

---

## **Autoreferat**

*/do wniosku o wszczęcie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego - załącznik 2/*

### **Opis dorobku i osiągnięć naukowych, zawodowych i dydaktycznych**

---

**Dr n. med. Barbara Zapala**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Mikrobiologii Farmaceutycznej

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej

Kraków, 2024

**SPIS TREŚCI**

<b>1. ŻYCIORYS NAUKOWY I PRZEBIEG KARIERY NAUKOWEJ</b> .....	3
1.1. DANE OSOBOWE.....	3
1.2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....	3
1.3. PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ I INFORMACJE NA TEMAT DOTYCHCZASOWEGO ZATRUDNIENIA W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH I MEDYCZNYCH .....	4
1.3.1. Przebieg pracy naukowej i zawodowej.....	4
1.3.2. Przebieg pracy dydaktycznej.....	11
1.3.3. Staże zagraniczne.....	13
1.3.4. Wybrane, zrealizowane kursy i szkolenia.....	15
1.3.5. Inna działalność, w tym członkostwo w towarzystwach naukowych.....	18
1.3.6. Nagrody.....	19
1.3.7. Projekty.....	19
1.3.7.1. <i>Projekty własne poza działalnością statutową UJCM</i> .....	19
1.3.7.2. <i>Projekty własne realizowane w ramach finansowania z dotacji statutowej UJCM</i> .....	20
1.3.7.3. <i>Udział w projektach</i> .....	21
<b>2. PRZEDSTAWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO</b> .....	22
2.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	22
2.2. CYKL TRZECH PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....	22
2.3. PUBLIKACJE.....	23
2.4. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WYŻEJ WYMIENIONYCH PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH WYKORZYSTANIA.....	23
2.4.1. Wstęp.....	23
2.4.2. Cele szczegółowe przeprowadzonych badań.....	26
2.4.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego.....	26
2.4.3.1. <i>Publikacja numer 1</i> .....	26
2.4.3.2. <i>Publikacja numer 2</i> .....	28
2.4.3.3. <i>Publikacja numer 3</i> .....	31
2.4.4. Podsumowanie.....	36
<b>4. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH</b> .....	37
4.1. PUBLIKACJA NUMER 1.....	38
4.2. PUBLIKACJA NUMER 2.....	39
4.3. PUBLIKACJA NUMER 3.....	40
4.4. PUBLIKACJA NUMER 4.....	42
4.5. PUBLIKACJA NUMER 5.....	43
4.6. PUBLIKACJA NUMER 6.....	45

## 1. Życiorys naukowy i przebieg kariery zawodowej

### 1.1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Barbara Zapala  
Data i miejsce urodzenia: 05.09.1982 Tarnów  
Email: [barbara.zapala@uj.edu.pl](mailto:barbara.zapala@uj.edu.pl)

### 1.2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- - 1997 - 2001

I Liceum Ogólnokształcące im. Kazimierza Brodzińskiego w Tarnowie, uzyskanie świadectwa dojrzałości.

- 2001 - 2006

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, specjalność neurobiologia, uzyskanie tytułu magistra.

- 2005 - 2007

IGNATIANUM, Wyższa Szkoła Filozoficzno-Pedagogiczna w Krakowie, studia podyplomowe i uzyskanie dyplomu z pedagogiki.

- 2007 - 2012

Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Lekarski studia doktoranckie na wydziale lekarskim, uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych.

- 2007 - 2012

Postgraduate School of Molecular Medicine, Warszawski Uniwersytet Medyczny, uzyskanie tytułu doktora nauk medycznych.

- 2013 - 2015

Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Analityka Medyczna, studia podyplomowe, uzyskanie dyplomu ukończenia analityki medycznej oraz prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego z wpisem do Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

- 2013 - 2015

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Prawa i Administracji, studia podyplomowe z Prawa Dowodowego zakończone uzyskaniem dyplomu.

- **2015 – 2022**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum Wydział Farmaceutyczny, Zrealizowanie programu Specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej, planowane zakończenie i uzyskanie dyplomu specjalisty na wiosnę 2024 roku.

- **2023 –**

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum Wydział Farmaceutyczny, rozpoczęcie 4-letniego programu specjalizacji z Mikrobiologii Medycznej.

- **2023 –**

Rozpoczęte postępowanie, przez Dyrektora Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, o uznanie dorobku naukowego lub zawodowego za równoważne ze zrealizowaniem programu szkolenia specjalizacyjnego w dziedzinie Molekularnej Genetyki Medycznej, w oczekiwaniu na decyzję.

### **1.3. Przebieg pracy zawodowej i informacje na temat dotychczasowego zatrudnienia w jednostkach naukowych i medycznych**

#### **1.3.1. Przebieg pracy naukowej i zawodowej**

Po ukończeniu I Liceum Ogólnokształcącego, im. Kazimierza Brodzińskiego w Tarnowie i uzyskaniu świadectwa dojrzałości, w 2001 roku, rozpoczęłam dzienne studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie. Będąc na drugim roku studiów, z uwagi na swoje zainteresowania, w zakresie funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego oraz chorób neurodegeneracyjnych i innych związanych z dysfunkcjami układu nerwowego, trafiłam do Zakładu Neuroanatomii (obecnie Pracownia Neuropatologii Doświadczalnej) i Zespołu kierowanego przez Pana prof. dr hab. Krzysztofa Janeczko oraz Pani prof. dr hab. Zuzanny Setkowicz-Janeczko. Był to niezwykle istotny dla mnie czas rozwoju, nie tylko zainteresowań, ale również początku mojej kariery zawodowej. Pod kierownictwem Pana Profesora Janeczko i Pani Profesor Setkowicz-Janeczko, zaangażowałam się w realizację projektu, dotyczącego patomechanizmu epilepsji. Badania prowadziłam z wykorzystaniem modelu zwierzęcego, na szczurach rasy Wistar. Efektem realizacji tego projektu jest publikacja mojego współautorstwa, o tytule „Neocortical injuries at different developmental stages determine different susceptibility to seizures induced in adulthood”, która ukazała się w czasopiśmie *Epilepsy Research*, w 2006 roku. W pracy tej opisaliśmy przebieg eksperymentu, który dostarczył dowodów

na to, że etap rozwoju, w którym mózg jest uszkodzony, determinują obserwowane zmiany epileptyczne. Studia magisterskie ukończyłam broniąc pracy o tytule „Neurodegeneracyjne zmiany rdzenia kręgowego wywołane epilepsją”, która to praca stanowiła uwieńczenie rozwijanych w trakcie studiów zainteresowań, zaangażowania w podejmowane dodatkowe prace badawczo-naukowe, dzięki motywacji i merytorycznemu wsparciu jakie otrzymałam w Zakładzie Neuroanatomii.

Na ostatnim roku studiów magisterskich wyjechałam na stypendium, w ramach programu SOKRATES/ERASMUS, do Francji. We Francji, zostałam włączona do Zespołu kierowanego przez Profesora Philippe Leroux oraz Profesora Vincenta Laudenbacha i Stéphane Marreta, w Szpitalu Pediatriczno-Neonatalnym oraz na Wydziale Farmacji i Medycyny, Uniwersytetu Medycznego w Rouen. Podczas pobytu we Francji, zrealizowałam projekt, w ramach którego prowadziłam badania, z wykorzystaniem metod genetyki molekularnej, na mysim modelu, odzwierciedlającym wpływ uszkodzeń istoty białej mózgu oraz odpowiedzi ze strony układu odpornościowego u wcześniaków. Na zakończenie rocznego pobytu we Francji, popelniałam pracę magisterską w języku angielskim, której promotorem był Prof. Philippe Leroux. Popelniona rozprawa nosi tytuł: „Research of inflammation markers in ibotenic acid-evoked excitotoxic lesion in neonatal mice cortex”. Dzięki pobytowi w Rouen po raz pierwszy zapoznałam się z metodami genetyki molekularnej i zaczęłam rozwijać nie tylko swoje zainteresowania ale również dalszą karierę zawodową w tym właśnie kierunku.

W 2006, po powrocie z Francji oraz po ukończeniu studiów magisterskich na Uniwersytecie Jagiellońskim, rozpoczęłam 6-miesięczny staż, pod kierownictwem Pani Profesor Aldony Dembińskiej-Kieć, w Katedrze Biochemii Klinicznej, na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. W trakcie stażu, zostałam włączona do Zakładu Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki, kierowanego wówczas przez dr n. med. Marka Bodziocha i brałam udział w licznych pracach badawczych skoncentrowanych głównie na chorobach neurodegeneracyjnych (przede wszystkim chorobie Parkinsona i Alzheimer) i chorobach rzadkich. W trakcie stażu, wykonywałam badania diagnostyczne (między innymi zespołu Retta - analiza mutacji w genie *MECP2*, choroby Huntingtona – analiza powtórzeń CAG, choroby Charcot-Marie-Tooth typu1 - analiza regionu kodującego gen *PMP22*). Posługiwałam się i rozwijałam swoje doświadczenie, w zakresie takich technik molekularnej genetyki jak: sekwencjonowanie sangerowskie (praca na 16-kapilarnym sekwenatorze 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems), PCR (termocyklery zwykłe i gradientowe), Real-time PCR (system Real-Time PCR 7900 Fast) oraz metodyka oparta o procedury Taqman Real-Time PCR (system ViiA 7 Real-Time

PCR). W tamtym okresie, podejmowałam również czynności z zakresu diagnostyki, w ramach funkcjonujących w Katedrze Biochemii Klinicznej następujących pracowni: Pracownia Biologii Molekularnej i Genetyki Medycznej (numer KIDL 2214), Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Patogenów (numer KIDL 2660), oraz Pracownia Wirusologiczna (numer KIDL 2662).

W 2007 roku, rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, jednocześnie pozostając pracownikiem zatrudnionym w ramach realizowanych w Katedrze Biochemii Klinicznej projektów, we współpracy polsko-norweskiej, i innych kierowanych przez Panią Profesor Aldonę Dembińską-Kieć. Aktywnie uczestniczyłam w takich projektach jak: BIOCLAIMS (FP7: 244995: 7th Framework Programme: „BIOmarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food”), projekt Polsko-Norweski (Polish-Norwegian Research Fund (OPI/EEA ), MITOFOOD (COST Action FA0602 MITOFOOD: „Bioactive Food Components, Mitochondrial Function and Health) oraz NuGO FP6-2002-FOOD 506360 „European Nutrigenomics Organisation – Linking genomics, nutrition and health research”). Był to okres, podczas którego odbyłam liczne szkolenia z zakresu technik omicznych, w ośrodkach przede wszystkim zagranicznych (wykazane poniżej), opanowałam techniki sekwencjonowania następnej generacji NGS oraz zaczęłam posługiwać się technikami mikromacierzowymi, które wykorzystałam do opracowania metody służącej do analizy mechanizmów epigenetycznych, między innymi metylacji. Przede wszystkim, moim osiągnięciem wówczas, było opracowanie protokołu do analizy acetylacji histonów w oparciu o mikromacierze. Temat mojej pracy doktorskiej obejmował badania z zakresu molekularnej genetyki medycznej. W oparciu o technikę sekwencjonowania prowadziłam badania na nowo odkrytych peptydach humaniny, u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona.

W trakcie trwania studiów doktoranckich realizowanych, na Uniwersytecie Jagiellońskim, zdecydowałam się rozpocząć studia doktoranckie, na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, które zrealizowałam w wymiarze 5-letnim, w języku angielskim, w dziedzinie Molekularnej Medycyny, w Postgraduate School of Molecular Medicine. Zarówno studia doktoranckie na Uniwersytecie Jagiellońskim, jak i te realizowane na Uniwersytecie Warszawskim zakończyłam z sukcesem, broniąc przygotowane rozprawy doktorskie oraz uzyskując tytuł doktora nauk medycznych, w 2012 roku.

Od 09.01.2008 do 30.09.2009 roku pracowałam, w wymiarze 1/3 etatu i kolejno od 01.10.2009 do 31.08.2010 roku, w wymiarze ¼ etatu, na stanowisku starszego referenta na etacie naukowo-technicznym, w Katedrze Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, będąc jednocześnie studentką studiów doktoranckich.

Od 01.09.2009 do 30.06.2011 roku byłam zatrudniona na stanowisku asystenta, w wymiarze ½ etatu, w Katedrze Biochemii Klinicznej, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Od 1.10.2011 roku, zostałam włączona do grona Pracowników naukowo-dydaktycznych i rozpoczęłam pracę na stanowisku adiunkta, w wymiarze pełnego etatu, na czas nieokreślony. Na tym stanowisku, w Katedrze Biochemii Klinicznej UJCM, pełniłam powierzone mi obowiązki naukowe i dydaktyczne do dnia 30 września 2023 roku. Od dnia 1 października 2023 roku, rozpoczęłam pracę na tym samym stanowisku w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej, na Wydziale Farmaceutycznym, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum.

Będąc pracownikiem Katedry Biochemii Klinicznej UJCM, brałam czynny udział w realizowanych projektach naukowych, a jednocześnie przyczyniłam się w znacznym stopniu do rozwoju działalności diagnostycznej, zwłaszcza w oparciu o techniki genetyki molekularnej, jakich nauczyłam się podczas pobytu w Rouen oraz doskonaliłam na licznych stażach i kursach polskich i zagranicznych (wykazanych poniżej). Z ważniejszych, które w znaczący sposób przyczyniły się do rozwoju diagnostyki klinicznej i mojej kariery naukowej oraz zawodowej, jest to, że brałam udział w optymalizacji i realizacji (Katedra Biochemii Klinicznej UJCM - jako podmiot podwykonawczy) badań chimeryzmu hematopoetycznego u pacjentów z rozpoznaną białaczką, po przeszczepach. We współpracy z Pracownią Diagnostyki Molekularnej Zakładu Diagnostyki Hematologicznej Szpitala Uniwersyteckiego wzięłam udział w opracowaniu metody, w oparciu o sekwencjonowanie sangerowskie oraz z wykorzystaniem analizy długości fragmentów DNA, do wykrywania mutacji w egzonie 9 oraz w egzonie 13 genu kalretikuliny należącej do markerów molekularnych o znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym, u chorych na nadpłytkowość samoistną (ET) oraz samoistne włóknienie szpiku (MF). Metoda ta została opisana w publikacji z moim współautorstwem oraz została wdrożona do praktyki klinicznej jako przesiewowa w diagnostyce ET oraz MF. Praca o tytule „Wykrywanie mutacji w genie CALR oraz w genie ASXL1 u chorych na nadpłytkowość samoistną i samoistne włóknienie szpiku przy pomocy sekwencjonowania Sangera oraz analizy długości fragmentów DNA” ukazała się w czasopiśmie *Acta Haematologica Polonica*, w roku 2018.

Od 2014, rozpoczęłam współpracę z Zespołem z Kliniki Chorób Metabolicznych i Diabetologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. W ramach tej współpracy wykonywałam sekwencjonowanie (metodą Sangera) oraz brałam udział w projektowaniu panelu AmpliSeq (NGS, Illumina) do diagnostyki i różnicowania różnych typów cukrzycy typu MODY. Wykonywałam również analizy wyników (sekwencjonowania następnej generacji) genów odpowiedzialnych za występowanie różnych form cukrzycy typu MODY. Efektem tej współpracy jest kilka prac z moim

współautorstwem, opublikowanych na łamach literatury międzynarodowej, wykazanych w załączonym wykazie publikacji.

W 2015 roku, zidentyfikowałam i opisałam nowy patogenny wariant w genie *TAZ* występujący w postaci mozaikowej w DNA z krwi obwodowej i komórek nabłonkowych. Odkrycie to, było o tyle ważne, że pokazało nowy mechanizm dziedziczenia, sprzężonego z chromosomem X zespołu Bartha i konieczność diagnostyki molekularnej tej choroby, obejmującej dwie lub więcej tkanek, celem wykluczenia obecności mozaicyzmu genetycznego (publikacja opisana poniżej oraz w załączonym wykazie publikacji).

