; 30: 1259-69.
10. Jia Z, Ding Y, Tian S, Niu J, Jiang J: Test of IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients treated with PegIFN and ribavirin depends on HCV genotypes: results from a meta-analysis. *PLoS One*, 2012; 7: e45698.
11. Domagalski K, Tretyn A, Pawłowska M, Szczepanek J, Halota W: Działanie interferonów typu III i ich rola w odpowiedziach immunologicznych. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2010; 64: 522-33.
12. Asselah T, Bieche I, Narguet S, Sabbagh A, Laurendeau I, Ripault MP, et al: Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Gut*, 2008; 57: 516-24.
13. Estrabaud E, Appourchaux K, Bieche I, Carrat F, Lapalus M, Lada O, et al: IFI35, mir-99a and HCV genotype to predict sustained virological response to pegylated-interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *PLoS One*, 2015; 10: e0121395.
14. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ: Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*, 2006; 130: 678-86.
15. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, et al: Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*, 2006; 295: 65-73.
16. Flisiak R, Halota W, Jaroszewicz J, Juszczak J, Malkowski P, Pawłowska M, et al: Recommendations for the treatment of hepatitis B in 2017. *Clin Exp Hepatol*, 2017; 3: 35-46.
17. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2012; 57: 167-85.
18. Marcellin P, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, et al: Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology*, 2009; 136: 2169-79 e1-4.
19. Kau A, Vermehren J, Sarrazin C: Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*, 2008; 49: 634-51.
20. Lampertico P, Vigano M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, et al: IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2013; 57: 890-6.

21. Boglione L, Cusato J, Allegra S, Esposito I, Patti F, Cariti G, et al: Role of IL28-B polymorphisms in the treatment of chronic hepatitis B HBeAg-negative patients with peginterferon. *Antiviral Res*, 2014; 102: 35-43.
22. Holmes JA, Nguyen T, Ratnam D, Heerasing NM, Tehan JV, Bonanzinga S, et al: IL28B genotype is not useful for predicting treatment outcome in Asian chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-alpha. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013; 28: 861-6.
23. Wei L, Wedemeyer H, Liaw YF, Chan HL, Piratvisuth T, Marcellin P, et al: No association between IFNL3 (IL28B) genotype and response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-positive or -negative chronic hepatitis B. *PLoS One*, 2018; 13: e0199198.
24. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al: Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology*, 2009; 49: 1503-14.
25. Wang HM, Hung CH, Lee CM, Lu SN, Wang JH, Yen YH, et al: Three-year efficacy and safety of tenofovir in nucleos(t)ide analog-naïve and nucleos(t)ide analog-experienced chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016; 31: 1307-14.
26. Preda CM, Baicus C, Negreanu L, Tugui L, Olariu SV, Andrei A, et al: Effectiveness of entecavir treatment and predictive factors for virologic response. *Rev Esp Enferm Dig*, 2014; 106: 305-11.
27. Wong GL, Wong VW, Chan HY, Tse PC, Wong J, Chim AM, et al: Undetectable HBV DNA at month 12 of entecavir treatment predicts maintained viral suppression and HBeAg-seroconversion in chronic hepatitis B patients at 3 years. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012; 35: 1326-35.
28. Wu JF, Chang MH: Natural history of chronic hepatitis B virus infection from infancy to adult life - the mechanism of inflammation triggering and long-term impacts. *J Biomed Sci*, 2015; 22: 92.
29. Della Corte C, Nobili V, Comparcola D, Cainelli F, Vento S: Management of chronic hepatitis B in children: an unresolved issue. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014; 29: 912-9.
30. Kasirga E: Lamivudine resistance in children with chronic hepatitis B. *World J Hepatol*, 2015; 7: 896-902.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

5.1. PODSUMOWANIE WSPÓŁCZYNNIKA WPLYWU IF, PUNKTACJI MNISW PUBLIKACJI NIE ZGŁOSZONYCH DO POSTĘPOWANIA HABILITACYJNEGO

Po wyłączeniu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe jestem współautorem 12 publikacji naukowych oraz 15 doniesień zjazdowych.

Współczynnik wpływu dla pozostałych publikacji wynosi IF = **25,517**.

Suma punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla tych publikacji wynosi **249**.

Liczba cytowań dla wyżej wymienionych publikacji wynosi **128** według Google Scholar, **81** według Scopus oraz **81** według Web of Science.

Szczegółowa lista publikacji i analiza bibliometryczna przygotowana przez Bibliotekę Uniwersytecką Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przedstawiona jest w Załączniku nr 7.

