

dr n. biol. Ewa Stępień

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej
ul. Kopernika 15A
e-mail: estepien@cm-uj.krakow.pl
kierownik Katedry:
prof. dr hab. med. Aldona Dembińska-Kieć

AUTOREFERAT

do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

**Kraków
Październik 2012**

Spis treści

<u>1. ŻYCIORYS I PRZEBIEG KARIERY ZAWODOWEJ</u>	<u>3</u>
1.1. ŻYCIORYS	3
1.2. DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE.....	6
1.3. STOPNIE NAUKOWE	6
1.4. STAŻE W ZAGRANICZNYCH LUB KRAJOWYCH OŚRODKACH NAUKOWYCH LUB AKADEMICKICH.....	6
1.5. WAŻNIEJSZE KURSY I SZKOLENIA	6
<u>2. GŁÓWNE KIERUNKI PROWADZONYCH BADAŃ</u>	<u>7</u>
2.1. KIERUNKI BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA (LATA 1994-1999)	7
2.2 KIERUNKI BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA	8
2.2.1. DYSFUNKCJA ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO WYWOŁANĄ STRESEM NIEDOTLENIENIA I STRESEM ZWIĄZANYM Z ZAKAŻENIAMI.....	8
2.2.2. TRADYCYJNE I NOWE MARKERY CHOROÓB NACZYŃ: OD TROPONIN SERCOWYCH PO MIKROCZĄSTKI I BIAŁKA REGULUJĄCE PRZEBUDOWĘ KOŚCI: OSTEOPONTYNĘ I OSTEOPROTEGERYNĘ..	9
2.2.3. CZYNNIKI GENETYCZNE I ŚRODOWISKOWE WPŁYWAJĄCE NA STRUKTURĘ I FUNKCJĘ SKRZEPY FIBRYNOWEGO.....	11
<u>3. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO.....</u>	<u>14</u>
<u>„ZASTOSOWANIE NOWYCH MARKERÓW W SYNERGISTYCZNEJ DIAGNOSTYCE CHOROÓB UKŁADU KRAŻENIA”</u>	<u>14</u>
<u>4. SPIS ZAŁĄCZNIKÓW DO NINIEJSZEGO AUTOREFERATU.....</u>	<u>18</u>
<u>5. CYTOWANE PRACE NAUKOWE I PUBLIKACJE Z DOROBKU HABILITANTA.....</u>	<u>19</u>



1. Życiorys i przebieg kariery zawodowej

1.1. Życiorys

Urodziłam się i wychowałam w Koszalinie. Tam też uczęszczałam liceum ogólnokształcącego (*Zespół Szkół Ogólnokształcących nr 1 im. Stanisława Dubois*) do klasy o profilu biologiczno-chemicznym. Liceum to szczyty się wysokim poziomem nauczania i renomą, od lat jest odnotowywane w pierwszej 10-15 szkół średnich w Polsce. Po zdaniu matury w roku 1987 zostałam przyjęta na studia magisterskie o kierunku biologia, na *Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego* w Krakowie. Po pierwszym roku studiów wybrałam specjalność „biologia molekularna”, która w tym czasie była elitarnym kierunkiem studiów, przyjmowano 8-12 studentów rocznie a kryterium przyjęcia była wysoka średnia ocen. Zajęcia były prowadzone głównie w *Instytucie Biologii Molekularnej* przez wybitnych profesorów, m.in. przez *prof. Aleksandra Koja*, *prof. Stanisława Łukiewicza*, *prof. Zygmunta Wasylewskiego*, *prof. Włodzimierza Korohodę*, oraz ówczesnych adiunktów, obecnie profesorów: *prof. Martę Pasenkiwicz-Gierulę*, *prof. Halinę Gabryś*, *prof. Wojciecha Francisza*, *prof. Andrzeja Kozika*, *prof. Adama Dubina*. Później Instytut ten przekształcił się w *Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii*.

Okres studiów ukształtował moje zainteresowania i ugruntował wiedzę, także w zakresie nauk ścisłych, ale przede wszystkim sprawił, że nauka stała się moją pasją. W Instytucie obroniłam pracę magisterską pod kierunkiem *prof. Włodzimierza Korohody* w *Zakładzie Biologii Komórki* w roku 1992. Głównym osiągnięciem mojej pracy magisterskiej było opracowanie techniki izolacji i hodowli *in vitro* komórek nerwowych z mózgu, które w obecnym czasie były uważane za krańcowo zróżnicowane, pozbawione zdolności regeneracji. Opracowana przeze mnie technika pozwoliła na poprowadzenie dalszych badań nad mechanizmami kierującymi wzrostem komórek nerwowych na powierzchniach niejednorodnej pod względem składu i rzeźby, co było tematem mojej pracy doktorskiej, obronionej pod kierunkiem *prof. Włodzimierza Korohody* w roku 1999.

Mimo, że moje ówczesne zainteresowania oscylowały głównie wokół biologii komórki nerwowej, moja wiedza, a szczególnie silne podstawy metodyczne i aparat analityczny, pozwoliły mi na przekwalifikowanie się i podjęcie pracy w Laboratorium Klinicznym w *Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II* w roku 1997. Tam też wyznaczono mi zadanie utworzenia i zorganizowania pracowni biologii molekularnej, z czego się z powodzeniem wywiązałam, uruchamiając formalnie *Samodzielną Pracownią Biologii Molekularnej i Badań Naukowych* w roku 2002 (kierownik w latach 2002-2011).

Praca w laboratorium klinicznym w latach 1997-2011 była dużym wyzwaniem ze względu na specyfikę, jaką było wykonywanie badań diagnostycznych i wiążąca się z tym odpowiedzialność. To zmobilizowało mnie do uzyskania 2 specjalizacji laboratoryjnych (mikrobiologia w roku 2003 i laboratoryjna genetyka medyczna w roku 2011) i rozpoczęcia kolejnej z diagnostyki laboratoryjnej, ale też było inspiracją do prowadzenia badań naukowych. Stworzyło się wiele możliwości współpracy z klinicystami, głównie kardiochirurgami (z zespołu *prof. Antoniego Działkowiaka* i *prof. Jerzego Sadowskiego*), kardiologami (z zespołów *prof. Wiesławy Tracz*, *prof. Piotra Podolca* i *prof. Krzysztofa Żmudki*) i radiologami (z zespołu *dr hab. Mieczysława Pasowicza*). Moja działalność naukowa dotyczy głównie poszukiwania nowych markerów w kardiologii, ale także sięga zagadnień zaburzeń krzepnięcia towarzyszących chorobom naczyniowym (współpraca z *prof. Anettą Undas*).

W okresie od 1997 do 2011 opublikowałam, jako pierwszy autor: 8 prac doświadczalnych i 8 prac poglądowych (w tym 3 rozdziały do podręcznika); jako współautor: 27 prac doświadczalnych, 4 poglądowne, 7 opisów przypadków, 5 listów do redakcji oraz 2 prace z badań wieloośrodkowych, gdzie jestem wymieniona w dodatku (*appendix*) jako uczestnik badania wieloośrodkowego. W roku 2012 opublikowałam, jako pierwszy autor 2 prace doświadczalne, 2 listy do redakcji i 2 prace poglądowe oraz 1 pracę doświadczalną jako współautor. Łączny *impact factor* moich publikacji wynosi:

Jako autor i współautor brałam udział w konferencjach, łącznie zaprezentowałam 53 doniesienia na konferencjach międzynarodowych i 60 doniesień na konferencjach krajowych.