Od 2016 roku do dziś, współpracuję z Wojewódzkim Specjalistycznym Szpitalem Dziecięcym im. św. Ludwika w Krakowie oraz z Katedrą Pediatrii Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, w Krakowie. W ramach tej współpracy, prowadzę badania z zakresu badań podstawowych (celem wykrycia patomechanizmów) oraz diagnostycznych (celem molekularnego różnicowania różnych fenotypów) w zakresie chorób rzadkich, wieku dziecięcego i młodzieńczego. Przede wszystkim, są to różne postaci kliniczne mukopolisacharydoz, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, rzadkie zespoły genetyczne (jak: zespół Ehlersa-Danlosa, choroba Pompego, choroba Fabry'ego). W ramach tej współpracy, udało się zdiagnozować i opisać drugi w Polsce, bardzo rzadki, przypadek mukopolisacharydozy VI. Obecnie, prowadzimy badania u pacjentów z zespołem Ehlersa-Danlosa, w ramach których przewidujemy możliwość zidentyfikowania molekularnym mechanizmów (na poziomie mRNA i niekodujących RNA) odpowiedzialnych za występowanie i progresję choroby. W kontekście chorób rzadkich udało mi się zoptymalizować metody diagnostyki molekularnej wszystkich, do tej pory poznanych typów, mukopolisacharydoz oraz stworzyć panel AmpliSeq typu „custom” (NGS, Illumina) do diagnostyki rzadkich zespołów chorobowych, jak choroba Pompego czy choroba Fabry'ego.

W 2017 roku, nawiązałam współpracę z Pracownią Biologii Molekularnej. Kliniki Gastroenterologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, gdzie odbyłam staż z zakresu sekwencjonowania następnej generacji, na poziomie RNA. Zapoznałam się wówczas z platformą IonTorrent i aparatami S5 oraz Ion Proton. Opanowane wówczas techniki sekwencjonowania wykorzystałam do przeprowadzenia analiz RNA-seq, w mikropęcherzykach pochodzących z moczu, od Pacjentów z przewlekłą cukrzycą (praca została opublikowana i pozostaje w wykazie publikacji). Praca ta, powstała jako efekt kilkuletniej współpracy z Panią Prof. dr hab. med. Ewą Łucją-Stępień, kierownikiem Zakładu Fizyki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.



W latach 2018-2019, we współpracy z Panią dr n. med. Martą Liburą, z Kliniki Chorób Wewnętrznych Hematologii i Onkologii Szpitala Medycznego, Uniwersytetu Warszawskiego wzięłam udział w procesie standaryzacji oceny wariantów genetycznych w genie *FLT3* w ośrodkach polskich, w ramach programu UPDATE.

Od 2020 roku, zaczęłam wykorzystywać techniki sekwencjonowania do analizy mikrobiomów, zarówno bakteryjnych, archeonów, ale również mykobiomów. W tym zakresie, oprócz opanowanej całej procedury laboratoryjnej, od izolacji DNA bakteryjnego, grzybiczego z różnych materiałów biologicznych (wymazy, kały, tkanki, wydzieliny) ludzkich i zwierzęcych, poprzez przygotowanie bibliotek genetycznych, opanowałam również bioinformatyczne opracowanie i analizę wysokoprzepustowych danych surowych, typu FASTQ. Rozwój w tym kierunku, przyczynił się do nawiązania współpracy z licznymi Zespołami, w ramach Uniwersytetu Jagiellońskiego (tutaj przede wszystkim współpraca z II Katedrą Chirurgii Ogólnej UJCM, Katedrą Mikrobiologii UJCM, Katedrą Otolaryngologii UJCM, Katedrą Endokrynologii Ginekologicznej UJCM, Oddziałem Klinicznym Kliniki Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, Grupą Badawczą Spektroskopii Chiroleptycznej z Wydziału Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego), a także spoza Uniwersytetu Jagiellońskiego (m. in. Współpraca z Katedrą Neurologii, Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Oddziałem Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej, Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, w Warszawie, Zakładem Genetyki, Centrum Onkologii - Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie, w Warszawie, Zakładem Medycyny Sportowej i Żywienia Człowieka, Instytutu Nauk Biomedycznych, Akademii Wychowania Fizycznego, w Krakowie, z Zakładem Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej, Instytutu Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka, w Warszawie, Zakładem Dietetyki Sportowej, Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku, oraz Instytutem Psychologii, Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie). Dowodem tych współprac są liczne publikacje na łamach literatury światowej (w załączonym wykazie publikacji).

W 2021 roku, zainteresowałam się techniką digital PCR (dPCR), w kontekście analizy długości telomerów. We współpracy z firmą Qiagen udało mi się, w sposób szczegółowy, opracować protokół umożliwiający analizę długości telomerów, za pomocą metody dPCR. Na chwilę obecną metoda ta jest wykorzystywana w ramach podjętej współpracy z różnymi Zespołami, w tym również ośrodkami zagranicznymi, m.in. z Litwy.

W 2022 roku, otrzymałam finansowanie w ramach konkursu: „Wsparcie rozwoju kompetencji twardych” – Nabór I - POB qLIFE. Dzięki temu finansowaniu, odbyłam 8-dniowy

kurs, zorganizowany przez Europejskie Towarzystwo Cytogenetyki, w Tyrolu, we Włoszech, gdzie zdobyłam wiedzę teoretyczną i praktyczną w zakresie cytogenetyki, na temat: prenatalnej diagnostyki cytogenetycznej (w szczególności na temat mozaiki i chimery, zjawiska imprintingu i disomii uniparentalnej), epidemiologii aberracji chromosomowych, aberracji chromosomowych w poronieniach samoistnych i martwych urodzeniach, oceny ryzyka związanego z występowaniem aberracji chromosomowych, zmienności genomowej, aneuploidii chromosomowej oraz przedimplantacyjnej diagnostyki cytogenetycznej. Ponadto, pozyskałam wiedzę z zakresu najnowszych wytycznych, związanych z kwestią etyczną diagnostyki cytogenetycznej. W zakresie wiedzy praktycznej, opanowałam posługiwanie się programami i technikami cytogenetycznymi (NGS, tablice SNP, macierze array-CGH) oraz pozyskałam wiedzę na temat metod analitycznych, w zakresie rozpoznawania i interpretacji wyników związanych z różnego rodzaju aberracjami chromosomowymi (ocena wyników MLPA, QF-PCR, FISH). Zdobyłam również, wykorzystywane do tej pory, umiejętności posługiwania się ISCN (z ang. International System for Human Cytogenomic Nomenclature) i prawidłowej interpretacji zapisu wyniku według rekomendowanej nomenklatury cytogenetycznej.

Od maja 2023 roku, pełnię funkcję kierownika Pracowni Diagnostyki Molekularnej, w Zakładzie Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, gdzie z sukcesem wykorzystuję i wdrażam do praktyki diagnostycznej i klinicznej moje doświadczenie, wiedzę w zakresie najnowszych technik molekularnej genetyki. W tym krótkim okresie czasu, od momentu zatrudnienia, udało mi się, wprowadzić nowe testy diagnostyczne, w kierunku diagnostyki molekularnej chorób tropikalnych i innych, rzadko występujących patogenów. Jednym z ważniejszych osiągnięć tego okresu, jest zoptymalizowanie i wdrożenie do praktyki klinicznej molekularnej diagnostyki sepsy bezpośrednio z materiału biologicznego, w postaci krwi pełnej, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynu stawowego, moczu czy też popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych i wydzielin z dróg rodnych. Diagnostyka molekularna sepsy opiera się o hybrydową technologię, łączącą w sobie reakcję PCR, cylindryczną mikromacierz oraz sekwencjonowanie enzymatyczne. Ponadto, na chwilę obecną z Zespołem Neonatologów Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie oraz we współpracy z dwoma firmami, opracowujemy metodę szybkiej identyfikacji wirusa CMV u noworodków oraz w mleku matki, w oparciu o wysokoczułą technikę dPCR.

Od 2022 roku, pełnię funkcję eksperta w zespole 5, powołanym w ramach Krajowej Rady do spraw Chorób Rzadkich. W tym samym czasie, podjęłam funkcję eksperta w Agencji Badań Medycznych oraz Ekspert Naczelnej Komisji Bioetycznej do Spraw badań Klinicznych, przy Agencji Badań Medycznych.

### 1.3.2. Przebieg pracy dydaktycznej

Od momentu objęcia obowiązków asystenta (od 2009 rok) i kolejno adiunkta (od 2011 rok), rozpoczęłam aktywności w zakresie dalszego rozwoju, nie tylko naukowego, ale również dydaktycznego.

Pełniąc funkcje adiunkta, prowadziłam przede wszystkim zajęcia dla Studentów Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, z Diagnostyki Laboratoryjnej i Nutrigenomiki, ale również dla Studentów z Wydziału Nauk o Zdrowiu i ze Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców. Rok rocznie, opiekowałam się również Studentami z Analityki Medycznej, podczas odbywanych przez nich praktyk wakacyjnych. Prowadziłam również zajęcia w ramach kursów specjalizacyjnych organizowanych dla Lekarzy, realizujących programy specjalizacyjne.

W roku 2016, założyłam pierwsze studenckie koło naukowe o nazwie pierwotnej, SKN przy Zakładzie Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki, która później uległa zmianie na „STN Nutrigenomiki”. W roku 2018, założyłam drugie studenckie koło naukowe „STN Badań nad Kawą”. Oba koła funkcjonowały pod moją opieką, w Katedrze Biochemii Klinicznej i zrzeszały Studentów Wydziału Lekarskiego oraz Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Wraz ze Studentami obu kół naukowych, prowadziłam prace naukowo-badawcze oraz przygotowywałam granty, składane w ramach konkursów organizowanych przez Studenckie Towarzystwo Naukowe (Granty STN) oraz Narodowe Centrum Nauki (PRELUDIUM). W roku akademickim 2019/2020, koło „SKN Nutrigenomiki” podjęło współpracę z Uniwersytetami Trzeciego Wieku. W ramach tej współpracy, organizowałam spotkania, na których prowadzone były wykłady i organizowane warsztaty, na temat diety, zdrowego stylu życia, w połączeniu z elementami nauki i klinicznymi aspektami. Współpraca została nawiązana z następującymi placówkami: Uniwersytetem Trzeciego Wieku Akademii Prądnicki Senior, Uniwersytetem Trzeciego Wieku Nowohuckiej Akademii Seniora, Uniwersytetem Trzeciego Wieku Politechniki Krakowskiej, Uniwersytetem Trzeciego Wieku Uniwersytetu Jagiellońskiego. W roku akademickim 2019/2020, „STN Nutrigenomiki” za swoją działalność naukową otrzymało Nagrodę Rektora UJCM za Najlepsze Studenckie Koło Naukowe, Zrzeszone w Studenckim Towarzystwie Naukowym.

W roku 2018 zostałam nominowana przez Studentów do nagrody „Przyjaciel Studenta” (jako jedna z 10 spośród wszystkich wykładowców Uniwersytetu Jagiellońskiego).

W 2019 roku, wraz ze Studentami koła „STN Nutrigenomiki” przygotowałam i finalnie otrzymałam projekt pt.: ”Analiza wpływu metabolomu witaminy D na występowanie i przebieg choroby Parkinsona”, na finansowanie w wysokości 200 000 PLN. Finansowanie to przyznane

zostało przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach konkursu „Najlepsi z najlepszych! 4.0.”, w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Wyniki uzyskane podczas realizacji tego projektu zostały zaprezentowane na renomowanych konferencjach, m. in.: 62th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, w Kyoto, w Japonii; 6th Pacific Rim Conference, w Melbourne, w Australii; 49th Meeting of the European Brain and Behavior Society, w Lozannie, w Szwajcarii; 14th Serbian Nutrition Society Congress of Nutrition, w Belgradzie, w Serbii; XXXIX Congreso Latinoamericano De Neurocirugia, w Guayaquil, w Ekwadorze oraz 2021 International Conference of Korean Movement Disorder Society, w Seoulu, w Korei.

W 2020 roku zostałam laureatem konkursu Mistrzowie Dydaktyki - Edycja 2020. W ramach tego projektu zrealizowałam 2-letni program, podczas którego szkoliłam (m. in. na Uniwersytecie w Gandawie, w Belgii) swoje umiejętności dydaktyczne. Opanowałam nowe techniki oparte na tutoring, które z dużym powodzeniem i akceptacją ze strony Studentów wdrażałam, wypełniając obowiązki na stanowisku adiunkta, nauczyciela akademickiego. Techniki nowoczesnych metod nauczania, w trakcie przeprowadzonych, na UJCM, hospicacji zostały ocenione przez Gremium hospitujące na oceny wyróżniające.

W roku 2023 wzięłam udział w prowadzeniu kursu podnoszącego kwalifikacje kadry medycznej udzielającej świadczeń zdrowotnych, w tym w związku z chorobą zakaźną, w szczególności COVID-19”, nr POWR.07.01.00-00-0002/22-00 realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 Oś Priorytetowa VII Wsparcie REACT- EU dla obszaru zdrowia w latach 2022 – 2023.

W 2023 roku, we współpracy z Uniwersytetem Medycznym w Bydgoszczy zostałam zaangażowana w realizację projektu zgłoszonego przez Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, finansowanego przez Agencję Badań Medycznych. Projekt ten ma na celu stworzenie i realizację autorskiego programu studiów podyplomowych w naukach medycznych i nosi tytuł "Nowoczesne metody molekularne w medycznym laboratorium diagnostycznym".

W roku akademickim 2023/2024 wzięłam udział w prowadzeniu zajęć w ramach studiów Drug Discovery and Development (DDD), które koncentrują się na wszystkich aspektach identyfikacji i opracowywania nowych leków. Studia zraszają Studentów zarówno polskich, jak i zagranicznych i mają na celu przygotowanie wysokiej klasy specjalistów, posiadających unikalne połączenie zaawansowanej wiedzy teoretycznej z zakresu pracy nad lekami.

W kontekście działalności dydaktycznej, pragnę również nadmienić, iż jestem także zapraszana na spotkania, o różnym charakterze czy to konferencyjnym czy aplikacyjnym przez Firmy oraz Towarzystwa Naukowe, gdzie mam przyjemność wygłaszać wykłady, poza działalnością dydaktyczną, prowadzoną na UJCM. Dla przykładu, wykłady prowadzone na zaproszenie w ramach: spotkań Polskiego Towarzystwa Diagnostów Laboratoryjnych, w Krakowie (na temat technologii NGS w mikrobiologii), II Konferencji Naukowo-Szkoleniowej "Zakażenia w ginekologii, położnictwie, neonatologii i pediatrii" w Warszawie (na temat molekularnej diagnostyki sepsy), Konferencji „Nowotwory Rzadkie, Choroby Rzadkie i Ultraradkie”, w Warszawie (na temat technologii BGS w diagnostyce chorób rzadkich i ultraradkich), spotkania aplikacyjnego organizowanego przez Firmę Altona Diagnostics, w Barcelonie (na temat diagnostyki molekularnej chorób zakaźnych) czy spotkania aplikacyjnego organizowanego przez Illumina (na temat technik NGS).

### **1.3.3. Staże zagraniczne**

W przebiegu i rozwoju mojej kariery, zarówno naukowej, jak i zawodowej, odbyłam kilka istotnych, z punktu widzenia tego rozwoju, ale również z uwagi na renomę ośrodków, w których miałam okazję realizować, zaplanowane programy stażowe.

W 2016 roku, tuż po zakończeniu studiów magisterskich, przed rozpoczęciem pracy w Katedrze Biochemii Klinicznej, zrealizowałam 6-miesięczny staż, w Zakładzie Genetyki i Nutrigenomiki, Katedry Biochemii Klinicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Podczas stażu, zostałam zaangażowana w prace badawczo-rozwojowe z zakresu molekularnych mechanizmów chorób neurodegeneracyjnych i rzadkich (choroby jednogenowe, w tym wiele takich, które dotychczas nie były diagnozowane w Polsce na poziomie molekularnym m.in. ceroidolipofuscynoza neuronalna, zespół Retta, oznaczanie liczby kopii genów SMN1 i SMN2 u chorych na rdzeniowy zanik mięśni u bezobjawowych nosicieli, zespół Bartha, adrenoleukodystrofia, choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona i inne). Opanowałam wówczas różne techniki molekularne sekwencjonowania, analiza mikrosatelitarna, analiza układów STR, analiza chimeryzmu hematopoetycznego, prace w zakresie technik epigenetycznych takich jak: metylacja i acetylacja histonów, RFLP, Real-Time PCR, analiza fragmentów, badania z zastosowaniem elektrody tlenowrażliwej Oxygraph-2k. Realizacja tego stażu zaowocowała rozpoczęciem studiów doktoranckich na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Drugim, bardzo ważnym dla mojego doświadczenia w dziedzinie molekularnej genetyki medycznej, był 4-miesięczny (w 2016 roku) staż w Instytucie Genetyki i Rozwoju oraz w Szpitalu Uniwersyteckim w Rennes, we Francji (z. *franc.* Institut de Génétique & Développement de Rennes, oraz CHU Rennes - Centre Hospitalier Universitaire de Rennes), gdzie w pełni nauczyłam się technik sekwencjonowania najnowszej generacji, w zakresie sekwencjonowania małych genomów, egzomów oraz sekwencjonowania całogenomowego, w oparciu o platformy Illumina (MiniSeq, MiSeq i NextSeq).