5.2. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Pracę naukową rozpocząłem w roku 2003 jako student kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Moje pierwsze badania, dotyczące analiz homologii w genach związanych z kancerogenezą między roślinami a zwierzętami, stanowiły podstawę dyplomowej pracy licencjackiej. Wnioski z analizy problemowej miały unikatowy charakter i stanowiły inspirację do powstania pracy pogładowej (Kosmos, 2011; 60: 345-56).

W ramach realizacji swojej pracy dyplomowej na magisterskich studiach uzupełniających na kierunku biotechnologia, uczestniczyłem w badaniach, których celem była mikromacierzowa identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji, skorelowanej z brakiem wrażliwości na leki stosowane w terapii ostrej białaczki limfoblastycznej. Badania realizowano we współpracy z Pracownią Onkologii Klinicznej i Eksperymentalnej przy Katedrze Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, z której pochodził materiał biologiczny.

Pierwsze lata pracy badawczej umożliwiły mi poznanie kluczowych technik biologii molekularnej oraz udoskonalenie warsztatu badacza. W tym celu w 2011 roku ukończyłem roczny kurs "Nowoczesne techniki badawcze stosowane w biologii, biotechnologii i diagnostyce", prowadzony przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Ze względu na chęć implementacji nowoczesnych metod diagnostyki molekularnej w medycynie oraz dalszego rozwoju

nawiązałem współpracę z Katedrą Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu, w ramach studiów doktoranckich z zakresu nauk medycznych (2008 – 2012). Praca badawcza jakiej się wówczas podjąłem dotyczyła wpływu zmian genetycznych u człowieka na wyniki terapii interferonowej u pacjentów z pzwC. Efektem podjęcia tej tematyki badań było powstanie dwóch prac poglądowych (Postepy Hig Med Dosw, 2010; 64: 522-33; Med Sci Rev Hepatol, 2010; 10: 73-6).

Jednocześnie w trakcie trwania studiów doktoranckich brałem udział w badaniach, prowadzonych we współpracy z zespołem nefrologów Katedry Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Ich celem była ocena względnego poziomu ekspresji genów *VEGF*, *HIF-1 α* , *CTGF* w biopsatach nerkowych u chorych z przewlekłym kłębuszkowym zapaleniem nerek (Kidney Blood Press Res, 2013; 38: 83-91). Wyniki tych prac, zaprezentowane na krajowym zjeździe (XIX Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego, 2-4 VI 2011, Rzeszów), uzyskały nagrodę za najlepszy nadesłany abstrakt.

5.3. OSIĄGNIĘCIA W PRACY BADAWCZEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

W 2012 obroniłem pracę doktorską pt. „*Wpływ wybranych zmienności pojedynczego nukleotydu (SNP) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C na wynik terapii przeciwwirusowej*”, której promotorem była prof. dr hab. Małgorzata Pawłowska. Uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, dnia 16 stycznia 2013 roku uzyskałem stopnień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny. Ze względu na wartości jakie niosły wyniki badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej, została ona wyróżniona przez Radę Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Z wyników ujętych w pracy doktorskiej powstały dwie prace oryginalne w czasopismach z listy filadelfijskiej (Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013; 32: 745-54; Hepat Mon, 2013; 13: e13678) oraz doniesienia prezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Badania te miały zarówno charakter poznawczy, jak i praktyczny. Ogromną zaletą jednej z tych prac jest unikatowa analiza powyższych zależności przeprowadzona w podgrupie pacjentów pediatrycznych, podjęta jako jedna z pierwszych na świecie. W pracach tych wykazano, że markery genetyczne w obrębie *IL28B* posiadają największe znaczenie w predykcji końcowego efektu terapeutycznego, w porównaniu do poznanych już wskaźników

prognostycznych skuteczności terapii określanych przed leczeniem w grupie polskich pacjentów. Udowodniono, że spośród analizowanych zmienności genetycznych w praktyce wystarczające jest badanie najsilniejszego z analizowanych markerów - rs12979860. Marker ten stał się elementem diagnostyki pacjentów z pzwC i w programach terapeutycznych opartych na interferonie zaczął stanowić czynnik kwalifikacji pacjentów do odpowiedniego typu leczenia w Polsce, aż do momentu wprowadzenia pierwszych leków DAA. Powyższe badania zostały przeprowadzone w oparciu o grant MNiSW (promotorski), grant wewnątrzuczelniany Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu dla młodych naukowców, a także „Stypendium dla doktorantów 2008/2009 - ZPORR”, realizowane w ramach działania 2.6 „Regionalne strategie innowacyjne i transfer wiedzy” II Priorytetu ZPORR.