W latach 2001-2011 odbyłam 3 naukowe staże zagraniczne: dwa razy w *Imperial College of Science, Technology and Medicine* w Londynie w Wielkiej Brytanii (6 uczelnia na świecie w rankingu *QS Top Universities*) oraz w *Hôpital A. Vésale, Unité des maladies hémorragiques* w Charleroi w Belgii. Staże te służyły głównie podniesieniu moich kwalifikacji zawodowych i poznaniu nowych metod, które zaaplikowałam w swojej pracy naukowej: hodowle komórek śródbłonna i mezenchymalnych komórek macierzystych. Także poznaniu organizacji pracy w laboratorium o profilu hematologicznym. Ponadto byłam na krótkim stażu w *Katedrze i Zakładzie Genetyki Klinicznej Akademii Medycznej* we Wrocławiu.

Podczas mojej pracy w Szpitalu aktywnie uczestniczyłam w kształceniu studentów, byłam promotorem 6 prac magisterskich z zakresu biotechnologii, we współpracy z *Uniwersytetem Rolniczym* w Krakowie i *Uniwersytetem Jagiellońskim*. Wyniki każdej z tych prac zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Ponadto wspierałam pracę studentów medycyny ze *Studenckiego Koła Naukowego Kardiochirurgów*, co zaowocowało publikacjami na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Aktywnie uczestniczyłam w wykonywaniu badań do prac doktorskich wykonywanych w Szpitalu w latach 2006-2011 oraz byłam opiekunem praktyk studenckich dla ponad 30 studentów kierunku biotechnologia.

Od roku 2011 jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Biochemii Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie planuję realizować dalsze plany naukowe i dzielić się wiedzą i doświadczeniem ze studentami Wydziału Lekarskiego tej uczelni.

Byłam kierownikiem dwóch projektów badawczych finansowanych ze środków Komitetu badań naukowych (2001-2002) i *MNiSW* (projekt statutowy 2009). Ponadto byłam i jestem wykonawcą lub głównym wykonawcą 12 projektów finansowanych ze środków *MNiSzW* i *KBN* od 1998 roku do teraz oraz 1 projektu finansowanego ze Środków Urzędu Marszałkowskiego Województwa Małopolskiego. W latach (2002-2008) byłam koordynatorem programu: „*Wczesna prewencja i profilaktyka nowotworów sutka i jajnika z zastosowaniem diagnostyki molekularnej*” finansowanego ze środków Urzędu Marszałkowskiego Województwa Małopolskiego, w ramach którego ponad 500 kobiet poddano badaniom. Jestem też współtwórcą opracowania INTERDYSCYPLINARNY OŚRODEK INNOWACYJNYCH TECHNIK OBRAZOWANIA BIOMEDYCZNEGO (IOITOB) w ramach działania 2.2 Wsparcie tworzenia wspólnej infrastruktury badawczej jednostek naukowych, Program Operacyjny dla *Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II*. Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, który obecnie jest realizowany.

Moja praca naukowa i kliniczna została nagrodzona Nagrodą Rektora Uniwersytetu Jagiellońskiego za pracę naukową w roku 2009 oraz przez dyrekcję *Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II* medalem 90-lecia. Ponadto otrzymałam wyróżnienie w konkursie na najlepszą pracę doktorską przygotowaną z zastosowaniem narzędzi statystyki organizowanym przez StatSoft® Polska w roku

1999 oraz zdobyłam II miejsce w konkursie organizowanym przez *Ministerstwo Zdrowia* i *Agencję Oceny Technologii Medycznych* „Dowody naukowe? Tak, korzystam, Edycja 2007”.

Jestem członkiem 3 towarzystw międzynarodowych: *European Society for Clinical Investigation* (od 2008), *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (od 2006) oraz *European Society of Cardiology* (od 1998), przy czym, w tym ostatnim od 2 lat należę do grup roboczych: *ESC Working Group on Thrombosis* i *ESC Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology*. Jestem też członkiem *Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego*, *Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej* i *Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych* oraz sekretarzem *Zarządu Kolegium Medycyny Laboratoryjnej*.

Ponadto jestem recenzentem w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, takich jak prestiżowe: *Clinical Chemistry*, *PlosOne*, *Journal of Thrombosis Haemostasis* czy *Expert Opinion on Therapeutic Targets* oraz *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *Molecular Biology Reports*. Także polskich czasopism: *Kardiologia Polska* i *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. Jestem też członkiem rady redakcyjnej czasopisma on-line *Cardiogenetics* (red. naczelny prof. Giuseppe Limongelli).

Biorę aktywny udział w pracach na rzecz regionu Województwa Małopolskiego i innych. Jestem ekspertem w *Małopolskim Centrum Przedsiębiorczości* (od 2010 roku) w dwóch projektach osi priorytetowej „Gospodarka regionalnej szansy”, asesorem dla *Lubuskiego Urzędu Marszałkowskiego* w ramach Indykatywnego Planu Inwestycyjnego oraz dla *Urząd Marszałkowski Województwa Dolnośląskiego*.

1.2. Doświadczenie zawodowe

- 2011-obecnie** Katedra Biochemii Klinicznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, **adiunkt**
- 2008-2011** Zakład Kardiologii, Anestezjologii i Kardiologii Eksperymentalnej, Instytut kardiologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, **asystent**
- 2002-2011** Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej I Badań Naukowych, Krakowski szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, **kierownik laboratorium**
- 1997-2002** Laboratorium Kliniczne, Krakowski szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków **asystent**
- 1996-1997** Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii I Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, **asystent**

1.3. Stopnie Naukowe

- 2011** **Specjalizacja z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej**, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, dyplom wydany przez Studium Kształcenia Podyplomowego Wydziału Farmaceutycznego CMUJ, nr WFaSK-525/9/LGM/2011
- 2003** **Specjalizacja z mikrobiologii I st**, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, wydany przez Małopolski Urząd Wojewódzki w Krakowie, nr 3452/27/2003
- 1999** **doktorat z biologii** Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii I Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, "Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost komórek nerwowych *in vitro*" promotor Prof. Włodzimierz Korohoda
- 1992** **praca magisterska z biologii, specjalność biologia molekularna**. Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii I Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, "Badania nad metodami izolacji i hodowli komórek nerwowych" promotor: Prof. Włodzimierz Korohoda

1.4. Staże w zagranicznych lub krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

- 16/22-01-2011** Staż naukowy, *CHU de Charleroi, Hôpital A. Vésale*, Unité des maladies hémorragiques, Charleroi, Belgia, opiekun: dr Philippe Cauchie; finansowane przez
- 27/31-07-2009** Staż naukowy z cytogenetyki klinicznej, Katedra i Zakład Genetyki Klinicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu, opiekun: dr Ryszard Ślęzak;
- 09/23-11-2004** Staż naukowy, *Imperial College of Science, Technology and Medicine*, Londyn, Weston Laboratory, Anglia, opiekun: dr Husayin Mehmed; finansowane przez STEC
- 10/24-11-2001** Staż naukowy, *Imperial College of Science, Technology and Medicine*, Londyn, Anglia, opiekun: prof. Mustafa Djamgoz; na zaproszenie.