W 2017 roku, wyjechałam na 3-miesięczny staż do Stanów Zjednoczonych. Staż ten zrealizowałam na University of Georgia w Athens. Był to staż, w ramach realizacji projektów (mających na celu identyfikację markerów genetycznych w otyłości olbrzymiej), w jakie wówczas byłam zaangażowana, we współpracy z II Katedrą Chirurgii Ogólnej UJCM. Efektem tego stażu była realizacja projektu o tytule „Badanie zmian preferencji żywieniowych i zapachowych oraz ich wpływu na długoterminową utratę masy ciała u pacjentów po zabiegach bariatrycznych”, realizacja pracy magisterskiej (o tym samym tytule), której byłam promotorem oraz podjęcie dalszej współpracy z II Katedrą Chirurgii Ogólnej UJCM.

W 2017 roku, po powrocie z USA, odbyłam tygodniowy staż w Centrum Onkologii- Instytutu im. Marii Skłodowskiej Curie, w Warszawie. Staż zorganizowany był przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego. Program obejmował szkolenia z zakresu sekwencjonowania następnej generacji (z. *ang.* Next Generation Sequencing), obejmował m. in. przygotowanie bibliotek genetycznych oraz naukę obsługi różnych platform do sekwencjonowania (Ion GeneStudio S5 , Ion PGM, Ion Proton Sequencer), w ramach platformy Ion Torrent. Realizacja tego stażu, również przyczyniła się do nawiązania współpracy z Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie oraz innymi ośrodkami. Dzięki pozyskanej wiedzy i nawiązanej współpracy, zostałam włączona w realizację dwóch projektów. Jeden we współpracy z Zakładem Fizyki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, którego efektem jest praca naukowa o tytule „miRNA Signature of Urine Extracellular Vesicles Shows the Involvement of Inflammatory and Apoptotic Processes in Diabetic Chronic Kidney Disease” (w załączonym wykazie publikacji), której jestem pierwszym autorem. Realizacja drugiego projektu wiązała się ze współpracą z wieloma ośrodkami, a przede wszystkim Centrum Onkologii i Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, a jej efektem jest publikacja o tytule „Characteristics of the gut microbiome in esports players compared with those in physical education students and professional athletes” (w załączonym wykazie publikacji).

### 1.3.4. Wybrane, zrealizowane kursy i szkolenia

Mój rozwój zawodowy był również związany z realizacją licznych kursów i szkoleń obowiązkowych, tj. w ramach realizacji programów specjalizacyjnych oraz nieobowiązkowych, w ramach moich zainteresowań oraz rozwijanych kwalifikacji i pozyskiwania nowych kompetencji. Większość z nich obejmuje szkolenia z zakresu genetyki molekularnej, epigenetyki, technik omicznych, cytogenetyki ale także szkolenia z zakresu innych dziedzin medycyny i diagnostyki oraz dydaktyki.

Wybrane kursy, warsztaty, szkolenia, szkoły letnie zestawiono w tabeli poniżej.

**Tabela.1.** Zrealizowane warsztaty, kursy szkolenia, szkoły letnie.

Lp.	Nazwa szkolenia	Miejsce realizacji /nazwa jednostki organizującej szkolenie/	Odniesienie do programu	Okres realizacji (od – do)
1.	Oporność drobnoustrojów na antybiotyki: podstawy teoretyczne, laboratoryjne metody oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki, wykrywanie mechanizmów oporności	Zakład Mikrobiologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie/ Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego	Obowiązkowy w ramach szkolenia specjalizacyjnego z Mikrobiologii Medycznej	15-19.04.2024
2.	Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka zakażeń przewodu pokarmowego i zatruc pokarmowych	Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum/ Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego	Obowiązkowy w ramach szkolenia specjalizacyjnego z Mikrobiologii Medycznej	05-08.02.2024
3.	Szkolenie aplikacyjne z technologii hybcell/hyborg, połączenie metody sekwencjonowania enzymatycznego z mikromacierzami cylindrycznymi	Szpital Uniwersytecki, Kraków, Firma cubedx	Nieobowiązkowe, w ramach doskonalenia kompetencji	23-24.01.2024
4.	Szkolenie „QIAstat-Dx – multipleksowa diagnostyka molekularna RT-PCR”	Szpital Uniwersytecki, Kraków, Firma cubedx	Nieobowiązkowe, w ramach doskonalenia kompetencji	30.11.2023
5.	Epidemiologia zakażeń i zarażeń związanych z opieką zdrowotną. Rola laboratorium mikrobiologicznego w wykrywaniu i monitorowaniu zakażeń i zarażeń	Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum/ Ośrodek ds. kształcenia podyplomowego	Obowiązkowy w ramach szkolenia specjalizacyjnego z Mikrobiologii Medycznej	24-26.10.2023
6.	Szkolenie aplikacyjne Cobas 5800	Szpital Uniwersytecki, Kraków, Firma Roche	Nieobowiązkowe, w ramach doskonalenia kompetencji	08-10.08.2023
7.	15th Course of Cytogenetics,	Coldrano, South Tyrol, Italy, European Cytogeneticists Association	Nieobowiązkowe, w otrzymanego stypendium i doskonalenia kompetencji twardych	20-28.08.2022
8.	Kurs w ramach projektu „Mistrzowie Dydaktyki, edycja 2020	Belgia, Ghent University	Nieobowiązkowe, w ramach doskonalenia kompetencji dydaktycznych	24.-30.10.2021

9.	Kurs Cytogenetyki Klinicznej,	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	04-18.09.2020
10.	Kurs Genetyka w pediatrii	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	18.02.2019
11.	Kurs Neurogenetyka	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	19-20.02.2019
12.	Kurs Metabolomika z wykorzystaniem technik LC/QTOF/MS i SingleCell Multiomics	Warszawa, Perlan Technologies Polska	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji z zakresu technik omicznych oraz sekwencjonowania następnej generacji typu single-cell	11-12.04.2019
13.	Kurs z zakresu genetyki w hematologii	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	03-07.07.2019
14.	Kurs doradztwa genetycznego	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	18.11.2019
15.	Podstawy w genetyce	Kraków, Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego Collegium Medicum	Związany z programem specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej	19-20.11.2019
16.	7th course on NON-CODING GENOME”	Paryż, Uniwersytet Mari Skłodowskiej-Curie na Sorbonie	Nieobowiązkowy, w ramach stypendium, celem doskonalenia kompetencji w zakresie przygotowywania bibliotek niekodujących RNA jako biomarkerów, celów terapeutycznych i diagnostycznych narzędzi w badaniach diagnostycznych i naukowych	07-15.02.2018
17.	International Course on Genomic Data Analysis (moduł transkryptomika i genomika)	Walencja, Hiszpania	Nieobowiązkowy w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie analizy danych omicznych.	08-10.03.2017
18.	Ion RNA Library Construction Training (3 days)	Darmstadt, Niemcy	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie przygotowywania bibliotek genetycznych do sekwencjonowania następnej	7-9.06.2016



			generacji na poziomie RNA na platformie Ion Torrent	
19.	Szkolenie z sekwencjonowania "Life Technologies™ training course on Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer"	Kraków, Thermofisher	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie sekwencjonowania kapilarnego, w oparciu o metodę Sangera	4-5.01.2015
20.	Next Generation Sequencing 2014-world trends and the future in the prenatal and postnatal diagnostics	Warszawa	Nieobowiązkowy w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie technik sekwencjonowania następnej generacji	05.12.2014
21.	Kurs Statystyka w medycynie	Kraków Firma StatSoft,	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie metod statystycznych do opracowywania wyników badań klinicznych	4-5.11.2014
22.	Warsztaty szkoleniowe „At the crossroads of stem cell biology and omics technology”,	Kraków OMICRON,	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji, w zakresie technik omicznych	29.09-05.10.2014
23.	Genomics and Microarrays 2011	Warszawa Centrum Zdrowia Matki i Dziecka,	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji, w zakresie technik omicznych, a przede wszystkim zastosowania macierzy CGH i aCGH	9-10.06.2011
24.	4rd MiP Summer School on Mitochondrial Physiology,	Druskininkai, Litwa, Uniwersytet Medyczny w Litwie	Nieobowiązkowy, w zakresie doskonalenia kompetencji, w zakresie analizy funkcji i dysfunkcji mitochondriów za pomocą tlenowrażliwej elektrody	10-16.06.2011
25.	Life science imaging - Workshop on Visualization of molecules, interactions and biological processes	Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa	Obowiązkowy w ramach szkoły doktorskiej realizowanej w Postgraduate School of Molecular Medicine	13-15.07.2011
26.	Kurs Prescription for statistics, or data analysis in medical research	Wieliczka, Polska, Firma StatSoft	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji, w zakresie metod statystycznych do opracowywania wyników badań klinicznych.	18-19.05.2011
27.	Szkolenie Genomika i Proteomika: od odczytu sekwencji do transkryptu	Warszawa	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie analizy wyników sekwencjonowania pozyskanych metodami następnej generacji na poziomie transkryptomów	02.2011
28.	Warsztaty szkoleniowe the NuGO Workshop on 'Obesity and its link to type 2diabetes for young	Schloss Hohenkammer, Niemcy	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w	25-27.02.2010

	investigators'		zakresie nutrigenomiki, wzajemnych interacji pomiędzy żywieniem a genaomem	
29.	Next Generation Sequencing 2010-trendy światowe i przyszłość technologii w Polsce	Warszawa	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie sekwencjonowania następnej generacji	21.06.2010
30.	Szkolenie 4rd MiP Summer School on Mitochondrial Physiology,	Druskininkai, Litwa, Uniwersytet Medyczny w Litwie	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji. Była to letnia szkoła dotycząca analizy funkcji i dysfunkcji mitochondriów za pomocą tlenowrażliwej elektrody	10-16.06.2010
31.	Warsztaty z zakresu: podstawy techniki Real-time PCR, obsługi urządzenia Lightcycler 480, obsługi oprogramowania Lightcycler software, przeprowadzania oraz analizy reakcji typu HRM, zagadnień dotyczących ekspresji genów panele Real-time ready-apoptoza,	Kraków, ROCHE Diagnostics,	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie metod RT-PCR oraz analizy ekspresji genów, w oparciu o tą metodologię	26.11.2009
32.	Szkolenie na temat wysoko-przepustowych metod dotyczących oddychania oraz obsługi elektrody tlenowrażliwej - Oxygraph-2k OROBOROS, 44th International Course on High-Resolution Respirometry,	Schroecken, Vorarlberg, Austria	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji. Była to letnia szkoła dotycząca analizy funkcji i dysfunkcji mitochondriów za pomocą tlenowrażliwej elektrody.	01.2008
33.	Szkolenie: 3rd NuGO Introduction Course,	Holandia The European Nutrigenomics Organisation	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie nutrigenomiki, wzajemnych interacji pomiędzy żywieniem a genaomem	04.2007
34.	Polsko-francuski kurs z Biotechnologii oraz Szkoła Glikobiologii 2nd Polish-French Intensive Course in Biotechnology oraz Thematic School in Glycobiology,	Kraków, organizowany przez Zakład Biochemii, Biofizyki, Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz Centrum Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu w Orleanie we Francji	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie podstawowych techniki genetyki molekularnej	2007
35.	Szkolenie Neurolingwistycznego Programowania	Kraków, Stowarzyszenie Wspierania Onkologii UNICORN w Krakowie	Nieobowiązkowy, w ramach doskonalenia kompetencji w zakresie udzielania wsparcia ludziom dotkniętym chorobą nowotworową.	2001-2003

**1.3.5. Inna działalność, w tym członkostwo w towarzystwach naukowych**

1. Ekspert w Krajowej Radzie ds. Chorób Rzadkich, Członek Zespołu numer 5
2. Ekspert w Agencji Badań Medycznych
3. Ekspert Naczelnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Klinicznych przy Agencji Badań Medycznych
4. Edytor w czasopismach: „Pathogens”, „Frontiers in Endocrinology”, „Nutrients”, Journal of Clinical Medicine, „Microorganisms”, „Nutrition and Public Health”, „Applied Microbiology and Biotechnology”, „Scientific Reports”, „Diversity”, „Annals of Medicine”
7. Członek Polskiego Towarzystwa Diagnostów Laboratoryjnych
8. Członek The European Nutrigenomics Organisation
9. Członek Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego
10. Członek The European Society of Clinical Virology
10. Promotor 12 prac magisterskich (zakończone), 1 w trakcie realizacji
11. Promotor pomocniczy 4 prac doktorskich (w trakcie realizacji)

**1.3.6. Nagrody**

- 2017 rok, Nagroda dla Młodych Pracowników Diagnostyki Laboratoryjnej przyznana przez Fundację Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej.
- 25-27 luty 2010 rok, nagroda w postaci stypendium wyjazdowego, za najlepsze wystąpienia prezentowane przez młodych naukowców, w ramach spotkania NuGO Workshop, w Schloss Hohenkammer, w Niemczech (wygłoszone wykłady pt.: “Obesity and its link to type 2diabetes for young investigators”, „Antiapoptotic activity of humanin is weakly bound to the metabolic changes of HUVEC”).
- 2019 rok, 1 miejsce w sesji prac medycznych, na Międzynarodowej Konferencji iMedic, wykład pt.: “The involvement of humanin in development of Parkinson`s disease”, (przygotowane wraz ze Studentami z „STN Nutrigenomiki”)
- 2019 rok, 1 miejsce w sesji prac farmaceutycznych, na Międzynarodowej Konferencji iMedic, wykład pt.: “Vitamin D receptor mutations influence on course of Parkinson`s Disease in patients treated with L-Dopa”, (przygotowane wraz ze Studentami z „STN Nutrigenomiki”)

### 1.3.7. Projekty

#### 1.3.7.1. Projekty własne poza działalnością statutową UJCM

- „Aktywność wariantów polimorficznych 13ThrHN10b izoform humaniny 5 u chorych na chorobę Parkinsona”, grant promotorski

Nr rejestracyjny: K/PBP/000318

Źródło finansowania: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, data zakończenia 2012 rok

Kwota: 50 000 PLN

Źródło finansowania: Krajowy Narodowy Ośrodek Wiodący

Projekt na wyjazd na staż

Kwota: 49 959 PLN

Data realizacji: 2016 rok

- Mistrzowie Dydaktyki, edycja 2020 realizowany na podstawie umowy”  
MNISW/2020/315/DIR/KH

Źródło finansowania: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, współfinansowanie ze środków Unii Europejskiej z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój

Data realizacji: 2020 rok

- Wsparcie rozwoju kompetencji twardych-edycja I

Źródło finansowania: Priorytetowy obszar badawczy qLife, Jakość Badań dla Jakości Życia.

Finansowanie uzyskane na rozwój kompetencji twardych.