Po otrzymaniu stopnia doktora nauk medycznych w zakresie medycyny, moje główne zainteresowania i tematyka badawcza w dalszym ciągu dotyczyła przede wszystkim obszaru chorób zakaźnych. Zainteresowania obejmujące analizy czynników warunkujących przebieg infekcji oraz skuteczność leczenia do chwili obecnej pozostają jednym z podstawowych kierunków moich badań. Najważniejsze prace, spośród tych, których jestem współautorem, opublikowanych przed, jak i po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora, powstały we współpracy z Katedrą Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. W uznaniu wartości naukowych jakie wnosili w obszarze chorób zakaźnych, w 2015 roku otrzymałem pierwszą indywidualną „Nagrodę Naukową im. Józefa Kostrzewskiego”, przyznaną przez Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych.

W uznaniu dla znaczącego zaangażowania w badania naukowe z zakresu praktycznego zastosowania metod molekularnych w diagnostyce medycznej oraz predyspozycje do pracy laboratoryjnej zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta, następnie adiunkta w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii, UMK w Toruniu. Badania, w które się zaangażowałem realizowane są w ramach Projektu badawczego pt. „Genomika funkcjonalna w badaniach biologicznych i biomedycznych”. W czerwcu 2014 ukończyłem studia podyplomowe w zakresie analityki medycznej prowadzone przez Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Studia te umożliwiły mi uzyskanie uprawnień diagnosty laboratoryjnego, a tym samym zwiększyły kompetencje w prowadzeniu badań. Jednocześnie w tym samym roku z sukcesem ukończyłem kurs „Statystyka dla humanistów i przyrodników”, wprowadzający w arkany analiz statystycznych, których zrozumienie oraz prawidłowe stosowanie umożliwiło mi prowadzenie bardziej

zaawansowanych analiz danych w dalszych badaniach. Następstwem rozwoju w tym obszarze działalności naukowej była pomyślna realizacja stażu naukowego w ramach projektu „Staż Sukcesem Naukowca III edycja”, którego celem był rozwój współpracy sfery nauki i przedsiębiorstw w zakresie wprowadzania innowacji. Wyniki tych prac były prezentowane na krajowych konferencjach. W uznaniu dla systematycznego rozwoju i uzyskanych osiągnięć naukowych otrzymałem w 2014 roku indywidualną nagrodę III stopnia Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz w późniejszym okresie zostałem powołany na członka Rady Naukowej Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu.

W swojej dotychczasowej pracy poświęcałem głównie uwagę aplikacyjnym aspektom prowadzonych przeze mnie badań podstawowych. Starałem się również uczestniczyć w realizacji projektów o charakterze interdyscyplinarnym. Z tego też względu w latach 2015-2018 zaangażowałem się w prowadzenie uczelnianej spółki *spin-off* GENELYTICA sp. z o.o., a od 2017 roku w ramach ICNT nawiązałem współpracę naukową z Pracownią Genetyki Nowotworów w Toruniu.

W omawianym okresie zaangażowałem się również w realizację projektów we współpracy z innymi zespołami naukowymi Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, UMK w Toruniu oraz ICNT UMK. Moja rola polegała przede wszystkim na wykorzystaniu doświadczenia i wiedzy w stosowaniu technik analizy kwasów nukleinowych, jak również analizy statystycznej uzyskiwanych wyników badań eksperymentalnych oraz ich interpretacji.

Zaangażowałem się przede wszystkim w istotny dla mnie obszar badawczy związany tematyką chorób onkologicznych. Z tego też względu uczestniczyłem, jako wykonawca w realizacji grantu NCN pt. „*Mikromacierzowe profilowanie genomu i transkryptomu w dziecięcej ostrej białaczce mieloblastycznej w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za lekooporność*”, prowadzonego we współpracy z Katedrą Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu. Celem prowadzonych badań było określenie korelacji pomiędzy profilem oporności *in vitro* na leki przeciwbiałaczkowe, profilem ekspresji genów i obecnością zmian cytogenetycznych. Na podstawie przeprowadzonych badań z wykorzystaniem technologii mikromacierzy ekspresyjnych i porównawczej hybrydyzacji genomowej określono genetyczne profile oporności dla 11 leków, co umożliwiło identyfikację genów odpowiedzialnych za brak wrażliwości komórek białaczkowych. W ostatnim etapie badań wytypowano 23 geny kandydackie i określono korelację zmian poziomu ekspresji z profilem oporności *in vitro* każdego leku. Owocem powyższej współpracy są 3 doniesienia konferencyjnych, których jestem współautorem (57th ASH Annual Meeting and Exposition, 5-8 XII 2015, Orlando,

Floryda; 2nd Central European Biomedical Congress, 15-18 VI 2016, Kraków; V Polski Kongres Genetyki, Łódź, 19-22 IX 2016).