1.5. Ważniejsze kursy i szkolenia

- 01-2010-04-2011** **Menadżer Projektów Badawczych** szkolenie organizowane przez Wyższą Szkołę Finansów i Zarządzania w Warszawie
- 18/20-02-2011** Metodyka Zarządzania Projektami PRINCE 2 Foundation Centrum Rozwiązań Menadżerskich SA; **PRINCE 2 Foundation Examination** (20-02-2011)
- 2009-2010** Kurs „**Zarządzanie własnością intelektualną** podstawą funkcjonowania sektora life science w Polsce” Centrum Transferu Technologii Medycznych, Park Technologiczny Sp. Z o.o. w Krakowie;
- 16-12-2005** Kurs **GCP - Good Clinical Practice** dla badaczy; Monipol Sp. z o.o.
- 24/27-01-2000** Warsztaty **EBM - Ewaluacja Badań Medycznych**; Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia.

2. Główne kierunki prowadzonych badań

Prowadzoną przeze mnie pracą naukową można podzielić na dwie chronologicznie i tematycznie rozłączne części: przed uzyskaniem doktoratu (lata 1994-1999) i po uzyskaniu doktoratu do chwili obecnej (2000-2012), przy czym okres moich badań po uzyskaniu stopnia doktora charakteryzował się prowadzeniem równoległe kilku tematów badawczych związanych z szeroko pojętą biologią układu krążenia.

Pierwszy okres dotyczył moich badań w Zakładzie Biologii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego nad biologią komórki nerwowej pod kierunkiem *prof. Włodzimierza Korohody*. Drugi okres pracy naukowej był i jest związany z działalnością diagnostyczną w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II. W tym czasie współpracowałam głównie z klinicystami, a moją działalność naukową można podzielić na trzy nurty badań prowadzonych wielowątkowo:

- Badania nad dysfunkcją śródbłonna naczyń wywołaną stresem niedotlenienia i związanym z zakażeniami (*Chlamydia pneumoniae*)
- Poszukiwanie nowych markerów chorób naczyń, głównie miażdżycy, ze szczególnym uwzględnieniem komunikacji międzykomórkowej (mikrocząstki) i mediatorów mających charakter prozapalny lub protekcyjny na komórki śródbłonna, w tym osteopontyny i osteoprotegeryny.
- Badanie wpływu czynników genetycznych i środowiskowych na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego osób bezobjawowych i z różnym stopniem zaawansowania miażdżycy naczyń.

Każdy z tych okresów mojej pracy zostanie szczegółowo omówiony w poszczególnych podpunktach referatu.

2.1. Kierunki badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora (lata 1994-1999)

W okresie tym szczególną uwagę poświęcałam na opracowanie metodologii pozyskiwania komórek nerwowych ze zwojów międzykręgowych i embrionalnych komórek nerwowych z mózgu kurcząt. W latach 90-tych XX wieku panował jeszcze pogląd, że komórki nerwowe, jako ostatecznie zróżnicowane i wyspecjalizowane posiadają niewielki (jeśli w ogóle) potencjał regeneracyjny. Badania komórek nerwowych *in vitro* (hodowle komórkowe) prowadzono w obecności cytotatytatyków, które miały zapobiec namnażaniu niepożądanych doświadczeń komórek astrogleju (w przypadku komórek pozyskiwanych z mózgu) lub fibroblastów (w przypadku komórek pozyskiwanych ze zwojów międzykręgowych). Moja nowatorska metoda polegała na inkubacji i wielodniowej hodowli komórek nerwowych w pożywce wzbogaconej o nerwowy czynnik wzrostu (NGF) i surowicę płodową cielęcą, ale bez inhibitorów podziałów komórkowych. Pozwoliło to badać zachowanie komórek nerwowych w ko-kulturach, a także obserwować ich migrację, tworzenie agregatów oraz ukierunkowany wzrost stożków wzrostu wypustek nerwowych. Głównym osiągnięciem tego okresu jest wykazanie, że **rzeźba podłoża** o neutralnym składzie chemicznym (szkła) **oddziałuje na wydłużające się stożki wzrostu neuronów**, a krytycznym parametrem jest głębokość rys (100 nm). Wykazałam kluczową rolę **fibronektyny** jako **białka naprowadzającego** stożki wzrostu komórek ze zwojów międzykręgowych i embrionalne komórki nerwowe migrujące szlakami wytyczonymi przez inne komórki (fibroblasty) [1]. Jako pierwsza zaobserwowałam nietypowe **migracyjne zachowanie zróżnicowanych komórek nerwowych** (posiadających neurofilamenty). Ponadto wykazałam kluczową rolę **filopodiów** (w tym cytoszkieletu aktynowego) w procesie naprowadzania stożków

wzrostu. Do swoich badań zastosowałam oryginalny model matematyczny [2], który został wyróżniony w konkursie na najlepszą pracę doktorską wykonana przy użyciu narzędzi *Statistica* w roku 1999. Efektem moich badań była praca doktorska [3], jedna publikacja doświadczalna [4] (liczba cytowań: 22) oraz dwie publikacje przeglądowe [5, 6] i dwa doniesienia zajazdowe [1,2].

2.2 Kierunki badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

2.2.1. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego wywołaną stresem niedotlenienia i stresem związanym z zakażeniami

W okresie 1999-2005, jako **współwykonawca projektu**, wraz z zespołem *prof. Wiesławy Tracz* i *dr hab. Piotrem Pieniążkiem* prowadziłam badania nad związkiem między infekcją ***Chamydia pneumoniae*** a progresją miażdżycy i częstością występowania ostrych incydentów wieńcowych [7]. Moim głównym osiągnięciem w tym projekcie było **opracowanie i kalibracja metody reakcji łańcuchowej polimerazy PCR** do oznaczania *Ch. pneumoniae* w krwi chorych i tkance pobranej podczas zabiegów plastyki wieńcowej [8]. Opracowałam również algorytm diagnostyczny do oceny serokonwersji u badanych chorych. Ponadto wykazałam obecność ciałek retikularnych *Ch. pneumoniae* w blaszce miażdżycowej u chorych z zaawansowaną chorobą wieńcową metodą immunofluorescencyjną z zastosowaniem **mikroskopu konfokalnego** [9]. Wykazałam, że tylko n=2 przebadanych przeze mnie chorych zarówno w grupie ze stabilną chorobą niedokrwienną serca (n=234) i w grupie z ostrymi incydentami wieńcowymi (n=211) było dodatnich w klasie przeciwciał IgM, natomiast odsetek dodatnich w klasie IgA był n=45,1 i n=57,6, odpowiednio [10]. To pokazuje, że u chorych z zaawansowaną miażdżycą naczyń mieli kontakt z *Ch. pneumoniae*, a przebyte infekcje mają charakter przewlekły. Dla porównania w grupie zdrowych odsetek dodatnich w klasie IgA i IgG wynosił odpowiednio 29,5% i 21% [7]. Dalsze badania obserwacyjne prowadzone we współpracy z *prof. Tadeuszem Przewłockim* i *dr hab. Piotrem Pieniążkiem*, udowodniły, że podwyższone miano przeciwciał wiąże się wystąpieniem niekorzystnych zdarzeń sercowych (MACE) [11] oraz z gorszą przeżywalnością chorych po przeszczepieniu serca [12].