Kwota: 14 347 PLN

Data realizacji: 2022 rok

- „Stworzenie systemu wielonarządowej komunikacji typu organ-on-a-chip z zastosowaniem technik mikroprzepływowych do modelowania i badania interakcji pomiędzy mikrobiotą jelitową, barierą krew-mózg oraz mózgiem w procesach neurodegeneracji”

Źródło: I edycji Programu Platformy Mentoringowej WHIH, Agencja Badań Medycznych

Data realizacji: 2023 rok

- „Influence of Vitamin D metabolome on prevalence and course of Parkinson's disease”

Nr rejestracyjny: MNISW/2020/371/DIR/NN4

Źródło finansowania: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, Data rozpoczęcia realizacji:

Data realizacji: 09.07.2020 -31.01.2022 rok

Kwota: 220 000 PLN

#### 1.3.7.2. Projekty własne realizowane w ramach finansowania z dotacji statutowej UJCM

- „Zmiany w ekspresji miRNA podczas różnicowania ludzkich preadipocytów linii komórkowej ChubS7”

Nr rejestracyjny: K/ZDS/003778

Źródło finansowania: dotacja celowa dla młodych naukowców :

Data realizacji: 01.01.2013 rok

- „Rola miRNA jako nowego biomarkera w diagnozowaniu choroby Parkinsona u polskich pacjentów”

Nr rejestracyjny: K/DSC/002113

Źródło finansowania: dotacja celowa dla młodych naukowców :

Data realizacji: 01.01.2014 -31.12.2015 rok

Kwota: 20 0000 PLN

- „Zmienność genetyczna a skuteczność leków stosowanych w leczeniu choroby Parkinsona”

Nr rejestracyjny: K/DSC/003558

Źródło finansowania: dotacja celowa dla młodych naukowców :

Data realizacji: 01.01.2016 -31.12.2017 rok

Kwota: 14 0000 PLN

- Analiza zmian w mikroflorze jamy ustnej i jej wpływu na patogenezę otyłości u pacjentów leczonych metodami chirurgii bariatrycznej”

Nr rejestracyjny: K/ZDS/007985

Źródło finansowania: dotacja statutowa, zadanie badawcze :

Data realizacji: 01.01.2018 -31.12.2018 rok

Kwota: 4 424 PLN

- „Analiza zmian w mikroflorze jamy ustnej i jej wpływu na patogenezę otyłości u pacjentów leczonych metodami chirurgii bariatrycznej”

Nr rejestracyjny: N41/DBS/000220

Źródło finansowania: działalność badawcza, subwencja :

Data realizacji: 01.01.2019 -31.12.2020 rok

- „Analiza związku diety z niestabilnością genomową oraz długością telomerów u pacjentów z chorobą Parkinsona”

Nr rejestracyjny: N41/DBS/000816

Źródło finansowania: działalność badawcza, subwencja :

Data realizacji: 01.01.2020 -31.12.2022 rok

### 1.3.7.3. Udział w projektach

- „DHA/EPA a zmiany w epigenomice komórek krwi jak i w poziomie specyficznego dla endotelium i komórek beta trzustki miRNA” (projekt z Narodowego Centrum Nauki pod kierownictwem Prof.dr.hab med.Aldony Dembińskiej-Kieć)
- „BIOmarkers of Robustness of Metabolic Homeostasis for Nutrigenomics-derived Health CLAIMS Made on Food” (FP7-KBBE-2009-3 nr 244995 pod kierownictwem Prof.dr.hab. med. Aldony Dembińskiej-Kieć)
- Znane polimorfizmy genetyczne związane z rozwojem nadciśnienia tętniczego u kobiet ciężarnych. Projekt statutowy pod kierownictwem dr hab. Krzysztofa Rytlewskiego, w ramach współpracy z Katedrą Ginekologii i Położnictw
- „Ochrona przed zwyrodnieniem układu nerwowego: rola peptydów endogennych, L-argininy i kwasów tłuszczowych jako potencjalnych czynników modulujących czynność mitochondriów, zwiększających żywotność mózgu poddanego działaniu bodźców stresowych” (PNRF-104-AI-1/07, pod kierownictwem Prof.dr.hab. med. Aldony Dembińskiej-Kieć)

- The European Network of Excellence: "The European Nutrigenomics Organisation linking genomics, nutrition and health research" acronym NuGO (contract nr FP6-2004-506360)
- „Assessment of cytogenetic changes: chromosomal aberrations and one - arental disomy in carriers of Barth syndrome in order to establish a role of taffazin in the inheritance of genetical mosaicism” (2016/21/N/NZ2/01729, PRELUDIUM-11, rola opiekuna naukowego)
- "Analiza zmian w zakresie składu mikrobioty przewodu pokarmowego ze szczególnym uwzględnieniem mikrobioty jamy ustnej, jelita czczego oraz jelita grubego w grupie chorych leczonych chirurgicznie z powodu otyłości olbrzymiej" (Diamentowy Grant, finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pod kierownictwem dr n. med. Tomasza Stefury)
- „Wpływ zabiegów bariatrycznych i metabolicznych na procesy przedwczesnego starzenia się u osób z otyłością olbrzymią” (Diamentowy Grant, finansowany z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pod kierownictwem lek. Alicji Dudek)

## **2. Przedstawienie osiągnięcia naukowego**

Na podstawie 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. nr 65, poz. 595 ze zm.)

### **2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

**„Identyfikacja biomarkerów związanych z wystąpieniem, przebiegiem i progresją choroby Parkinsona oraz czynników genetycznych, determinujących patomechanizm choroby”**

**Tytuł w języku angielskim:**

**"Identification of biomarkers associated with the onset, course, and progression of Parkinson's disease and genetic factors determining the pathomechanism of the disease"**

### **2.2. Cykl trzech publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe wymagane do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego składa się z trzech prac oryginalnych. Prace zostały wykonane w ramach projektów realizowanych dzięki finansowaniu z działalności statutowej na Uniwersytecie Jagiellońskim Collegium Medicum, ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki, MEIN (dawne Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego) oraz w ramach projektu (Influence of vitamin D metabolome on

prevalence and course of Parkinson's disease Nr rejestracyjny: MNISW/2020/371/DIR/NN4, źródło finansowania: MEIN).

Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących główne osiągnięcie naukowe wynosi **13,964** punktów. Sumaryczny Impact Factor z wyłączeniem publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **129,093** punktów. Informacje na temat mojego autorskiego wkładu w poszczególne prace zostały zamieszczone w załączniku nr 3. Wkład autorski pozostałych współautorów przedstawia załącznik nr 6.

### 2.3. Publikacje

1. The role of single nucleotide polymorphisms of monoamine oxidase B, dopamine D2 receptor, and DOPA decarboxylase receptors among patients treated for Parkinsons disease. **Zapala Barbara**, Stefura Tomasz, Piwowar Monika, Czekalska Sylwia, Zawada Magdalena, Hadasik Maria, Solnica Bogdan, Rudzińska-Bar Monika; Journal of Molecular Neuroscience, 2022: Vol. 72, nr 4, s. 812-819  
**IF: 3.10; MEiN: 70.000**  
Autor korespondencyjny: **Barbara Zapala**
2. Differences in the composition of gut microbiota between patients with Parkinsons disease and healthy controls: a cohort study; **Zapala Barbara**, Stefura Tomasz, Wójcik-Pędziwiatr Magdalena, Kabut Radosław, Bałajewicz-Nowak Marta, Milewicz Tomasz, Dudek Alicja, Stój Anastazja, Rudzińska-Bar Monika;  
Journal of Clinical Medicine, 2021: Vol. 10, nr 23, id. art. 5698, il., bibliogr. 58 poz., abstr.  
Autor korespondencyjny: **Barbara Zapala**  
**IF: 4.964; MEiN: 140**
3. The role of the western diet and oral microbiota in Parkinson's disease; **Zapala Barbara**, Stefura Tomasz, Milewicz Tomasz, Wątor Julia, Piwowar Monika, Wójcik-Pędziwiatr Magdalena, Doręgowska Magdalena, Dudek Alicja, Jania Zuzanna, Rudzińska-Bar Monika.  
Nutrients 2022: Vol. 14, nr 2, il., bibliogr. 39 poz., abstr.  
Autor korespondencyjny: **Barbara Zapala**  
**IF: 5.900; MEiN: 140.000**

## **2.4. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich wykorzystania.**

### **2.4.1. Wstęp**

Obserwowany wzrost średniej długości życia populacji światowej, w połączeniu z wieloma czynnikami genetycznymi i środowiskowymi, predysponuje do pojawienia się chorób neurodegeneracyjnych, których częstość występowania ma gwałtownie wzrosnąć w najbliższych latach. Szacuje się, że zaburzenia neurologiczne powodują wysoki stopień niepełnosprawności oraz przyczyniają się do 9 milionów zgonów rocznie na całym świecie. Przy rosnącej częstości występowania chorób neurologicznych, w ciągu ostatnich 25 lat i znaczącym obciążeniu ekonomicznym, choroby neurologiczne stanowią istotne wyzwanie dla współczesnej medycyny.

Choroba Parkinsona (PD) jest drugim, co do częstości występowania, zależnym od wieku schorzeniem neurodegeneracyjnym dotykającym około 1% populacji powyżej 50 roku życia. Stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zaburzeń neurologicznych u osób w podeszłym wieku. W ciągu roku odnotowuje się około 11-19 nowych przypadków na 100 000 osób populacji ogólnej krajów europejskich. Z danych epidemiologicznych wynika, że w Polsce żyje około 100 000 ludzi dotkniętych tą chorobą. Liczba osób cierpiących na PD nieustannie wzrasta, co w dużej mierze jest wynikiem wydłużenia się średniej długości życia. Szacuje się, że do 2040 roku liczba chorych na PD może się podwoić. PD jest chorobą postępującą i może trwać od 10 do 20 lub nawet więcej lat, po zdiagnozowaniu. Klinicznie, objawia się, przede wszystkim, wystąpieniem co najmniej dwóch lub kilku objawów ruchowych takich jak: spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe, zaburzenie postawy ciała i równowagi, sztywność mięśniowa. Oprócz dominujących objawów ruchowych w obrazie klinicznym choroby pojawiają się także tzw. objawy pozaruchowe: zaburzenia węchu, zaburzenia nastroju i funkcji poznawczych, zaburzenia funkcji układu вегетatywnego: ślinotok, łojotok, zaparcia, niedociśnienie ortostatyczne, oraz zaburzenia funkcji pęcherza moczowego. Podstawowym mechanizmem patologicznym PD jest stopniowe obumieranie komórek dopaminergicznych w obszarze istoty czarnej śródmózgowia, prowadzące do zaburzenia równowagi między systemami neuroprzekaźnikowymi. Zmiany histopatologiczne obejmują również inne struktury: neurony noradrenergiczne i serotonergiczne jąder pnia mózgu, m.in. jądro sinawe i jądro szwu, a także neurony cholinergiczne w jądrze podstawnym i zakręcie obręczy. Choroba ujawnia się klinicznie dopiero przy zaniku około 60% neuronów dopaminergicznych istoty czarnej, czemu towarzyszy obniżenie poziomu dopaminy nawet poniżej 80%.



Przez dłuższy okres czasu pomijano rolę czynników genetycznych, a chorobę uznawano za wyłącznie sporadyczną. Poczyniony w ostatnich latach postęp, w zakresie molekularnych technik genetycznych, przyczynił się do zwrócenia szczególnej uwagi na podłoże genetyczne choroby. Dzięki przeprowadzonym do tej pory badaniom wykryto szereg zarówno wspólnych, jak i rzadkich wariantów genetycznych wywołujących lub zwiększających ryzyko wystąpienia PD. Szacuje się, że około 5-10 % przypadków (spośród wszystkich zachorowań) stanowią pacjenci z dziedziczną, w sposób autosomalnie dominujący oraz autosomalnie recesywny, postacią choroby. W 1997 roku, dokonano odkrycia pierwszej genetycznej przyczyny PD, w amerykańsko-włoskiej rodzinie pochodzącej z Contrusi. Na chromosomie 4, w pozycji 4q21-q23 (locus *PARK1*) zlokalizowano gen  $\alpha$ -synukleiny (*SNCA*) odpowiedzialny za wystąpienie parkinsonizmu, dziedziczonego w sposób autosomalny dominujący. Do tej pory, dzięki badaniom prowadzonym w populacjach pochodzenia europejskiego, wschodnioazjatyckiego i latynoskiego, obejmujących ponad milion próbek zidentyfikowano ponad 80 locus ryzyka, z ponad 90 niezależnymi wariantami genetycznymi, w tym przede wszystkim, w genach takich jak: *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *BST1*, *GCH1*, *VPS13C* i *TMEM175*. Ponadto, wyniki licznych badań wskazały na kilka szlaków biologicznych zaangażowanych w patogenezę PD.

Pomimo stosunkowo dobrze poznanych mechanizmów prowadzących do rozwoju choroby, jej etiologia nadal nie jest w pełni wyjaśniona. Zakłada się wieloczynnikową genezę wynikającą ze współdziałania zarówno czynników środowiskowych, jak i biologicznych, a także predyspozycji genetycznych. PD charakteryzuje się bardzo dużą heterogennością pod względem obrazu klinicznego i spektrum patologicznego, co sugeruje różny i skomplikowany mechanizm, leżący u jej podłoża. Ciągłe niewyjaśniona etiologia i brak znajomości czynnika pierwotnego choroby uniemożliwia leczenie przyczynowe. Prowadzone badania naukowe przyczyniają się do poznawania nowych faktów na temat kaskady zdarzeń, które prowadzą do procesu neurodegeneracji. W ostatnim czasie, dużo uwagi poświęca się roli mikrobioty przewodu pokarmowego, w kontekście patogenezы PD. Mikrobiota jelitowa może nie tylko wpływać na lokalne tkanki gospodarza, w których przebywa, ale także oddziaływać na inne odległe narządy bezpośrednio poprzez metabolity mikrobiologiczne (np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe) lub pośrednio poprzez modulację czynników immunostymulujących i endokrynologicznych. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań pokazują, że u pacjentów z PD mikrobiota jelitowa różni się znacząco od tej u osób zdrowych. Niestety, nie jest wyjaśnione czy dysbioza mikrobioty przewodu pokarmowego stanowi przyczynę, czy skutek choroby. Jest bardzo prawdopodobne, że określone rodzaje bakterii stymulują procesy zapalne w jelitach i przyczyniają się do inicjacji procesu

neurodegeneracyjnego. Dowody, dla teorii wiążącej mikrobiotę przewodu pokarmowego z rozwojem PD, są obserwowane nawet do 20 lat przed wystąpieniem typowego obrazu klinicznego, w postaci chociażby zaparć, na które pacjenci skarżą się na długo przed zdiagnozowaniem. Prace naukowe zwracają szczególną uwagę na fakt, że choroba zaczyna się w przewodzie pokarmowym lub w opuszkach węchowych. W powiązaniu z nowymi teoriami na temat patomechanizmu PD klinicyści, na podstawie obrazu klinicznego, wyróżniają dwie postacie choroby. Pierwsza z nich określana jest jako tzw. fenotyp body-first, natomiast druga jako tzw. brain-first. Wyjaśnienie roli mikrobiomu w występowaniu i rozwoju chorób oraz zapewnieniu prawidłowego funkcjonowania organizmu stanowi jeden z ważniejszych tematów naukowo-badawczych. Niewątpliwie, przyczynowe leczenie PD powinno być podejmowane od wczesnych etapów jej rozwoju i prowadzone kompleksowo. Ponadto, powinno obejmować leczenie objawowe niesprawności ruchowej, jak również współwystępujących objawów pozaruchowych i innych powikłań późnego okresu choroby. Z uwagi na powyższe, bardzo ważna jest identyfikacja markerów związanych nie tylko z wystąpieniem PD, ale także z jej rozwojem i możliwością opracowania nowych, skutecznych form terapii.

#### 2.4.2. Cele szczegółowe przeprowadzonych badań

- **Publikacja numer 1:** Identyfikacja wybranych wariantów (rs1799836, rs5326, rs2283265, rs1800497, rs1801028, rs1799732, rs1076560, rs1065852), w genach *MAOB*, *DRD1*, *DRD2*, *DDC*, zaangażowanych w szlaki związane z metabolizmem dopaminy.
- **Publikacja numer 2:** Analiza składu mikrobioty jelitowej, u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona, leczonych lewodopą i porównanie do składu mikrobioty jelitowej u osób zdrowych, w tym samym wieku.
- **Publikacja numer 3:** Zbadanie preferencji żywieniowych i profili mikrobioty jamy ustnej u pacjentów z rozpoznaną chorobą Parkinsona i porównanie wyników tych samych analiz przeprowadzonych w grupie osób zdrowych.

#### 2.4.3. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego

##### 2.4.3.1. Publikacja numer 1

PD charakteryzuje się bardzo dużą heterogennością pod względem obrazu klinicznego i spektrum patologicznego, co sugeruje różny i skomplikowany mechanizm leżący u jej podłoża. Ciągłe niewyjaśniona etiologia choroby uniemożliwia leczenie przyczynowe, które, z uwagi na

patomechanizm, powinno być skierowane nie tylko na stymulację receptorów dopaminergicznych, ale także na inne neuroprzekaźniki. Niestety na chwilę obecną brak terapii, która zapewniałaby zahamowanie postępu choroby. Stosuje się jedynie leczenie objawowe, polegające na zmniejszeniu niesprawności powodowanych chorobą, przy jednoczesnym zapobieganiu pojawienia się niepożądanych powikłań stosowanych form terapii. Rzadko jednak udaje się osiągnąć oba cele jednocześnie. Po zdiagnozowaniu choroby, pacjenci otrzymują leki, które mają jedynie na celu poprawę ich stanu ogólnego. Co więcej, długotrwałe leczenie choroby doprowadza zwykle do osłabienia działania leków oraz niepożądanych skutków ubocznych, które, u 50% pacjentów, występują już po 4 - 5 latach.

W omawianej publikacji, podjęto temat zmienności genetycznej w zakresie stosowanych leków dopaminergicznych, u pacjentów z PD. Sygnalizacja dopaminergiczna ma kluczowe znaczenie dla planowania motorycznego i funkcji umysłowych. Na podstawie badań, wysunięto hipotezę, że warianty polimorficzne w genach, zaangażowanych w szlaki metabolizmu regulującego neuroprzekaźnictwo dopaminergiczne mają związek ze skutecznością leczenia u chorych na PD.