Moje zainteresowania naukowe dotyczą także określenia użyteczności molekularnych markerów w prognozowaniu powstawania i przebiegu nowotworów. W projekcie, prowadzonym wspólnie z Oddziałem Chemioterapii Nowotworów, Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. L. Rydygiera w Toruniu, uczestniczyłem w identyfikacji nowych markerów prognostycznych raka płuc. Na podstawie przeprowadzonych badań, wykazaliśmy istotne powiązanie zmian genetycznych dla genu *CYP1B1* z ryzykiem rozwoju raka płuc w grupie osób palących. Tym samym wykazaliśmy, że analiza zmienności *CYP1B1* może być przydatna do identyfikacji pacjentów ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka płuc. Wyniki tej pracy zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Future Oncol, 2018; 14: 1569-77) oraz zaprezentowane na konferencji zagranicznej (ESMO Congres, 07-11 X 2016, Kopenhaga).

Sprawując funkcję promotora pomocniczego lek. Beaty Smok, doktorantki na Wydziale Lekarskim Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu, zaangażowałem się w projekt dotyczący znaczenia cytokiny IL6, markera sTREM-1 oraz innych rutynowo oznaczanych markerów stanu zapalnego (CRP, PCT, WBC) w przebiegu procesów zapalnych u pacjentów pediatrycznych. Badania ostatnich lat coraz lepiej dokumentują rolę interleukin i ich zmienności w patogenezie chorób o podłożu zapalnym. Dlatego też, w ramach tego projektu postanowiliśmy sprawdzić czy określanie stężenia IL-6, sTREM-1 w surowicy oraz zmian polimorficznych w obrębie *IL6* pozwala z większą czułością i swoistością niż markery oznaczane dotychczas rutynowo, określić przebieg uogólnionej reakcji zapalnej i sepsy u pacjentów poniżej 18 r.ż.. W wyniku przeprowadzonych analiz została przygotowana praca doktorska lek. Beaty Smok pt. „*Wartość diagnostyczna i prognostyczna sTREM-1 w przebiegu uogólnionej reakcji zapalnej i sepsy u dzieci oraz polimorfizm IL-6 jako czynnik ryzyka rozwoju uogólnionej reakcji zapalnej i sepsy*”, obroniona we wrześniu 2018 roku.

Prace kooperacyjne dotyczą również zastosowania technik biologii molekularnej w analizie roślinnego i zwierzęcego materiału tkankowego. Pierwszą z nich były badania prowadzone przez zespół fizjologów z Katedry Biotechnologii i Fizjologii Roślin, których celem była analiza wpływu stresu solnego na zmiany transkryptomów liści buraka *Beta vulgaris ssp. Maritima*, halofitycznego przodka buraka cukrowego. Wykorzystanie techniki sekwencjonowania RNA (RNASeq) pozwoliło na wykrycie wielu nowych genów, potencjalnie powiązanych ze zwiększoną tolerancją zasolenia u *B. vulgaris ssp. maritima*.

Wśród genów ekspresowanych różnicowo zidentyfikowano również takie, których funkcja biologiczna jeszcze nie została poznana, i które tym samym stanowią doskonały materiał do dalszych analiz, potencjalnie prowadzących do opisanie nowych mechanizmów tolerancji zasolenia. Efekty tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Plant Sci, 2016; 243: 56-70).

Nawiązałem również współpracę naukową z Zakładem Immunologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, UMK w Toruniu w ramach grantu NCN pt. „*Niski poziom endogennego glutationu jako przyczyna braku gorączki podczas infekcji i procesu zapalnego*”, w którym byłem jednym z wykonawców. Projekt ten podejmował problem braku gorączki stymulującej układ immunologiczny do walki z patogenami w procesie zdrowienia. Celem tych badań było wyjaśnienie roli glutationu (jako kofaktora uczestniczącego w produkcji prostaglandyny E2, będącej kluczowym mediatorem gorączki) w sytuacjach braku gorączki podczas infekcji oraz wyjaśnienie mechanizmu inhibicji modelowej gorączki infekcyjnej w warunkach obniżonego poziomu glutationu w organizmie. Wyniki badań w których uczestniczyłem opublikowano w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Cytokine, 2017; 90: 31-7).

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki stanowi odrębny załącznik (nr 4) do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Krzysztof Domagalski