W latach 1999-2002 kolejnym tematem badawczym związanym z **dysfunkcją i mechanizmami protekcyjnymi** komórek śródbłonna ludzkiego, były badania prowadzone w ramach mojego projektu (grant KBN dla „młodych doktorów” 4P05C009921) oraz projektu kierowanego przez *prof. Jerzego Sadowskiego* (4P05C00617), którego byłam współwykonawcą. Główną osią prowadzonych przeze mnie badań była **rola białka szoku cieplnego 72 (HSP72)** w odpowiedzi komórek śródbłonna na **niedotlenienie, hipertermię** oraz leki o działaniu przeciwzapalnym i znieczulającym: **kwas acetylosalicylowy** i **propofol**. W swojej pracy wykazałam, że komórki śródbłonna są odporne na niedotlenienie w warunkach *in vitro*, a efekt ten wiąże się z ekspresją białka HSP72 [13]. Ponadto kwas salicylowy i propofol podtrzymują ten efekt hartowania przez zależną od dawki indukcję HSP72 [14,15,16]. Ekspresji białka szoku cieplnego towarzyszy też charakterystyczna zmiana morfologii komórki i **przebudowa cytoszkieletu aktynowego** [14].

Badania nad dysfunkcją śródbłonna prowadziłam następnie w latach 2007-2010, w ramach prac magisterskich, których byłam promotorem [17,18]. Wykazałam w nich, że **łagodna hyperhomocysteinemia** pobudza komórki śródbłonna w warunkach *in vitro* do **uwalniania mikrocząstek**, jednak tylko ok.

25% uwalnianych mikrocząstek ma eksponowaną na powierzchni fosfatydyloserynę (charakterystyczną dla komórek apoptotycznych, pozostałe mikrocząstki mają nie zmienioną strukturę błony komórkowej [19]. Te obserwacje skłoniły mnie do dalszych badań nad rolą mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w komunikacji międzykomórkowej [20].

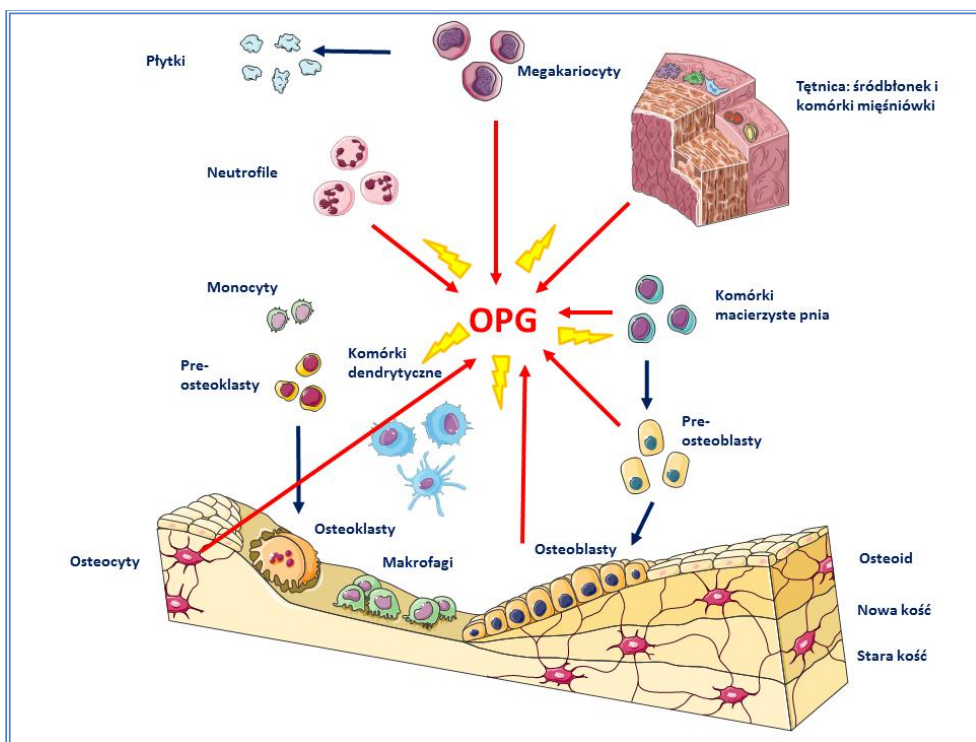
Udowodnione przeze mnie *in vitro* zmiany w morfologii komórki i organizacji cytoszkieletu aktywnego towarzyszą dysfunkcji śródbłonka. Proces ten w warunkach *in vivo* może mieć kluczowe znaczenia dla prawidłowej funkcji naczyń. W dalszych badaniach, prowadzonych w latach 2009-2012 pokazałam, że efekt ten jest również obserwowany po ekspozycji komórek śródbłonka na **nanocząstki ZnO**. Badania te były prowadzone pod moim kierunkiem, w ramach kolejnych prac magisterskich [21,22]. W wyniku tych badań wykazałam, że komórki śródbłonka, mimo wyraźnej zmienionej morfologii, reorganizacji cytoszkieletu **nie ulegają apoptozie**, a uszkodzenia błony komórkowej, powodujące wyciek dehydrogenazy mleczanowej z komórek, i obrazowane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), mają charakter odwracalny. Komórki przyjmują charakterystyczny **migracyjny fenotyp**, co sugeruje, że **utrata integralności** warstwy śródbłonka wiąże się prawdopodobnie z ich pobudzeniem, a nie z dysfunkcją. Wyniki tych badań zostały właśnie przyjęte do druku [23], a badania pragnę kontynuować w ramach projektu zgłoszonego do *Narodowego Centrum Nauki* (konkurs Opus), we współpracy z *prof. Witoldem Łojkowskim* (Instytut Wysokich Ciśnień) w Warszawie.

2.2.2. Tradycyjne i nowe markery chorób naczyń: od troponin sercowych po mikrocząstki i białka regulujące przebudowę kości: osteopontynę i osteoprotegerynę

Moje zainteresowania markerami chorób układu sercowo-naczyniowego sięgają najwcześniejszego okresu pracy w *Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II*. Razem z *prof. Januszem Andresem* w latach 1998- 2001 prowadziłam badania nad projektem dotyczącym przydatności nowych markerów uszkodzenia miokardium (**troponin sercowych** w ocenie zawału okołoperacyjnego u chorych poddawanych zabiegom pomostowania aortalno-wieńcowego - CABG). W wyniku prowadzonych badań porównałam wartości tych markerów u chorych z różnym stopniem zaawansowania choroby, wyznaczyłam wartości odcięcia dla poszczególnych markerów, w różnych okresach okołoperacyjnych i oceniłam ich przydatność diagnostyczną [24,25,26,27]. Później badania nad **przydatnością troponiny I i IL-6** w rozpoznawaniu ryzyka i stopnia uszkodzenia okołoperacyjnego były prowadzone w ramach projektu kierowanego przez *dr Marię Śnieżek-Maciejewską* z Kliniki Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii Collegium Medicum UJ, w latach 1999-2003 [28,29,30]. Jako kierownik Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i Badań Naukowych, i osoba odpowiedzialna za wykonywanie oznaczeń brałam udział w międzyośrodkowym badaniu MERIT (Multicentre Evaluation of Routine Immunoassay of Troponin T study) [31]. Ponadto, z zespołem *prof. Wiesławy Tracz* (*dr Piotr Musiałek*) z Kliniki Chorób Serca i Naczyń Collegium Medicum UJ, byłam odpowiedzialna za wykonanie oznaczeń laboratoryjnych: markerów zapalenia (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18), przebudowy naczyń (metaloproteiny: MMP-8, MMP-9, MMP-10), metabolizmu tłuszczowego (Lp(a)), stresu niedotlenienia (MPO, Lp-PLA₂) i innych, w powiązaniu z obrazowaniem blaszki miażdżycowej, w ramach projektu finansowanego przez MNSzW.