Badanie miało charakter prospektywnego badania kohortowego i zostało przeprowadzone w okresie między listopadem 2018, a listopadem 2020 roku. Do badania łącznie zaangażowano 220 osób. Grupę badaną stanowiło 129 pacjentów ze zdiagnozowaną, idiopatyczną PD, w tym 49 osób stanowiły kobiety, natomiast 77 – to mężczyźni. Do grupy kontrolnej włączono zdrowe osoby, dopasowane wiekiem (mediana wieku wynosiła 67 lat) do grupy badanej, w tym: 34 kobiety i 60 mężczyzn. Chorych na PD diagnozowano w oparciu o powszechnie stosowane kryteria diagnostyczne w połączeniu z klinicznymi skalami oceny, takimi jak: Ujednoliconą Skala do Oceny Choroby Parkinsona (UPDRS, część II i część III), skala Hoehn-Yahra oraz skala Mini Mental State Examination - do oceny funkcjonowania poznawczego. ON-OFF fluktuacje ruchowe, dyskinezy, dystonie monitorowano na podstawie zapisów zamieszczanych w dziennikach pacjentów. U połowy badanych, czas trwania PD wynosił około 9 lat. Ostępnie (oceniane skalą MMSE < 24 punktów) występowało u 23,4% pacjentów. Mediana wyniku w skali UPDRS wynosiła 32 punktów. Powikłania leczenia lewodopą (ruchowe, dyskinezy, ruchy dystoniczne) obserwowano u 68,8% pacjentów. Głęboką stymulację mózgu zastosowano u 17,5% badanych.

Analizy wariantów polimorficznych przeprowadzono w obrębie 4 genów: monoaminooksydazy B (MAOB), receptora dopaminowego D1 (DRD1), receptora dopaminowego D2 (DRD2), i dopa dekarboksylazy (DDC). Od wszystkich osób pobrano próbki krwi i wyizolowano genomowe DNA (gDNA) za pomocą manualnej metody kolumnkowej i zestawu

QIAam DNA Blood Mini Kit firmy Qiagen. Genotypowanie przeprowadzono stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (Real-time PCR), stosując sondy oligonukleotydowe podwójnie znakowane typu TaqMan, które zaprojektowano względem wariantów genetycznych w obrębie wybranych genów: *MAOB* (rs1799836, sonda ID C\_8878790\_10), *DRD1* (rs4532, C\_1011777\_10), *DRD2* (rs2283265, sonda ID C\_16070796\_10, rs1800497, C\_7486676\_10, rs1801028, C\_10725\_20, rs1799732, C\_33641686\_10, rs1076560, sonda ID C\_2278888\_10) i *DDC* (rs1065852, sonda ID C\_8320238\_10). Analizy przeprowadzono w aparacie ViiA 7 Real-Time PCR System (firmy Applied Biosystems).

Realizacja niniejszego badania miała duże znaczenie w kontekście progresji choroby u pacjentów z PD, leczonych lewodopą. Zweryfikowano związek zmienności genetycznej z progresją PD i powikłaniami wynikającymi z leczenia lewodopą. Jest to, o tyle ważne zagadnienie, że identyfikacja potencjalnych predyktorów wyników leczenia toruje drogę do większej personalizacji i indywidualnego podejścia do leczenia. Jednym z efektów realizacji badania jest wykrycie korelacji pomiędzy wariantem rs228365 w obrębie genu *DRD2* a ciężkim przebiegiem choroby (pacjenci z tym wariantem osiągnęli punktację w skali UPDRS, cz. II i III powyżej 50), a zwłaszcza występowaniem ciężkiej demencji. Wyniki te wskazują, że indywidualna zmienność genetyczna powinna być weryfikowana podczas dobierania odpowiedniej formy leczenia PD.

#### **2.4.3.2. Publikacja numer 2**

Patologiczną cechą, charakterystyczną dla PD jest odkładanie się wewnątrzkomórkowych agregatów  $\alpha$ -synukleiny ( $\alpha$ -syn) w postaci ciał Lewy'ego i obumieranie neuronów, a następnie rozwój objawów ruchowych, takich jak bradykineza, sztywność, drżenie spoczynkowe, niestabilność postawy i dystonia. Staje się coraz bardziej oczywiste, że objawy niemotoryczne, w tym zaburzenia żołądkowo-jelitowe, zaburzenia psychiczne, zaburzenia snu, zaburzenia sensoryczne i zaburzenia autonomii są bardzo rozpowszechnionymi i problematycznymi aspektami choroby, które często pojawiają się na długo przed wystąpieniem typowych objawów neurologicznych. Zaburzenie funkcji w obrębie układu glutaminergicznego, cholinergicznego, serotonergicznego i adrenergicznego stanowi podstawę patogenezy PD i przyczynia się do heterogenicznych objawów u pacjentów. Podejmowane strategie leczenia PD zazwyczaj wykorzystują leki dopaminergiczne w celu zwiększenia synaptycznego stężenia dopaminy lub stymulacji receptorów dopaminy. W połączeniu z leczeniem farmakologicznym stosuje się interwencje rehabilitacyjne, w tym terapię ruchową i logopedyczną oraz modyfikacje diety w celu złagodzenia zarówno ruchowych, jak i pozaruchowych objawów choroby. Problemy żołądkowo-

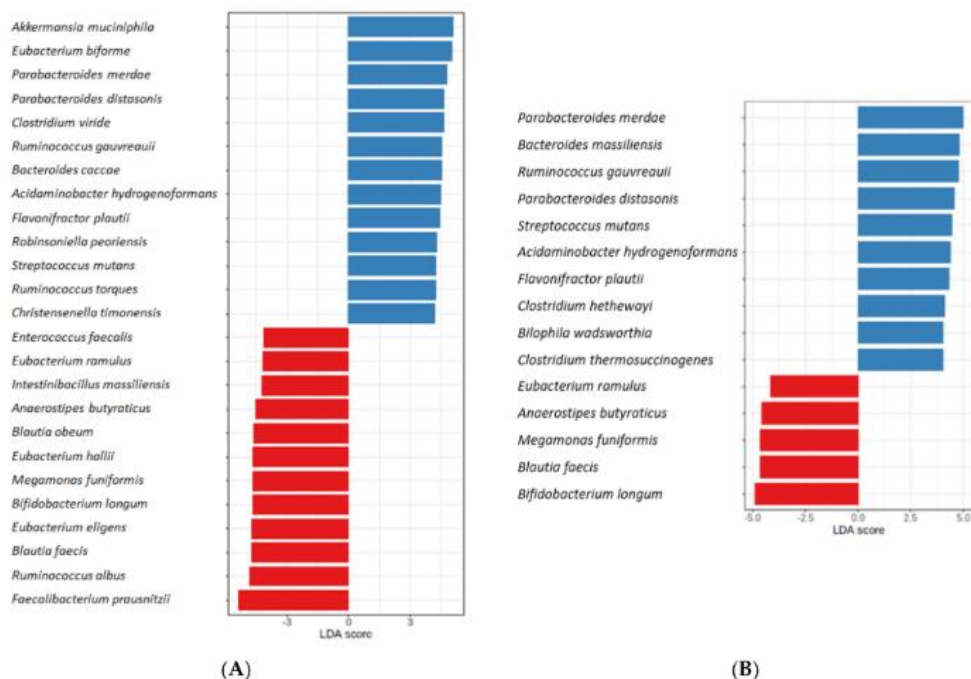
jelitowe są obserwowane na etapie prawie wszystkich stadiów PD. Około 30% pacjentów z PD skarży się na objawy takie jak: zaparcia, ślinienie się, dysfagia i gastropareza. Pomimo szeroko zakrojonych badań, etiologia zaparć i to, czy zaparcia w PD są spowodowane patologią jelit czy mózgu, pozostaje nieznana. Obecnie wiadomo, że istnieje dwukierunkowa komunikacja między mózgiem a jelitami, za pośrednictwem kilku szlaków immunologicznych, endokrynologicznych, metabolicznych i neuronalnych, powszechnie określanych jako oś jelito-mózg (GBA), której centralnym elementem jest mikrobiota jelitowa, stąd obecnie określa się ją jako oś mikrobiota-jelito-mózg.

W badaniu, w ramach omawianej publikacji, wykonano analizy sekwencji 16S rRNA genomu bakteryjnego, w próbkach kału pozyskanych od pacjentów z PD i dokonano charakterystyki profili mikrobiomu jelitowego, a uzyskane wyniki porównano do tych samych analiz uzyskanych od grupy kontrolnej, co miało na celu identyfikację markerów bakteryjnych różnicujących PD od osób zdrowych.

Badanie prowadzono w latach 2019-2020. Do badania włączono 27 hospitalizowanych pacjentów z PD i 44 ochotników zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Średni wiek pacjentów z PD wynosił 67 lat, a osób zdrowych z grupy kontrolnej 64 lata. Od każdego uczestnika badania pobrano materiał biologiczny w postaci próbek kału, z których wyizolowano materiał genetyczny w postaci genomowego DNA bakterii, za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (firmy Qiagen). Biblioteki genetyczne przygotowano przy użyciu sekwencji specyficznych dla genów ukierunkowanych na konserwatywne regiony V3 i V4 genu 16S rRNA. Sekwencjonowanie przeprowadzono za pomocą wysokoprzepustowej technologii NGS, w aparacie MiSeq (firmy Illumina).

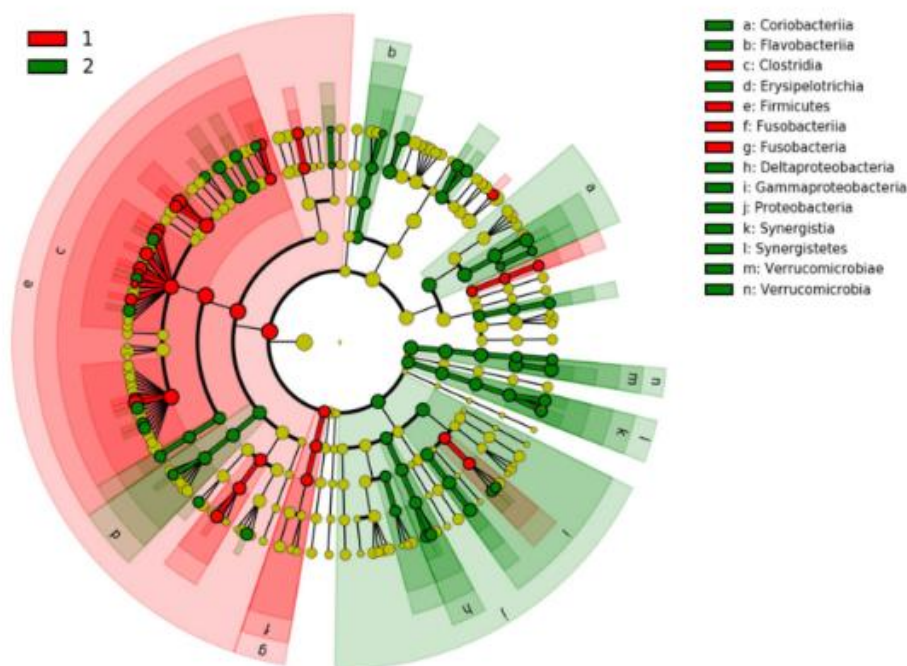
Uzyskane wyniki wskazały na istotną zależność pomiędzy dysbiozą, w zakresie składu mikrobioty jelitowej, u pacjentów z PD, w porównaniu do osób zdrowych. Przede wszystkim stwierdzono istotne różnice w bioróżnorodności alfa i beta, w obu analizowanych grupach. Wskaźniki różnorodności alfa, na podstawie indeksów: Shannona (wartość  $p < 0,007$ ), Simpsona (wartość  $p < 0,003$ ) i Fishera (wartość  $p < 0,001$ ), różniły się istotnie między pacjentami z PD, a grupą kontrolną. U pacjentów z PD, zaobserwowano znacznie wyższą różnorodność bakterii niż w grupie kontrolnej. Bogactwo w zakresie obserwowanych OTU (z ang. Operational Taxonomic Units) i na podstawie indeksów: Bray-Curtis (wartość  $p < 0,002$ ), ACE (wartość  $p < 0,001$ ), Chao1 (wartość  $p < 0,003$ ) było istotnie wyższe u pacjentów z PD niż w grupie kontrolnej. Mikrobiota jelitowa pacjentów z PD składała się głównie z bakterii z rodzaju Firmicutes (59%), Bacteroidetes (27%) i Actinobacteria (8%). Podczas gdy, u osób zdrowych profil mikrobioty jelitowej składał się

rodzaju Firmicutes (69%), Bacteroidetes (20%) i Actinobacteria (8%). U pacjentów z PD, klasa Clostridia występowała najczęściej w gromadzie Firmicutes (92,39%), podczas gdy klasa Coriobacteriia była najliczniejsza w gromadzie Actinobacteria (60%), a klasa Betaproteobacteria występowała najczęściej w gromadzie Proteobacteria (48,1%). Na Figurze 1, przedstawiono zidentyfikowane gatunki bakterii które pozwoliły zróżnicować pacjentów z PD i osoby zdrowe.



**Figura 1.** Analiza LefSE, pokazująca gatunki bakterii, których bogactwo było wyższe u chorych na PD w porównaniu do grupy kontrolnej. Kolor czerwony wskazuje grupę kontrolną, podczas gdy kolor niebieski grupę z PD. Zidentyfikowane markery zostały wybrane na podstawie wartości  $p < 0,05$ . Wykres A przedstawia wyniki dla grupy badanej - z PD i innymi chorobami (takimi jak nadciśnienie i cukrzyca), natomiast wykres B przedstawia wyniki dla grupy badanej, u której zdiagnozowano tylko PD, bez innych chorób współistniejących.

Wyniki pokazały również istotne różnice w profilach mikrobioty jelitowej w obu analizowanych grupach, co przedstawiono na Figurze 2, obrazującej kladogram.



**Figura 2.** Kladogram wygenerowany na podstawie analizy LEfSe, pokazujący różnice taksonów między pacjentami z PD (2) i zdrowymi osobami z grupy kontrolnej (1). Żółta kropka w każdym kladogramie reprezentuje królestwo; każdy kolejny okrąg jest o jeden stopień niższym filogenetycznie poziomem (gromada, klasa, rząd, rodzina i OTU). Regiony zaznaczone na czerwono wskazują taksony wzbogacone w kontroli w porównaniu do tych wzbogaconych u pacjentów z PD - oznaczonych kolorem zielonym.

Niniejsze badanie jest pierwszym, w którym scharakteryzowano profile mikrobioty jelitowej u polskich pacjentów z PD i powiązаныmi chorobami współistniejącymi oraz leczonych lewodopą. Pacjenci z rozpoznaniem PD mają znacząco różne profile mikrobioty jelitowej w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej. Wyniki tego badania pozostają w zgodzie z najnowszymi teoriami na temat patogenyzy PD, które włączają dysbiozę mikrobioty jelitowej jako jeden z istotnych czynników ryzyka rozwoju choroby.

#### 2.4.3.3. Publikacja numer 3

Chorobę Parkinsona klinicznie charakteryzują objawy ruchowe, w tym drżenie spoczynkowe, sztywność, bradykinezyja oraz inne, jak depresja i zaburzenia funkcji poznawczych. Ponadto, pacjenci z PD często wykazują objawy niemotoryczne, w tym objawy wpływające na węch (związane z utratą węchu), układ pokarmowy, sercowo-naczyniowy i moczowo-płciowy.

Najczęstszymi objawami ze strony układu pokarmowego są zaparcia, utrata apetytu, dysfagia, ślinotok i refluks żołądkowo-przełykowy. Co więcej, funkcja przewodu pokarmowego ulega stopniowemu pogorszeniu wraz z postępem choroby. Zaparcia są najczęstszym objawem autonomicznym w PD i występują u około 80% pacjentów. Nagromadzenie białka  $\alpha$ -syn w jelitowym układzie nerwowym prowadzi do zwiększonej przepuszczalności jelit, stresu oksydacyjnego i miejscowego stanu zapalnego. Powoduje to zmiany neurodegeneracyjne w jelitowym układzie nerwowym i może skutkować przedłużoną przepuszczalnością jelit i zaparciami. Agregacja  $\alpha$ -synukleiny jest wieloetapowym, heterogenicznym procesem, stanowiącym główny element patogenezy choroby. W warunkach natywnych  $\alpha$ -synukleina występuje jako rozpuszczalne monomeryczne niesfałdowane białko. Ciała Lewy'ego, powstałe w wyniku nieprawidłowego fałdowania białek  $\alpha$ -synukleiny, znajdują się w strukturach ośrodkowego układu nerwowego, obwodowych układach autonomicznych i jelitowym układzie nerwowym. Obecne hipotezy sugerują, że jelitowy układ nerwowy może być jednym z pierwszych miejsc, w których pojawia się patologia ciał Lewy'ego. Ciała Lewy'ego i białka  $\alpha$ -syn mogą pojawiać się w jelitach, zanim pojawią się w mózgu, a obserwacje te ujawniają hipotezę, że PD zaczyna się w jelitach i rozprzestrzenia się do mózgu. Zwiększona przepuszczalność jelit w połączeniu z obecnością  $\alpha$ -synukleiny w jelitach, we wczesnych stadiach, może powodować nasiloną progresję choroby. Wiadomo, że nieprawidłowe fałdowanie  $\alpha$ -synukleiny do struktur beta jest wzmacniane przez kilka czynników, takich jak toksyny środowiskowe, stres oksydacyjny i warianty genetyczne. Biorąc pod uwagę, to, że mniej niż 10% przypadków PD jest związanych z określonymi zmianami genetycznymi, naukowcy wciąż poszukują środowiskowych czynników ryzyka przyczyniających się do rozwoju choroby. Rola odżywiania w rozwoju i zapobieganiu chorobom zawsze była interesująca dla wielu grup badaczy. Nowe dowody sugerują, że wpływ diety na zdrowie mózgu nie wynika z wywołanej dietą odpowiedzi zapalnej, ale z wpływu składu diety na mikrobiom jelitowy. Mikrobiota jelitowa okazuje się być niezbędna dla ludzkiego zdrowia i układu odpornościowego. Odgrywa również ważną rolę w dwukierunkowej komunikacji między jelitami a mózgiem. Ostatnie badania wykazały, że zmiany w mikrobiocie jelitowej mogą wpływać na fizjologiczne, behawioralne i poznawcze funkcje mózgu. Mikrobiota jelitowa wpływa na aktywność mózgu poprzez oś mikrobiota-jelita-mózg zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Kombinacje określonych składników odżywczych, które obejmują prekursor neuronalny i kofaktory, mogą zapobiegać utracie synaptycznej i zmniejszać patologię związaną z przepuszczalnością błon zarówno w ośrodkowym, jak i jelitowym układzie nerwowym. Składniki diety odgrywają ważną rolę w modulowaniu populacji drobnoustrojów jelitowych, a tym samym w



zapobieganiu i leczeniu niektórych chorób. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań dotyczące roli czynników żywieniowych w PD są sprzeczne. Istnieją pewne dowody wskazujące na ochronną rolę kofeiny, warzyw, owoców, ryb, białka, tłuszczów, węglowodanów, błonnika, polifenoli i szkodliwą rolę produktów mlecznych. Pojawiły się również doniesienia na temat określonych rodzajów diet, jak na przykład: dieta MIND (z *ang.* Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay), oparta na diecie śródziemnomorskiej i dieta DASH (z *ang.* Dietary Approaches to Stop Hypertension), które jak wynika z raportów, opóźniają początek zachorowania na PD.

W opisywanym badaniu, zainteresowaliśmy się wpływem diety typu Western diet (z *ang.*) na występowanie i przebieg PD. Jest to najpopularniejsza, w Europie, dieta zachodnia, która charakteryzuje się wysokim spożyciem kalorycznym pokarmów o dużej gęstości energetycznej, bogatych w nasycone kwasy tłuszczowe omega-6 ( $\omega 6$ ), rafinowane cukry, nadmierne spożycie soli i niskie spożycie kwasów tłuszczowych omega-3 ( $\omega 3$ ) i błonnika. Dieta ta, wzbogacona głównie w duże ilości nasyconych tłuszczów zwierzęcych, owoców, warzyw w puszkach, napojów gazowanych, smażonych potraw, wołowiny, lodów i sera, jest powszechnie wiązana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju PD. Przez całe życie człowieka, od momentu narodzin, aż po okres starości, wiele czynników wpływa na kształtowanie się i modyfikację profilu mikrobioty przewodu pokarmowego. Są to, przede wszystkim, czynniki środowiskowe, nawyki żywieniowe, genetyka gospodarza, praktyki higieniczne i leki. Chociaż społeczności drobnoustrojów jamy ustnej są bardzo zmienne, wcześniejsze dowody wykazały, że zaburzenia mikrobiomu, w jamie ustnej, mogą wpływać na zdrowie i wywoływać choroby.

Celem badania była analiza preferencji żywieniowych u pacjentów z PD oraz analiza regionów V3 i V4, w obrębie genu 16s rRNA, w próbkach pobranych z jamy ustnej i porównanie wyników do osób zdrowych, pozostających na diecie typu Western.

Badanie miało charakter opisowego badania przekrojowego. Do badania włączono 59 pacjentów ze zdiagnozowaną PD oraz 108 osób zdrowych. Wiek uczestników badania mieścił się w zakresie od 51 do 82 lat. W grupie pacjentów z PD progresję choroby oceniano za pomocą skali Hoehna i Yahra oraz skali oceny choroby Parkinsona MDS-UPDRS część III (z *ang.* Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III) w czasie ON. Dodatkowo, u pacjentów z PD wykonano tomografię komputerową lub rezonans magnetyczny w celu wykluczenia parkinsonizmu naczyniowego. Pacjenci z PD zostali wykluczeni z tego badania, jeśli zdiagnozowano u nich inne choroby neurologiczne, takie jak infekcje ogólnoustrojowe lub neurologiczne, choroby zapalne lub autoimmunologiczne, nietypowy zespół parkinsonizmu i

parkinsonizm naczyniowy. Kryterium wykluczenia w tej grupie była również operacja mózgu, współistniejące choroby psychiatryczne, takie jak schizofrenia lub choroba afektywna dwubiegunowa. Pacjenci z potwierdzonymi lub podejrzanymi nowotworami złośliwymi przewodu pokarmowego lub innymi chorobami przewodu pokarmowego zostali również wykluczeni. Pacjenci z PD, u których w wywiadzie stwierdzono stosowanie antybiotyków lub probiotyków, w ciągu ostatnich trzech miesięcy lub terapię opartą na steroidach, niesteroidowych lekach przeciwzapalnych lub przebytą operację żołądkowo-jelitową (np. resekcję żołądka lub poważną operację jelit) nie brali udziału w tym badaniu. Wszyscy uczestnicy otrzymali kwestionariusz analizujący ich preferencje żywieniowe. Kwestionariusz składał się z dwóch części i został przeprowadzony przed pobraniem próbek. Pierwsza część służyła do określenia parametrów antropometrycznych, takich jak masa ciała, wzrost, wiek, płeć, status społeczno-ekonomiczny, status edukacyjny i historia medyczna. Druga część obejmowała 33 produkty spożywcze, w tym składniki typowe dla diety zachodniej i śródziemnomorskiej. Druga część zawierała również pytania dotyczące sposobu przygotowywania żywności, jak gotowanie, gotowanie na parze, pieczenie, grillowanie i smażenie. Od każdego uczestnika badania pobrano materiał biologiczny w postaci wymazów z jamy ustnej, z których wyizolowano materiał genetyczny - genomowy DNA bakterii, za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu QIAamp BiOstic Bacteremia DNA (firmy Qiagen). Biblioteki genetyczne przygotowano przy użyciu sekwencji specyficznych dla genów ukierunkowanych na regiony V3 i V4 genu 16S rRNA. Sekwencjonowanie przeprowadzono za pomocą wysokoprzepustowej technologii sekwencjonowania następnej NGS, w aparacie MiSeq (firmy Illumina).

Na podstawie uzyskanych wyników, wykazano znaczące różnice w preferencjach żywieniowych pomiędzy grupą badaną, z PD, a kontrolną. Najbardziej istotne okazały się zmiany profili mikrobiomu jamy ustnej oraz zidentyfikowane korelacje pomiędzy określonymi mikroorganizmami, a spożywanymi produktami.

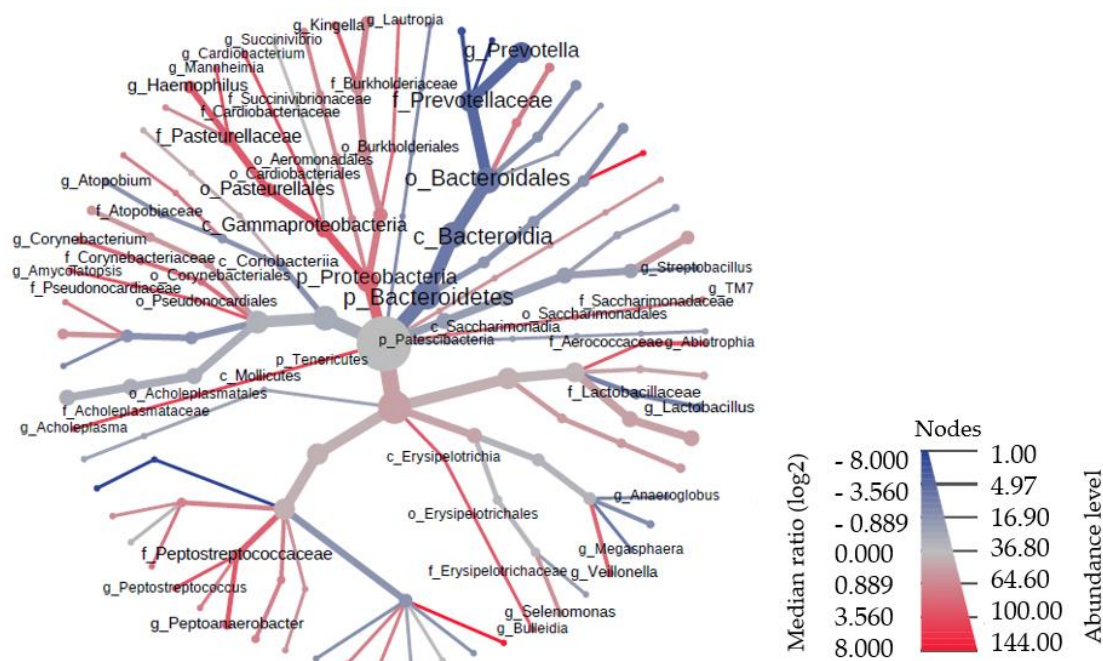
W Tabeli 2 przedstawiono uzyskane wyniki korelacji.

**Tabela 2.** Wartości korelacji Pearsona pokazują związek między bakteriami a częstotliwością spożywania określonych produktów spożywczych. Kolor niebieski oznacza najsilniejsze korelacje dodatnie, podczas gdy kolor czerwony oznacza najsilniejsze korelacje ujemne.

	Cross Vegetables	Yellow Vegetables	Leaf Vegetables	Parsley	Root Vegetables	Tomatoes	Chicken	Soy	Peanuts
Prevotella nanceiensis	-0.32	0.15	0.24	-0.23	0.14	0.02	-0.34	-0.03	-0.05
Haemophilus pittmaniae	-0.07	0.31	-0.03	-0.03	0.16	0.33	-0.12	-0.04	-0.26
Streptococcus sanguinis	-0.18	-0.20	-0.16	-0.10	-0.14	-0.24	0.23	0.03	0.15
Veillonella rogosae	0.21	0.28	0.41	0.04	0.23	0.25	-0.27	-0.12	-0.05
Haemophilus parainfluenzae	0.13	0.10	0.13	0.00	0.18	0.19	-0.08	0.03	0.09
Porphyromonas gingivalis	-0.04	-0.05	0.08	-0.08	0.21	0.02	0.18	-0.20	-0.24
Streptobacillus felis	-0.34	-0.04	0.06	-0.10	0.13	-0.10	0.04	-0.24	-0.13
Prevotella salivae	-0.10	-0.22	0.03	0.19	0.13	-0.07	0.11	-0.03	0.05
Prevotella pallens	-0.12	-0.07	0.10	-0.02	0.17	-0.19	-0.14	-0.03	0.19
Megasphaera micronuciformis	0.10	0.20	0.22	0.21	0.30	-0.01	-0.05	0.08	0.06
Prevotella jejuni	-0.05	-0.30	0.23	0.28	0.18	-0.23	0.08	0.09	0.32
Prevotella histicola	0.05	-0.02	0.25	0.04	0.04	0.00	-0.13	0.20	0.02
Prevotella melaninogenica	-0.29	-0.52	0.00	-0.09	0.01	-0.13	-0.09	-0.16	0.20
Streptococcus sobrinus	0.01	0.22	0.06	-0.09	-0.13	-0.07	-0.27	-0.10	-0.10
	Fruit	Apricots	Avocado and Olives	Dry Fruits	Fresh Fruits	Canned Fruits	Milk	Eggs*	Dark Bread
Prevotella nanceiensis	0.07	-0.23	0.03	-0.04	-0.08	0.07	-0.20	-0.40	-0.13
Haemophilus pittmaniae	0.19	-0.31	-0.04	-0.07	-0.01	0.12	0.13	-0.11	-0.20
Streptococcus sanguinis	-0.04	-0.08	-0.10	0.14	-0.13	-0.16	0.38	-0.02	0.03
Veillonella rogosae	0.19	-0.20	0.02	-0.08	0.14	-0.06	0.17	0.14	0.13
Haemophilus parainfluenzae	0.17	-0.02	0.07	0.09	0.37	-0.03	0.19	0.06	0.09
Porphyromonas gingivalis	-0.53	-0.34	-0.25	-0.22	-0.21	-0.13	-0.35	-0.12	-0.28
Streptobacillus felis	0.06	0.08	-0.04	-0.14	0.14	-0.14	-0.16	-0.12	-0.26
Prevotella salivae	0.05	0.26	0.08	0.09	0.26	0.31	0.02	-0.28	-0.16
Prevotella pallens	-0.04	0.03	0.19	0.10	-0.08	0.15	-0.08	-0.43	-0.05
Megasphaera micronuciformis	0.00	0.26	0.24	0.06	0.04	0.06	-0.02	-0.45	-0.03
Prevotella jejuni	0.09	0.09	0.21	0.29	-0.03	0.13	0.19	-0.22	0.10
Prevotella histicola	0.05	0.38	0.01	0.13	0.38	0.18	-0.18	-0.25	0.04
Prevotella melaninogenica	0.17	0.03	-0.07	0.16	0.22	0.23	0.01	-0.04	-0.10
Streptococcus sobrinus	-0.26	0.03	0.11	-0.21	-0.36	-0.42	-0.10	-0.07	0.26
	White Bread	Thick Groats	Breakfast Cereal Products	Butter	Margarine	Plant Oils	Red Meat	White Meat	Fish
Prevotella nanceiensis	0.10	-0.20	0.25	-0.17	0.15	-0.22	-0.28	-0.18	-0.15
Haemophilus pittmaniae	0.18	-0.19	0.34	0.04	-0.02	0.02	0.05	-0.31	-0.14
Streptococcus sanguinis	0.01	-0.10	-0.17	0.09	-0.06	0.35	-0.03	0.12	0.06
Veillonella rogosae	0.04	-0.16	0.19	0.12	-0.13	-0.31	0.07	-0.11	-0.12
Haemophilus parainfluenzae	-0.02	0.03	0.22	-0.04	-0.01	-0.24	-0.18	-0.20	-0.09
Porphyromonas gingivalis	0.21	-0.12	0.16	0.16	-0.19	0.19	0.20	-0.25	-0.12
Streptobacillus felis	-0.26	-0.20	-0.11	-0.25	0.31	-0.23	-0.33	-0.03	-0.16
Prevotella salivae	0.00	0.07	0.02	-0.04	0.02	-0.18	-0.26	-0.19	0.00
Prevotella pallens	0.13	-0.16	0.00	-0.09	0.06	-0.22	-0.15	-0.02	-0.03
Megasphaera micronuciformis	-0.07	0.16	0.01	-0.17	0.10	-0.11	-0.34	-0.25	-0.05
Prevotella jejuni	-0.03	-0.12	0.07	0.13	-0.18	-0.23	-0.20	-0.15	-0.19
Prevotella histicola	-0.17	0.33	0.02	-0.32	0.27	-0.08	0.34	-0.13	-0.17
Prevotella melaninogenica	0.13	-0.22	0.06	0.26	-0.28	0.08	0.18	-0.14	-0.18
Streptococcus sobrinus	-0.08	-0.10	-0.25	-0.23	0.31	-0.07	0.07	0.10	-0.06
	Juices	Sweetened Drinks	Coffee	Alcohol	Amount of Water	Frying	Cooking	Baking	Sulfonation
Prevotella nanceiensis	-0.19	0.03	-0.47	-0.26	-0.06	-0.38	0.03	-0.20	0.04
Haemophilus pittmaniae	0.05	0.30	-0.13	0.03	-0.17	-0.12	0.00	-0.46	-0.19
Streptococcus sanguinis	-0.05	0.12	0.04	-0.16	-0.02	0.17	-0.08	0.08	-0.14
Veillonella rogosae	0.07	-0.01	0.06	-0.04	-0.10	0.04	0.00	-0.17	-0.31
Haemophilus parainfluenzae	-0.21	-0.18	-0.09	-0.21	-0.03	-0.37	0.03	-0.51	-0.03
Porphyromonas gingivalis	0.16	-0.02	0.09	0.01	-0.24	0.17	0.02	-0.09	0.11
Streptobacillus felis	0.00	-0.22	-0.28	-0.13	0.03	-0.17	-0.29	0.15	0.06
Prevotella salivae	0.03	-0.09	-0.29	-0.24	-0.33	-0.27	-0.32	0.00	0.11
Prevotella pallens	-0.20	-0.10	-0.49	-0.48	-0.18	-0.22	-0.05	-0.04	0.30
Megasphaera micronuciformis	-0.09	-0.10	-0.37	-0.42	-0.04	-0.33	-0.19	0.03	0.16
Prevotella jejuni	-0.17	-0.17	-0.29	-0.36	-0.30	-0.12	-0.32	-0.04	0.01
Prevotella histicola	0.02	-0.21	-0.23	-0.25	-0.03	-0.31	-0.14	0.02	0.02
Prevotella melaninogenica	-0.26	-0.01	-0.03	-0.12	-0.52	0.16	-0.01	-0.04	-0.14
Streptococcus sobrinus	-0.17	-0.07	0.10	0.16	0.36	-0.11	0.00	-0.01	0.09

Analizy sekwencjonowania NGS wybranych regionów, w obrębie genu 16S rRNA pokazały istotne różnice w składzie mikrobioty jamy ustnej u pacjentów z PD, w porównaniu do grupy kontrolnej. Najbardziej istotne różnice zobrazowano na Figurze 3.