Moim nowatorskim wkładem w rozwój diagnostyki laboratoryjnej chorób układu krążenia jest badanie **roli markerów przebudowy kości w ocenie ryzyka zwapnienia naczyń** (ang. *coronary artery*

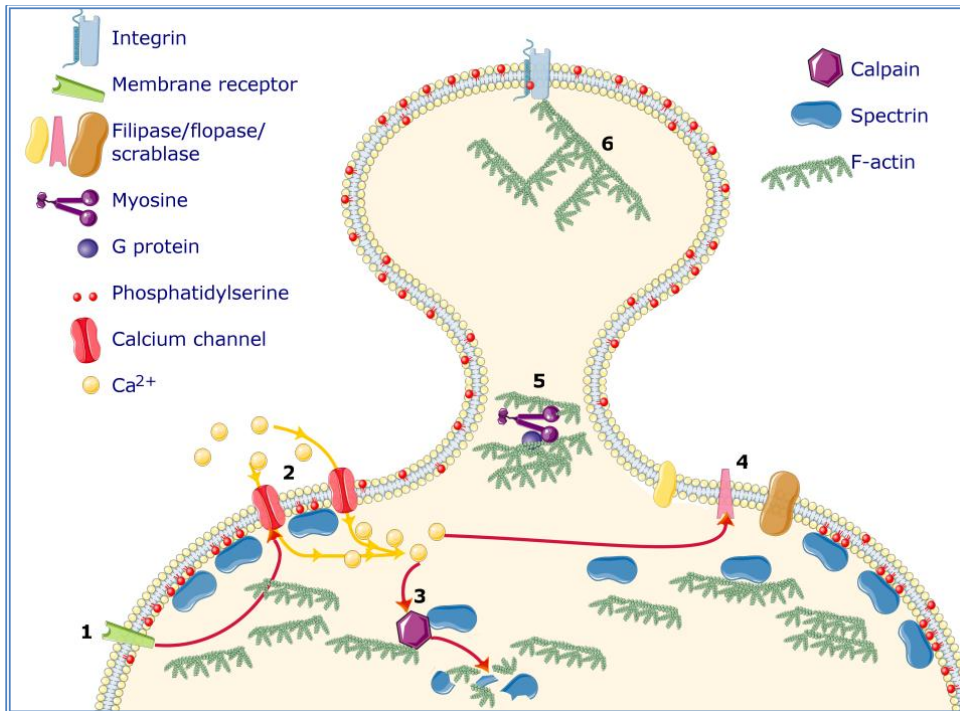
calcification - CAC) u osób bezobjawowych. Badania te prowadziłam w ramach projektu CRABIS finansowanego ze Środków Urzędu Marszałkowskiego Województwa Małopolskiego w latach 2002-2008. Efektem tych badań są publikacje doświadczalne i kliniczne [32,33,34] oraz przeglądowe [35] i doniesienia zjazdowe [36,37,38,39,40]. Moim nowatorskim osiągnięciem było wskazanie, że u osób z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się podwyższone stężenia **osteopontyny (OPN)** i **osteoprotegeryny (OPG)**, i że obecność podwyższonych wartości OPG u osób bezobjawowych, zwiększa ryzyko CAC [32,33]. Tym samym, jako pierwsza w piśmiennictwie polskim, i jako jedna z nielicznych naukowców w piśmiennictwie międzynarodowym, wskazałam na ważną rolę osteoprotegeryny w patofizjologii chorób naczyń [35]. Osteoprotegeryna (OPG) jest głównym regulatorem przebudowy kości w warunkach fizjologicznych i stanach chorobowych. Jej aktywność jest regulowana przez układ aktywatora receptora dla czynnika jądrowego (NF)- κ B, i jego liganda (RANKL). RANKL jest głównym aktywatorem różnicowania i osteoklastogenezy podczas resorpcji kości, a OPG jest receptorem-atrapą, który hamuje różnicowanie osteoklastów przez blokowanie oddziaływań między ligandem RANKL a jego receptorem (RANK). OPG jest produkowana przez komórki macierzy, komórki hematopoetyczne (megakariocyty) i komórki śródbłonna (Rys.1.).



Rysunek 1. Schemat prezentujący centralną rolę osteoprotegeryny (OPG) w biologii kości i naczyń. Strzałki czerwone symbolizują komórki produkujące i uwalniające OPG, czarne symbolizują kierunek różnicowania komórek pod wpływem OPG, żółte błyskawice siłę oddziaływania OPG na pozostałe komórki i tkanki. Na podstawie Stępień Kardiochir Torakochir Polska 2012, zmienione [35].

Ważnym kierunkiem moich badań, który zapoczątkowałam w roku 2009 jako promotor prac magisterskich [17,18] są badania nad **wykorzystaniem mikrocząstek do diagnostyki chorób układu krążenia**. **Mikrocząstki (MP)** są to struktury błonowe (pęcherzyki) o średnicy od 100 nm do 500 nm, uwalniane przez komórki krwi (płytki, limfocyty T i B, makrofagi) oraz komórki śródbłonna naczyniowego. W odróżnieniu od egzosomów (których średnica waha się od 40nm do 100nm) uwalnianych na skutek egzocytozy, MP są wytwarzane w odpowiedzi na czynniki stresogenne, takie jak niedotlenienie, uraz me-

chaniczny lub w wyniku reakcji zapalnej. Utrata asymetrii błony komórkowej towarzysząca uwalnianiu MP ma też związek z aktywacją szlaku apoptotycznego w komórce, jednak w przypadku komórek śródbłonna niemal zawsze jest ona wyrazem dysfunkcji lub szeroko pojętej aktywacji (Rys 2.)



Rysunek 2. Uwalnianie mikrocząstek (MP) przez komórki. (1) Aktywacja systemu przekazywania wewnątrzkomórkowego, co powoduje wyrzut jonów Ca^{2+} z przestrzeni wewnątrzkomórkowych, aktywację enzymu kalpajny powodującej uwalnianie białek cytoszkieletu: aktyny i spektryny (3). Jednocześnie rozprężenie systemu „flip-flop” utrzymującego asymetrię błony komórkowej, przez co fosfatydyloseryna przemieszcza się na zewnątrz błony komórkowej i staje się niedostępna dla spektryny (4). Aktywacja układu aktyno-miozynowego powoduje połączenie się krawędzi rosnącego pęcherzyka (5), a integryny eksponowane na jego powierzchni stanowią specyficzne markery do identyfikacji pochodzenia MP; na podstawie Stępień EOTT 2012, zmienione [41].