W badaniu wykazano, że mikrobiom jamy ustnej pacjentów z PD charakteryzuje się wysokim bogactwem rodzajów Prevotellaceae, Streptobacillaceae i Lactobacillaceae. Jak wynika z innych badań, zwiększona liczebność Prevotella jest krytycznym czynnikiem w rozwoju przewlekłego zapalenia jelit, powodującego dysfunkcję błony śluzowej i ogólnoustrojowy stan zapalny. Ogólnoustrojowe zapalenie jest związane z progresją różnych chorób, w tym także PD. U pacjentów z PD, zaobserwowano również zwiększone bogactwo Streptococcus spp., które, w innych badaniach, powiązano z zapaleniem żołądka u pacjentów bez infekcji *Helicobacter pylori*.



**Figura 3.** Drzewo porównujące względną liczebność bakterii dla grupy badanej z PD względem grupy kontrolnej. Uwzględniono nazwy mikroorganizmów w zakresie 7 poziomów taksonomicznych, na podstawie  $p < 0.05$ .

#### 2.4.4. Podsumowanie

Przedstawiony cykl publikacji głównego osiągnięcia naukowego, stanowi podstawę wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego, w zakresie nauk medycznych. Temat choroby Parkinsona, jest przedmiotem moich zainteresowań już od początku studiów doktoranckich. W wyniku, do tej pory przeprowadzonych, badań udało się zwrócić uwagę na dwa bardzo istotne wątki, które w dalszym ciągu rozwijam i kontynuuję, prowadząc badania z zastosowaniem wysokoprzepustowych metod, w zakresie badań omicznych. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań (publikacja numer 1) zwracają szczególną uwagę na indywidualne podejście terapeutyczne, zależne, w dużym stopniu, od podłoża genetycznego danego pacjenta, co mogłoby determinować lepszą skuteczność terapeutyczną oraz pozwolić na ograniczenie objawów ubocznych. Pozostałe dwa badania (publikacja numer 2 i 3) stanowią potwierdzenie teorii, że za patologię choroby mogą odpowiadać czynniki zależne od składu mikrobioty przewodu pokarmowego. Wykazane różnice zarówno w profilach mikrobioty jelitowej, ale także mikrobioty jamy ustnej zwracają szczególną uwagę na fakt, że markery bakteryjne, a zatem analiza składu mikroflory przewodu pokarmowego, mogą stanowić narzędzie nie tylko na

etapie wczesnej diagnostyki (kiedy pojawiają się niecharakterystyczne dla choroby objawy pozaruchowe, zwłaszcza zaparcia czy też refluks żołądkowo-jelitowy) ale także na etapie dobierania odpowiedniej terapii. Jak wiadomo, mikroflora przewodu pokarmowego jest podatna na modulację, która przebiega w stosunkowo krótkim okresie czasu (w zakresie 3 - 6 miesięcy), a na to ma wpływ przede wszystkim dieta i zawarte w niej, odpowiednio dobrane składniki pożywienia.

Na chwilę obecną, tematem mikrobioty przewodu pokarmowego zajmuje się w dalszym ciągu. Badania związane z chorobą Parkinsona poszerzyłam na różne formy terapii, aktualnie we współpracy z klinicystami z neurologii zbieramy materiał do badań mikrobiomu u pacjentów leczonych nowym lekiem Duodopą, podawaną w ciągłym wlewie dojelitowym oraz za pomocą dawek w postaci iniekcji podskórnych. Oprócz choroby Parkinsona, zaczęłam prowadzić badania także w kontekście innych chorób neurodegeneracyjnych, jak choroba Alzheimera i Huntingtona. Analizy mikrobiomu u pacjentów z chorobą Huntingtona przeprowadziłam zarówno w próbkach kału, jak i z jamy ustnej i są w trakcie przygotowania do publikacji. Ponadto, w 2022 mój projekt o tytule "Stworzenie systemu wielonarządowej komunikacji typu organ-on-a-chip z zastosowaniem technik mikroprzepływowych do modelowania i badania interakcji pomiędzy mikrobiotą jelitową, barierą krew-mózg oraz mózgiem w procesach neurodegeneracji" został doceniony przez Agencję Badań Medycznych (ABM) i zakwalifikowany do wzięcia udziału w I edycji Programu Platformy Mentoringowej Warsaw Health Innovation Hub (WHIH), jako jeden z 10 najlepszych projektów. W ramach tego projektu zamierzam zastosować techniki mikroprzepływowe do stworzenia modelu wielonarządowej komunikacji typu organ-on-a-chip w celu zbadania interakcji pomiędzy mikrobiotą jelitową a chorobami neurodegeneracyjnymi.

#### **4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych**

Poniżej przedstawiam tematykę badawczą, która poza osiągnięciem naukowym opisanym powyżej, stanowi istotną część mojej działalności naukowej. Jest to 5 wybranych publikacji, w których jestem pierwszym autorem. Tematem wybranych prac, są różne fenotypy kliniczne, jednak elementem spójnym jest przede wszystkim zastosowanie wysokoprzepustowych metod genetyki i genomiki oraz analiz omicnych celem badania patomechanizmów lub składu mikrobiomu, co stanowi ważny element moich zainteresowań i rozwoju zarówno naukowego, jak i zawodowego, który kontynuuję do dzisiaj.

#### 4.1. Publikacja numer 1

Differences in the composition of Akkermansia species and families of Christensenellaceae and Ruminococcaceae bacteria in the gut microbiota of healthy polish women following a typical western diet; **Zapala Barbara**, Pustelnik Justyna, Dudek Alicja, Milewicz Tomasz; Diversity 2023:

Vol. 15, nr 10, id. art. 1103, il., bibliogr. 91 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: **Barbara Zapala**

**IF: 2.400, MEiN: 70.000**

Praca stanowi kontynuację badań nad mikrobiomem. Jej celem była analiza zmienności zdrowego mikrobiomu, co stanowi wyzwanie podejmowane już od co najmniej 60 lat, kontynuowane m.in. w ramach Human Microbiome Project (HMP). Celem podejmowanych badań jest scharakteryzowanie podstawowego zestawu mikroorganizmów, powszechnie występujących u zdrowych ludzi. Jest to, o tyle istotne, że uwzględniając atrakcyjność tematów związanych z mikrobiomem, w licznych badaniach, w kontekście różnych chorób, wciąż brakuje informacji na temat referencyjnych wartości, tzw. zdrowego profilu mikrobiomowego.

W badaniu, przeprowadziliśmy analizy 16S rRNA, wykonane za pomocą technologii NGS, w próbkach pochodzących z dwóch odcinków przewodu pokarmowego, tj. jamy ustnej oraz jelit. Do badania włączono zdrowych ochotników, niepalących, nieotyłych, będących na diecie typu Western diet. Wśród uczestników było 77 kobiet i 67 mężczyzn, w przedziale wiekowych od 18-65 roku życia.

Uzyskane wyniki, dotyczące podstawowego profilu mikrobiomu, pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi. Pomimo, że dieta typu zachodniego, która znacząco różni się, chociażby od diety śródziemnomorskiej, to skład mikrobioty u osób stosujących dietę typu Western diet był bardzo podobny do innego typu diet. Dominowały w nim typy Firmicutes i Bacteroidetes, łącznie stanowiąc 91,5% mikroflory jelitowej u mężczyzn i 90% u kobiet. Na poziomie rodzaju, największą część mikroflory jelitowej stanowiły bakterie z rodziny Lachnospiraceae – 38,5% u mężczyzn, 31,5% u kobiet – oraz bakterie z rodzaju Bacteroides – około 13% u mężczyzn i kobiet. Co więcej, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet Bacteroides spp. i Anaerostipes spp. łącznie stanowiły około 25%. Jednym z ciekawszych wyników badania było wykazanie istotnych statystycznie różnic na poziomie różnorodności beta zależnych od płci ( $p < 0,048$ ).

W jamie ustnej dominowały Firmicutes i Proteobacteria – 54% u mężczyzn i 57% u kobiet. U kobiet dominował rodzaj bakterii Rothia, natomiast u mężczyzn Prevotella. Najpopularniejszymi gatunkami bakterii, w mikroflorze jamy ustnej zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet były Prevotella spp., Gemella spp., Rothia spp., Actinomyces spp. i Veillonella spp. Innym ciekawym odkryciem było wykazanie istotnych statystycznie różnic w bogactwie *Akkermansia muciphila*, która to bakteria należy do grupy mikroorganizmów rozkładających mucynę i wytwarzających krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Wykazano, że jej obecność zapobiega zaburzeniom metabolicznym i koreluje z lepszą kondycją kardiometaboliczną, a także korzystnie wpływa na stany zapalne i metabolizm glukozy. W przeprowadzonym badaniu wykazano zwiększone bogactwo *Akkermansia muciphila* w jelitach u kobiet, w porównaniu z mężczyznami ( $p < 0,030$ ).

#### 4.2. Publikacja numer 2

miRNA signature of urine extracellular vesicles shows the involvement of inflammatory and apoptotic processes in diabetic chronic kidney disease; **Zapala Barbara**, Kamińska Agnieszka, Piwowar Monika, Paziewska Agnieszka, Gala-Błądzińska Agnieszka, Ewa Łucja Stępień  
Pharmaceutical Research 2023: Vol. 40, nr 4, s. 817-832, il., bibliogr. 60 poz., abstr.

Autor korespondencyjny: Ewa Ł. Stępień

**IF: 3.700; MEiN: 70.000**

Praca dotyczy problemu związanego z występowaniem dysfunkcji nerek, u pacjentów z cukrzycą. Powstała w ramach współpracy z Zakładem Fizyki Medycznej UJ oraz Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, w Warszawie i Zakładem Genetyki, Centrum Onkologii - Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej-Curie, w Warszawie. W badaniu tym podjęłam się wykonania analizy sekwencjonowania na poziomie RNA, stosując techniki NGS (na platformie IonTorrent) w poszukiwaniu mechanizmów epigenetycznych, a ściślej ujmując małych, nekodujących RNA - miRNA. Praca jest o tyle ciekawa, że analizy zostały wykonane w mikropęcherzykach wyizolowanych z moczu od pacjentów z zaburzeniami funkcji nerek, w efekcie powikłań, na skutek przewlekłej cukrzycy. Głównym celem było zbadanie roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z moczu w nerkach chorych na cukrzycę typu 2. Do badania włączono 8 pacjentów ze zdiagnozowaną przewlekłą cukrzycą i chorobą nerek oraz 6 osób zdrowych. Do wyselekcjonowania mikropęcherzyków o średnicy 50 - 300 nm wykorzystano mikroskop elektronowy. Materiał genetyczny, w postaci RNA, w zakresie miRNA został wyizolowany z mikropęcherzyków pochodzących z próbek moczu pozyskanego od uczestników

badania. Sekwencjonowanie typu RNA-seq przeprowadzono w aparacie Ion Torrent PGM (Life Technologies).

Wyniki przeprowadzonego badania okazały się bardzo interesujące. Zidentyfikowano bowiem miRNA, które są zaangażowane w patomechanizm nie tylko cukrzycy, ale również mogą być związane z zaburzeniem funkcjonowania nerek. Spośród miRNA, które udało nam się zidentyfikować, zaobserwowano niską ekspresję hsa-mir-375 oraz wysoki poziom ekspresji hsa-miR-503 i hsa-miR-451a. Na uwagę, w szczególności, zasługują te, spośród wszystkich wykrytych miRNA, gdyż są to jedne z najczęściej opisywanych jako potencjalne czynniki terapeutycznych. Ten fakt podkreśla znaczenie uzyskanych, w niniejszym badaniu, wyników nie tylko w kontekście samego patomechanizmu, ale także leczenia chorób nerek stanowiących powikłanie przewlekłej cukrzycy.

#### **4.3. Publikacja numer 3**

Reduction in the Free Androgen Index in Overweight Women After Sixty Days of a Low Glycemic Diet; Zapala Barbara, Marszalec Patrycja, Piwowar Monika, Chmura Olaf, Milewicz Tomasz; *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2024 Jan;132(1):6-14; Epub 2024 Jan 18.

Autor korespondencyjny: **Barbara Zapala**

**IF: 1.800; MEiN: 70**

Hiperandrogenizm jest powszechnym, heterogennym i endokrynologicznym schorzeniem dotyczącym 5-10% kobiet w wieku rozrodczym. Jego występowanie ma kilka możliwych przyczyn, w tym m. in. nowotwory nadnerczy lub jajników, choroba Cushinga, akromegalia, hiperprolaktynemia. Znane są również przypadki kliniczne, w których rozróżnienie konkretnych przyczyn związanych z nadmiarem androgenów może stanowić wyzwanie. U kobiet z hiperandrogenizmem, w około 85% przypadków, rozpoznaje się zespół policystycznych jajników (PCOS). Kobiety z hiperandrogenizmem są bardziej narażone na wiele problemów zdrowotnych, w tym występowanie nadciśnienia tętniczego, choroby wieńcowej, otyłości, cukrzycy typu 2, cukrzycy ciążowej, niepłodności, poronień, zaburzeń lub braku owulacji, nowotworów endometrium czy też piersi. U kobiet z nadmiarem androgenów obserwuje się dużą heterogenność objawów klinicznych, a przede wszystkim tych wynikających z nieprawidłowości w zakresie funkcji osi podwzgórzowo-przysadkowej, jajników i nadnerczy. Tego rodzaju nieprawidłowości uznawane są za najbardziej prawdopodobną przyczynę hiperandrogenizmu, aczkolwiek w dalszym



ciągu poszukuje się czynników ryzyka. Obecnie wiadomo, że zarówno czynniki środowiskowe i insulinooporność odgrywają najistotniejszą rolę w patogenezie nadmiaru androgenów. Indukowana insulinoopornością hiperinsulinemia stymuluje wątrobową produkcję androgenów, powodując spadek wątrobowej globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG). Jest to póki co najsilniejsza hipoteza wyjaśniająca patomechanizm hiperandrogenizmu. Rozpoznanie hiperandrogenizmu zależy od określenia objawów klinicznych i biochemicznych pomiarów nadmiaru androgenów. Otyłość jest krytycznym czynnikiem, który pogarsza kliniczne konsekwencje nadmiaru androgenów, takie jak zmniejszona częstotliwość owulacji, nieregularne cykle miesiączkowe, niepłodność. Otyłość jest również silnie związana z wysokim poziomem męskich hormonów, przede wszystkim testosteronu. Wzrost poziomu testosteronu powoduje hirsutyzm, definiowany jako nadmierne owłosienie typu męskiego. Hirsutyzm jest diagnozowany u około 80% kobiet cierpiących na nadmiar androgenów i jest silnie związany z obserwowanymi u pacjentek zaburzeniami psychicznymi, które w znacznym stopniu pogarszają jakość życia chorych. Podstawowe leczenie hiperandrogenizmu opiera się na zdrowym stylu życia, na który składa się zbilansowana dieta, regularny wysiłek fizyczny oraz osiągnięcie i utrzymanie prawidłowej masy ciała. Ponieważ bardzo mało doniesień naukowych wyjaśnia wpływ diety i stylu życia na kliniczne cechy związane z hiperandrogenizmem, stąd podjęliśmy temat niniejszej pracy.