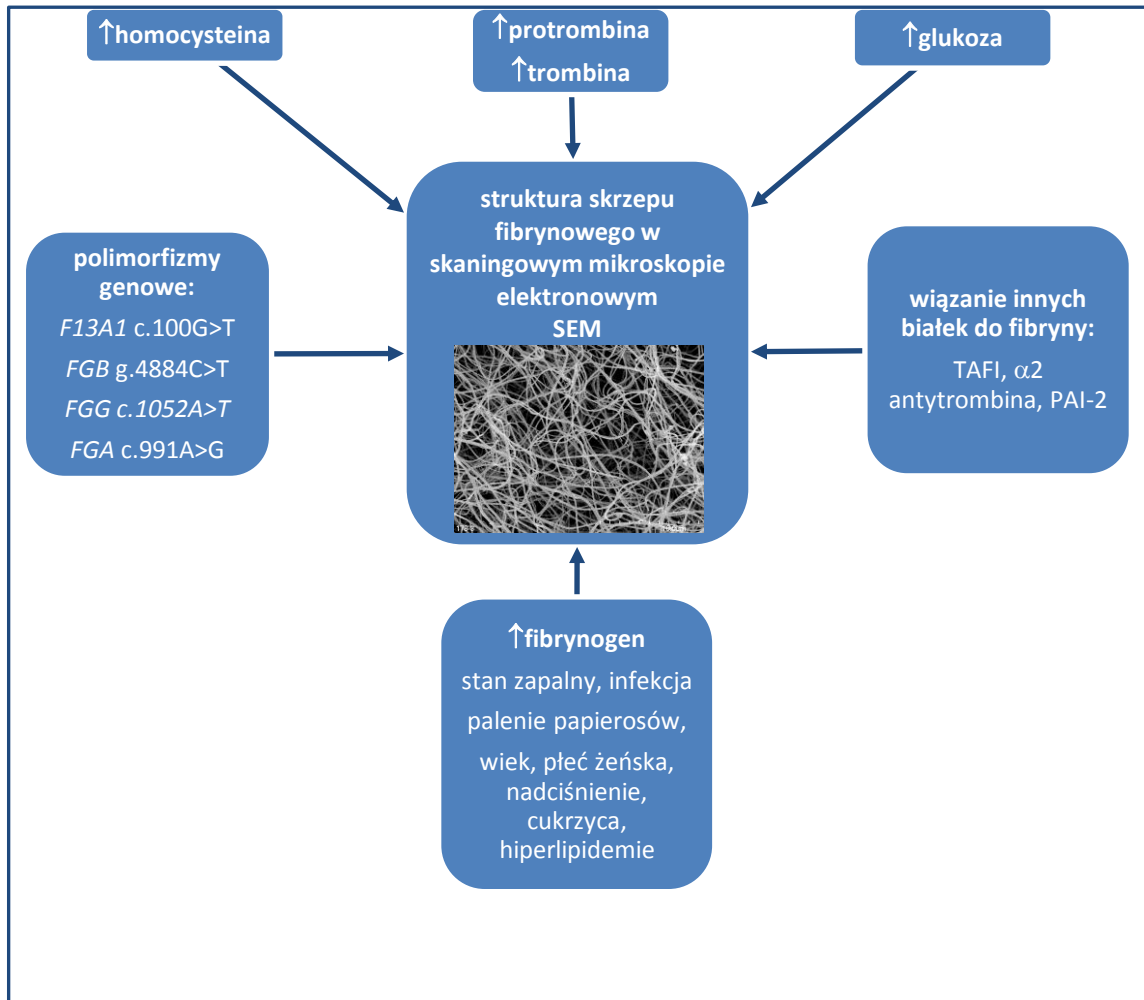
Są liczne doniesienia wskazujące na udział MP w procesach regeneracyjnych, np. w rewaskularyzacji. MP działają jak „transmitery” przenoszące aktywne biologicznie endogenne związki substancje, które biorą udział w procesie adhezji i chemotaksji oraz **angiogenezy** [42,43]. W chorobach układu sercowo-naczyniowego, takie jak **choroba niedokrwienna serca, zawał**, udar, kardiomiopatia, nadciśnienie, a także cukrzyca i choroba zakrzepowa, mikrocząstki są uważane za markery toczących się procesów patofizjologicznych lub pobudzenia [44,45,46]. Jednocześnie w swojej pracy z roku 2012 wskazałam na możliwe wykorzystanie MP nie tylko jako markerów chorób, ale także jako celu w leczeniu miażdżycy i retinopatii cukrzycowej [41]. Mój istotny wkład polega na wskazaniu związku między stresem, **zapaleniem wywołanym niedotlenieniem** i czynnikami metabolicznym, a procesem uwalniania MP, został przedstawiony w 2 pełnotekstowych publikacjach [19,47].

2.2.3. Czynniki genetyczne i środowiskowe wpływające na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego

Istotnym kierunkiem moich badań w okresie 2006-2011 były studia nad strukturą skrzepu fibrynowego pozyskiwanego z osocza chorych z miażdżycą w różnym stopniu zaawansowania [48,49], chorych z ostrymi incydentami sercowo-naczyniowymi, takimi jak: zawał [50,51], rozwarstwienie ściany tętniaka aorty brzusznej [52], zator tętnicy płucnej [53], udar mózgu [54] oraz z rozpoznany przetrwałym otworem owalnym w ścianie przegrody międzyprzedsionkowej [55], a także poddawanych leczeniu hipolipe-

mizującemu [56]. Badania te były prowadzone m.in. we współpracy z prof. Anetą Undas z Zakładu Kardiologii, Anestezjologii i Kardiologii Eksperymentalnej Collegium Medicum UJ.

Do tej pory opisano w literaturze kilkanaście czynników wpływających na gęstość usieciowania skrzepu fibrynowego i grubość włókien, w tym czynniki epidemiologiczne, takie jak wiek, płeć, palenie papierosów, nadciśnienie, hiperlipidemia i hiperglikemia, hiperhomocysteinemia, ale także infekcje i stan zapalny, czyli czynniki wpływające na podwyższony poziom fibrynogenu. Wskazano także na rolę niektórych polimorfizmów genowych: czynnika XIII (*F13A1* c.100G>T, rs5985), czy fibrynogenu α (*FGA* c.991A>G, rs6050) (Rys. 3).



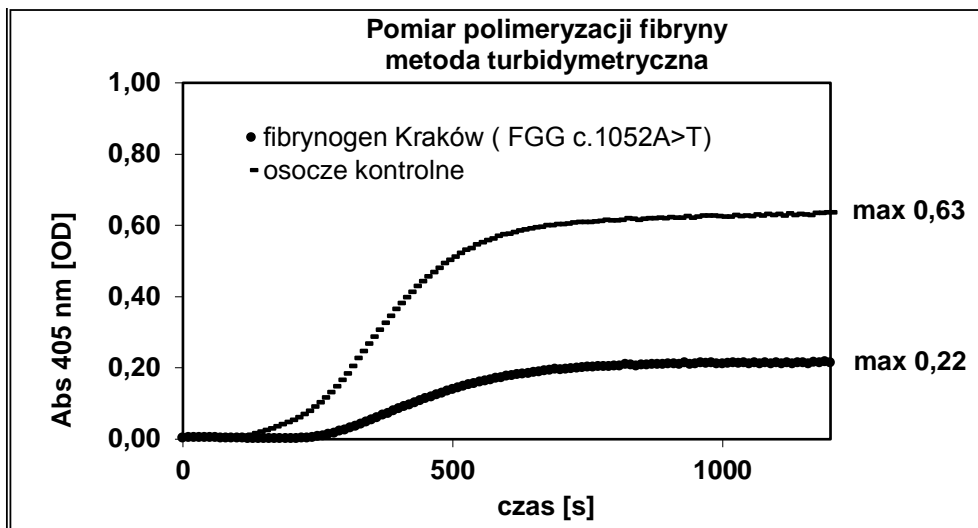
Rysunek 3. Czynniki genetyczne i środowiskowe i ich wpływ na architekturę sieci fibrynowej. Na podstawie Scott E et al. ATVB 2003, zmienione [i].

W badaniach swoich wykazałam, **istotny wpływ stężenia fibrynogenu, na strukturę skrzepu** fibrynowego oraz czynników, które pośrednio lub bezpośrednio regulują stężenie lub biodostępność fibrynogenu: stopień zaawansowania zmian miażdżycowych [49], palenie papierosów [57] oraz czynniki genetyczne (mutacje punktowe powodujące zmiany w polimeryzacji włókien fibrynowych (fibrynogen Kraków) [58]. W mniejszym stopniu polimorfizmy genowe (*FGB* g.4884C>T) [59,60], których efekt może być modulowany przez polimorfizmy innych genów występujących w klastrach [61]. Udowodniłam również zwią-

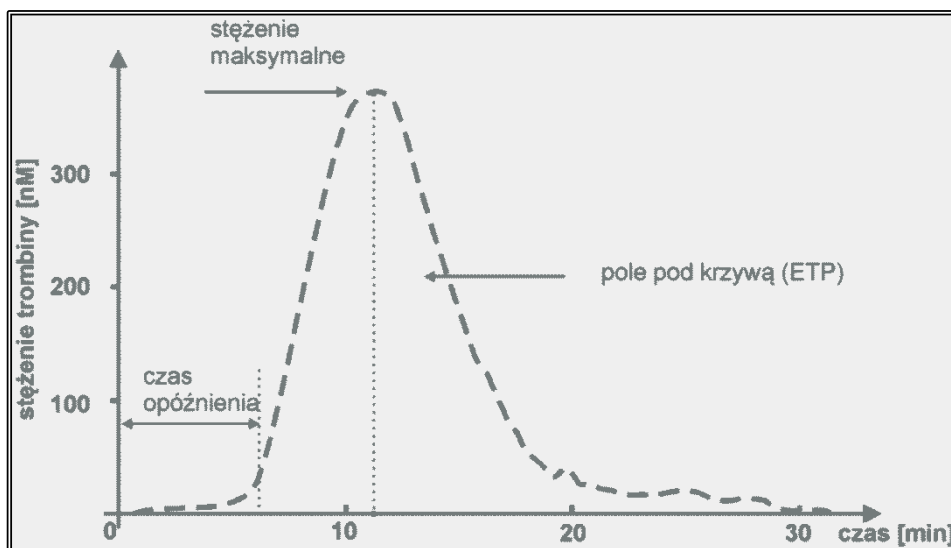
ⁱ Scott EM, Ariens RAS, Grant PJ. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function: relevance to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:1558-66.

zek między polimorfizmem genu kodującego podjednostkę A czynnika XIII (enzym fibrynaza o aktywności transglutaminazy) *F13A1* c.100G>T, rs5985, a podatnością na lisę i przesączalność skrzepu fibrynowego u chorych z zaawansowaną miażdżycą, w ramach projektu *dr Bogusława Kapelaka* z Kliniki Chirurgii Serca, Naczyń i Transplantologii Collegium Medicum UJ [62]. Wskazałam również na udział MP pochodzenia śródbłonkowego i płytkowego w obniżonej podatności na lisę skrzepu fibrynowego u chorych z zawałem serca [63].

Do badań nad strukturą skrzepu fibrynowego wdrożyłam i zastosowałam szereg metod laboratoryjnych, takich jak: **skaningową mikroskopię elektronową SEM** (badania we współpracy z *dr Grzegorzem Tytko*, z Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego), **metodę turbidymetryczną** opartą o kinetyczne pomiary absorbancji osocza aktywowanego trombiną (Rys. 4), czy jako pierwsza w Polsce, **metodę skalibrowanego automatycznego trombogramu** (ang. *Calibrated Automated Thrombogram* – CAT), czyli ocenę trombogenicznego potencjału osocza [64] (Rys. 5).



Rysunek 4. Kinetyka zmian absorbancji osocza aktywowanego trombiną mierzonej przy długości fali 405 nm. Porównanie osocza od chorego z mutacją genu fibrynogenu γ (FGG c.1052A>T) z osoczem osoby zdrowej.



Rysunek 5. Schemat przedstawiający charakterystykę parametrów mierzonych przy użyciu metody skalibrowanego automatycznego trombogramu (*calibrated automated thrombogram* – CAT). ETP – endogenny potencjał trombiny (*endogenous thrombin potential*).

3. Omówienie osiągnięcia naukowego

„Zastosowanie nowych markerów w synergistycznej diagnostyce chorób układu krążenia”

wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, po. 595, z późn. zm.)

Wraz z rozwojem laboratoryjnych metod diagnostycznych i wprowadzeniem w latach 90-tych XX wieku, dzięki badaniom dwóch zespołów: *H.A. Katusa* [ii,iii] i *J.E. Adamsa* [iv,v], tak zwanych nowych markerów sercowych (troponin sercowych T i I) do diagnostyki zawału, nastąpił wzrost zainteresowania markerami laboratoryjnymi chorób układu krążenia, nie tylko w ocenie uszkodzenia mięśniówki serca (miokardium), lecz także w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego, diagnostyce powikłań, a także w prognozowaniu leczenia. Kolejne odkrywanie nowych markerów, zwanych także biomarkerami, możliwe dzięki zastosowaniu wysokoprzepustowych metod molekularnych (OMICS), stawia nowe wyzwania przed diagnostyką laboratoryjną. Takie „multidyscyplinarne” podejście do diagnostyki nie tylko wymaga porównania nowego potencjalnego markera ze „złotym standardem”, ale wiąże się z „innovacyjnym” (w domyśle niestandardowym) podejściem do badań oraz do oceny potencjalnych możliwości i zastosowań nowego markera w medycynie.

Synergistyczna diagnostyka chorób układu krążenia to nowatorskie podejście do diagnostyki laboratoryjnej, z zastosowaniem wielu metod analitycznych z potencjalnym nastawieniem na jednoczesną terapię. Takie synergistyczne podejście w kardiologii umożliwia nowoczesna diagnostyka laboratoryjna połączona z diagnostyką obrazową. Koncepcję diagnostyki synergistycznej i przykłady jej zastosowań w kardiologii po raz pierwszy opisałam w rozdziale podręcznika „Coronary Angiography – Advances in Non-invasive Imaging Approach for Evaluation of Coronary Artery Disease” pod red. *prof. Branisława Blasko-ta*

E. STĘPIEŃ. Acceleration of new biomarkers development and discovery in synergistic diagnostics of coronary artery disease in: Coronary Angiography / Book 2, Editor B. Baskot. InTech 2011; ISBN 979-953-307-235-6.

W pracy wskazałam na trzy potencjalnie rozwijające się kierunki diagnostyki laboratoryjnej w kardiologii i omówiłam ich zastosowanie w różnicowaniu i ocenie ryzyka chorób układu krążenia: białka biorące udział w przebudowie kości - osteopontyna (OPN) i osteoprotegeryna (OPG), mikrocząstki (MP) oraz ocena parametrów związanych tworzeniem skrzepu fibrynowego.