Celem badania była ocena związku pomiędzy stylem życia a wzorcami żywieniowymi u kobiet z rozpoznaniem hiperandrogenizmem. Kolejno, określono skuteczność modyfikacji stylu życia, w zakresie wpływu diety o obniżonym indeksie glikemicznym i przeciwzapalnej interwencji żywieniowej na objawy kliniczne hiperandrogenizmu oraz wyniki badań antropometrycznych i biochemicznych.

Do badania włączono 34 kobiety w wieku rozrodczym (18-49 lat), u których odnotowano wysoki poziom testosteronu całkowitego, niski poziom SHBG, brak stosowania antykoncepcji hormonalnej przez okres przynajmniej 6 miesięcy oraz inne problemy zdrowotne - cechy kliniczne, powiązane z fenotypem hiperandrogenizmu, takie jak: nadmierna masa ciała, nadmierne owłosienie, trądzik, szczególnie w okolicy żuchwy, nieregularne miesiączki lub ich brak, wypadanie włosów, z charakterystycznymi zakolami typu męskiego, zdiagnozowany PCOS, wrodzona insulinooporność, przerost kory nadnerczy, zespół Cushinga oraz hiperprolaktynemia.

Celem zweryfikowania preferencji żywieniowych, przeprowadzono badanie ankietowe, dotyczące żywienia i stylu życia oraz poproszono każdą z uczestniczek badania o wykonanie oznaczenia poziomu testosteronu i SHBG. W drugim etapie, wprowadzono dietę o niskim indeksie glikemicznym, o charakterze przeciwzapalnym, z lekkim deficytem energetycznym. Dieta ta

mieściła się w kalorycznościach od 1600 kilokalorii (kcal) do 1900 kcal i była stosowana przez okres 2 miesięcy. Po 2 miesiącach stosowania diety, kobiety biorące udział w badaniu, zostały poproszone o ponowne wykonanie badania poziomu testosteronu całkowitego i SHBG oraz ponowne wypełnienie ankiety na temat aktualnego żywienia i aktywności fizycznej.

Badanie to wykazało istotny związek między statusem i wzorcami żywieniowymi a obrazem klinicznym hiperandrogenizmu, a także zmianami w zakresie poziomów testosteronu i SHBG. Co więcej, uzyskane wyniki pokazały znaczącą poprawę stanu psychicznego kobiet. Istotnym odkryciem była pozytywna korelacja między zachodnimi wzorcami żywieniowymi a brakiem aktywności fizycznej z progresją klinicznego hiperandrogenizmu u kobiet przed interwencją dietetyczną. Po interwencji dietetycznej większość kobiet straciła na wadze, stosując dietę o niskim indeksie glikemicznym o charakterze przeciwzapalnym, a co najważniejsze zaobserwowano istotne zmiany parametrów biochemicznych, zwłaszcza obniżenie poziomu testosteronu i wzrost SHBG. U części kobiet zaobserwowano osłabienie objawów klinicznych i co bardzo istotne powrót do regularnych miesiączek.

Z punktu widzenia klinicznego, badanie to wnosi bardzo istotne informacje na temat potencjału metod interwencji żywieniowych, możliwych do zastosowania jako interwencje terapeutyczne. Z naszego punktu widzenia wyniki stanowią ciekawy wątek naukowy, który na chwilę obecną jest w dalszym ciągu rozwijany, w kontekście badań mikrobiomowych, z uwagi na silny związek pomiędzy mikrobiotą a dietą.

#### **4.4. Publikacja numer 4**

Comparison of iSeq and MiSeq as the two platforms for 16S rRNA sequencing in the study of the gut of rat microbiome; Salamon D, Zapała B, Krawczyk A, Potasiewicz A, Nikiforuk A, Stój A, Gosiewski T; Appl Microbiol Biotechnol. 2022 Nov;106(22):7671-7681

Autor korespondencyjny: Tomasz Gosiewski

**IF: 5.000; MEiN: 100**

W pracy numer 4, w której jestem pierwszym równorzędnym autorem, przeprowadzono analizy porównania dokładności i skuteczności dwóch wybranych metod w ramach sekwencjonowania NGS. Do tego celu wykorzystano dwa aparaty iSeq i MiSeq, firmy Illumina i wykonano sekwencjonowanie 16S rRNA w tych samych próbkach, pochodzących od szczurów z wywołaną eksperymentalnie schizofrenią. Uzyskane wyniki pozwoliły wykryć różnice w najważniejszych cechach, charakteryzujących profile mikrobiomowe, w zakresie bogactwa i różnorodności alfa oraz

różnic w strukturze mikrobiologicznej zbiorowości mikroorganizmów, tj. na poziomie beta różnorodności. Obie technologie są powszechnie stosowane, zwłaszcza w celach naukowych do wykrywania nowych cech i nowych gatunków mikroorganizmów. Często stosuje się je zamiennie. Wyniki naszych badań pokazały, że pomimo jednej technologii, opartej na NGS, stosowanie różnej aparatury wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Istotne różnice zaobserwowano w przypadku bogactwa gatunków, tj. za pomocą aparatu MiSeq zidentyfikowano większą liczbę gatunków w porównaniu z wynikami uzyskanymi dla tych samych próbek, za pomocą aparatu iSeq ( $p < 0,01$ ). Co więcej, większość OTU wykrytych na platformie iSeq reprezentowała ten sam gatunek. Co jest istotne, najbardziej wyraźne różnice obserwowano na poziomie gatunków, co jest bardzo ważne w kontekście zwłaszcza badań naukowych, w których głównym celem jest identyfikacja mało lub zupełnie nieznanymi mikroorganizmów.

Wyniki tego badania dostarczają ważnej i przełomowej informacji, tym bardziej, że do tej pory autorzy niektórych prac naukowych pisali o braku różnic przy doborze dwóch platform do sekwencjonowania. Jednym z nich był Nakao, który uznał, że obie platformy są w równym stopniu odpowiednie do oceny mikrobiomu środowiskowego ryb słodkowodnych, a wartość % PF dla iSeq była nieco niższa w porównaniu z MiSeq: odpowiednio 80,8% vs. 95,05%. Podobnie do innych autorów, którzy porównywali spójność, dokładność i powtarzalność sekwencjonowania krótkiego odczytu całego genomu, stosując cztery platformy firmy Illumina (MiSeq, NextSeq, iSeq, NovaSeq) i które według ich opinii dały podobne wyniki z niewielkimi jedynie, nieistotnymi różnicami. Wyniki naszego badania dostarczają nowych informacji i pokazały, że wybór odpowiedniego sekwenatora, do oceny mikrobiomu, jest bardziej krytyczny niż wcześniej opisane postulaty, na podstawie których nie stwierdzono istotnej różnicy w wynikach uzyskanych z iSeq i MiSeq.

#### **4.5. Publikacja numer 5 oraz publikacja numer 6 (podrozdział 4.6.)**

Publikacje numer 5 i 6, wybrane i opisane w ramach innych osiągnięć dotyczą chorób rzadkich. Ten obszar nauk medycznych, jest powiązany z moim rozwojem zawodowym ale także naukowym w kierunku specjalizowania się w zakresie Laboratoryjnej Genetyki Medycznej oraz Molekularnej Genetyki Medycznej. Jest to obszar badań którym zaczęłam zajmować się poczynając od stażu jaki odbyłam w Zakładzie Diagnostyki Genetycznej i Nutrigenomiki w Katedrze Biochemii Klinicznej UJCM, a którym zajmuję się do dzisiaj pełniąc rolę eksperta w zespole numer 5, w Krajowej Radzie ds. Chorób Rzadkich.

**Publikacja numer 5**

A case of mucopolysaccharidosis type VI in a polish family. Importance of genetic testing and genotype-phenotype relationship in the diagnosis of mucopolysaccharidosis; Zapała B, Chmura O, Ciałowicz U, Solnica B, Krajewska-Włodarczyk M, Żuber Z; Mol Genet Metab Rep. 2020 Oct 28;25:100658

Autor korespondencyjny: Barbara Zapała

**IF: 2.797; MEiN: 40**

Mukopolisacharydoza typu VI (MPS VI, OMIM: 253200), znana również jako zespół Maroteaux-Lamy'ego jest rzadkim, autosomalnie recesywnie dziedziczonym, lizosomalnym zaburzeniem spichrzeniowym, spowodowanym niedoborem aktywności N- acetylogalaktozamino-4-sulfatazy (4-sulfataza, arylosulfataza B, ARSB, EC 3.1.6.12). ARSB jest enzymem krytycznym dla degradacji glikozaminoglikanów (GAG), siarczanu dermatanu i siarczanu chondroityny. Defekty molekularne powodujące MPS VI prowadzą do akumulacji GAG w tkance łącznej, lizosomach i wydalaniu z moczem częściowo zdegradowanego siarczanu dermatanu. Częstość występowania MPS wynosi około 0,22 przypadku na 100 000 urodzeń dla MPS I, podczas gdy dla MPS II częstość występowania oszacowano na 0,45 przypadków na 100 000 urodzeń; dla MPS IV A i B na 0,14 przypadków na 100 000 urodzeń; a dla MPS VI, 0,03 przypadków na 100 000 urodzeń. Częstość występowania MPS VI różni się znacznie w zależności od populacji, wahając się od 0 w Irlandii Północnej do 20 na 100 000 żywych urodzeń w hrabstwie Monte Santo w północno-wschodniej Brazylii. W Europie Środkowej i Wschodniej wskaźnik zachorowalności waha się od 0,03 do 0,64 na 100 000 żywych urodzeń, odpowiednio w Polsce i Litwie. Co ciekawe, zwłaszcza w odniesieniu do przeprowadzonego badania, w Polsce, MPS VI to najrzadsza postać mukopolisacharydozy. W badaniu, przeprowadzono analizy kliniczne, biochemiczne oraz finalnie badania genetyczne u pacjenta oraz członków IV-pokoleniowej rodziny, w której probant był nieprawidłowo leczonym pacjentem, z nieprawidłową diagnozą MPS typu I.

Przeprowadzone za pomocą sekwencjonowania sangerowskiego analizy genetyczne ujawniły nonsensowny wariant w egzonie drugim genu ARSB, powodujący zamianę argininy w pozycji nukleotydowej 160, na kodon stop, [p.(Arg160\*)], prowadząc do zatrzymania translacji białka. W badaniu tym, nie tyle ważnym okazał się opis studium przypadku, ale przede wszystkim wskazanie na wysoką wartość badań molekularnych w kontekście diagnozowania mukopolisacharydozy i zależności genotyp-fenotyp. U pacjentów z MPS, wczesna interwencja za pomocą ERT, która może zachować lub przywrócić zaburzone funkcje, poprzez usunięcie nadmiaru materiału

magazynowane w lizosomach jest bardzo ważna. Potencjał terapeutyczny ERT jest możliwy tylko wtedy, gdy diagnoza zostanie przeprowadzona dokładnie. Diagnoza genetyczna pozwala na szybkie rozpoczęcie leczenia, a także na poradnictwo genetyczne. Stan fizyczny naszego pacjenta w dniu hospitalizacji był bardzo krytyczny. Pacjent leżący, pozbawiony samodzielnego funkcjonowania, z deformacją kończyn i początkiem zaburzeń intelektualnych (co charakterystyczne zwłaszcza dla MPS VI). Po przeprowadzeniu badań genetycznych i wdrożeniu, właściwego dla MPS VI leczenia, wrócił do samodzielnego funkcjonowania, rozpoczął chodzenie i edukację przedszkolną, ze zdrowymi rówieśnikami. Diagnostyka molekularna przyczyniła się do opóźnieniem progresji choroby (w tym przypadku nawet do odwróceniem klinicznej manifestacji choroby). Co bardzo istotne, a co zaważyło na pierwotnie, błędnie postawionej diagnozie, w kierunku MPS I, która jest jedną z częściej występujących w Polsce postaci MPS, MPS VI z uwagi na brak występowania w populacji Polskiej, została pominięta na etapie diagnostyki. Skonstruowanie dokładnego rodowodu, IV-pokoleniowej rodziny, ujawniło pochodzenie przodków badanego probanta i innych uczestników badania z ziem pozostających w zaborze rosyjskim, który obejmował największą część ziem I Rzeczypospolitej w jej granicach przedrozbiorowych, co tłumaczyło pojawienie się przypadku i nosicielstwa MPS VI.

#### **4.6. Publikacja numer 6**

A novel TAZ gene mutation and mosaicism in a Polish family with Barth syndrome; Zapała

Barbara, Płatek Teresa, Wybrańska Iwona; Ann Hum Genet. 2015 May;79(3):218-24

Autor korespondencyjny: Barbara Zapała

**IF: 1.889; MEiN: 25**

W publikacji tej opisano nowy wariant genetyczny oraz zupełnie nowy, nie opisywany wcześniej mechanizm dziedziczenia mozaicyzmu w zakresie wykrytego wariantu w genie *TAZ*. Badanie dotyczy Zespołu Bartha (BTHS), który jest rzadkim zaburzeniem metabolizmu lipidów, dziedziczonym recesywnie, w sposób sprzężony z chromosomem X. Klinicznie, zwykle charakteryzuje się kardiomiopatią przerostową lub rozstrzeniową, miopatią szkieletową, przewlekłą lub cykliczną neutropenią, kwasicą 3-metyloglutakonową, a także opóźnieniem wzrostu i dysfunkcją łańcucha oddechowego. Częstość występowania BTHS szacuje się na 1 na 300 000–400 000, w Stanach Zjednoczonych i 1 na 140 000, w Wielkiej Brytanii, chociaż dokładniejsza częstość występowania nie jest znana i wydaje się, że jest to schorzenie niedodiagnozowane, co udało się udowodnić dzięki przeprowadzonemu przez nas badaniu.

Badanie miało na celu potwierdzenie diagnozy klinicznej, opierającej się na badaniu kwasu 3-metyloglutakonowego (3-MGCA) w moczu, badaniu stosunku monolizokardiolipiny do kardiolipiny (MLCL:L4-CL) i sekwencjonowaniu genu tafazyny (*TAZ*, wcześniej określanego jako *G4.5*). BTHS jest bowiem spowodowane różnymi wariantami w genie *TAZ*, zlokalizowanym w regionie Xq28. Do badania włączono 13 osób IV-pokoleniowej rodziny, w której występowało obciążenie BTHS. Do badania wykorzystano próbki krwi oraz wymazy z jamy ustnej. Badanie prowadzono, z wykorzystaniem sekwencjonowania pierwszej generacji. Pierwotnie wykryto nowy wariant (c.83T>A, p.Val28Glu) w genie *TAZ*, który nie był wcześniej opisywany. Wykonano analizy zidentyfikowanego wariantu, oceniono patogenność oraz dokonano rejestracji w światowej bazie danych wariantów genetycznych dla BTHS (z ang. *TAZ Gene Mutation and Variation Database*). Z uwagi na zaobserwowany, w trakcie badania, brak zachowanego sposobu dziedziczenia, wśród członków wielopokoleniowej rodziny, zdecydowano badania poszerzyć na materiale genetycznym pochodzącym z komórek z innego listka zarodkowego, co znalazło uzasadnienie w otrzymanych wynikach. Przeprowadzono analizy genetyczne dwóch różnych tkanek somatycznych (limfocytów pochodzących z mezodermy i komórek nabłonka policzka pochodzące z ektodermy).

Wyniki przeprowadzonego i opisanego w pracy badania wniosły bardzo ważny aspekt do diagnostyki, nie tylko BTHS, ale także innych chorób, uznawanych jako rzadko występujące, które w gruncie rzeczy mogą okazać się nie w pełni zdiagnozowane.

Szczegółowy wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych stanowi odrębny załącznik do Wniosku o wszczęcie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Dr n. med. Barbara Zapala



dr n. med. Barbara Zapala  
Adiunkt

Kraków, dnia 12.03.2024 roku