Moim wkładem dla rozwoju synergistycznej diagnostyki chorób układu krążenia jest cykl prac poświęcony roli OPG i OPN w ocenie CAC w grupie osób bezobjawowych. Mimo szeroko zakrojonej pre-

ⁱⁱ Gerhardt W., Katus H.A., Ravkilde J., Hamm C.W. S-troponin-T as a marker of ischemic myocardial injury. *Clin Chem.* 1992, 38, 1194.

ⁱⁱⁱ Katus H.A., Schoepenthan M., Tanzeem A. et al.: Non-invasive assessment of perioperative myocardial cell damage by circulating cardiac troponin T. *Br Heart J.* 1991, 65, 259.

^{iv} Adams J.E. 3rd, Bodor G.S., Dávila-Román V.G. et al.: Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation.* 1993, 88, 101.

^v Adams J.E. 3rd, Sicard G.A., Allen B.T. et al.: Diagnosis of perioperative myocardial infarction with measurement of cardiac troponin I. *N Engl J Med.* 1994, 330, 670.

wencji chorób układu krążenia, dostępnemu i potencjalnie skutecznemu leczeniu hypolipemizującemu, ilość MACE w grupie umiarkowanego ryzyka wzrasta, ponieważ rośnie liczebność tej grupy [vi]. Skuteczne rozpoznanie stanu przedchorobowego z zastosowaniem metod diagnostyki nieinwazyjnej, było dla mnie inspiracją do badań, celem: wskazanie nowych markerów, które potencjalnie różnicowałyby osoby bezobjawowe na grupy ryzyka.

STĘPIEŃ E. Osteoprotegerin as a possible novel predictor of cardiovascular dysfunction. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*. 2012; 1: 82–85.

W pracy tej dyskutuję aktualny stan wiedzy na temat zastosowania OPG jako biomarkera i parametru prognostycznego chorób układu krążenia, cytuję najnowsze badania kliniczne pokazujące, że OPG jest silnym i niezależnym wskaźnikiem prognostycznym chorób układu krążenia (CAC i nadciśnienia), co sugeruje, że OPG może również odgrywać rolę regulatora w patologii serca i przebudowie naczyń [35].

STĘPIEŃ E, Wypasek E, Stopyra K, Konieczńska M, Przybyło M, Pasowicz M. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clin Biochem*. 2011; 44: 826-831.

Praca ta, wykonana na grupie (n=130) bezobjawowych ochotników, którzy zostali zaproszeni do badania w ramach programu „Wczesna prewencja i profilaktyka choroby niedokrwiennej serca i udaru mózgu z zastosowaniem nowoczesnych metod diagnostycznych. CRABIS” w latach 2002-2008 [33]. W pracy tej przedstawiłam i omówiłam wyniki oznaczeń 4 markerów diagnostycznych: 2 markery zapalne, białka ostrej fazy (CRP – białko C-reaktywne i fibrynogen) i 2 markery/regulatory przebudowy kości (OPN i OPG). Ponadto wykonałam oznaczenia stężeń glukozy i lipidów, których podwyższone stężenia są powszechnie uznawane jako czynniki ryzyka sercowo naczyniowego. Parametrem różnicującym te grupy było nadciśnienie (leczone i nieleczone). W badaniu tym wykazałam, że u osób z nadciśnieniem obserwuje się podwyższony poziom CRP, OPG i OPN. Ponadto, osoby z wyższymi stężeniami OPN charakteryzowały się większą częstością występowania nadciśnienia, wyższymi stężeniami glukozy, CRP, OPG i tendencją wzrostową dla fibrynogenu. Przy porównaniu OPG, zależności między stężeniami fibrynogenu, CRP i OPN były słabsze. Analiza przydatności diagnostycznej (analiza ROC; ang. *Receiver Operating Curve*) w różnicowaniu osób bezobjawowych z nadciśnieniem lub bez, stawia OPN i OPG na równi z innymi markerami laboratoryjnymi, będącymi czynnikami ryzyka: CRP, glukoza, fibrynogen, triglicerydy, stężenia LDL i HDL. Wyniki tych badań, zainspirowały mnie do analizy związku między CAC a stężeniami OPN i OPG w grupie bezobjawowej.

STĘPIEŃ E, Fedak D, Klimeczek P, Wilkoś T, Banyś RP, Starzyk K, Bazanek M, Pasowicz M. Osteoprotegerin, but not osteopontin, as a potential predictor of vascular calcification in normotensive subjects. *Hypertens Res*. 2012; 35: 531-538.

Jest to duże badania, wykonane na grupie (n=500) ochotników w ramach programu CRABIS [32]. Najważniejszym osiągnięciem tego badania jest wykazanie, że podwyższone stężenie OPG jest zmienną objaśniającą występowania CAC ocenianych przy użyciu techniki wielorzędowej tomografii komputerowej serca (CardioCT) u osób bezobjawowych, bez nadciśnienia. Ponadto wykazałam, że funkcja nerek, oceniana jako współczynnik przesączania kłębuszkowego (GFR), jest istotnym czynnikiem wpływającym

vi Pasterkamp G. wykład „Biomarkers for Vulnerable Plaques” podczas warsztatów Mechanism, detection and treatment of vulnerable plaques. *Frontiers in Cardiovascular Biology*. Londyn, Wielka Brytania, 29. marzec – 1. kwiecień 2012.

zarówno na częstość i wielkość zwapnień, jak i stężenia OPG. W pracy tej potwierdziłam, na większej grupie badanych, związek między podwyższonymi stężeniami OPG i OPN a nadciśnieniem. Ponadto pokazałam, że osoby bezobjawowe z nadciśnieniem charakteryzują się wyższą medianą współczynnika uwapnienia naczyń wieńcowych (CAC). Co ciekawe, w ogólnej populacji osób bezobjawowych nie zaobserwowałam związku między OPG i OPN a stopniem CAC. Analiza wariancji wielu zmiennych pokazała, że znaczący wzrost stężenia OPG obserwuje się u osób bez nadciśnienia z niewielkimi wartościami CAC (11–100 AU), co pozwala na wyodrębnienie potencjalnie nowej grupy ryzyka.

Nowatorski charakter tego badania polega też na zastosowaniu multidyscyplinarnego, synergistycznego, podejścia do diagnostyki laboratoryjnej, połączenia techniki obrazowania z badaniami laboratoryjnymi, co pozwoliło na wytypowanie i opisanie nowego markera kardiologicznego: osteoprotegeryny. Zastosowanie różnych metod statystycznych pozwoliło też na charakterystykę tej zależności i wskazanie czynników wpływających na nią.

Dobitnym przykładem zwrotu, jaki dokonał się w diagnostyce laboratoryjnej, związanym z rozwojem metod analitycznych (cytometrii przepływowej) jest wykorzystanie mikrocząstek (MP) do diagnostyki chorób. Jeszcze w latach 90-tych XX wieku MP były uważane za *debris* pochodzenia komórkowego, choć w zapomnianych pracach z lat 80-tych *FC Messineo* zauważył, że niedotlenieniu mięśnia sercowego towarzyszy formowanie mikropęcherzyków, poprzedzone uwalnianiem wapnia wewnątrzkomórkowego i aktywacja fosfolipaz [vii]. W 1967 roku *P. Wolf* zaobserwował wydzielane błonowe fragmenty płytek, które nazwał „pyłem płytkowym” [viii], a trawienie próbki enzymami proteolitycznymi i stosowanie detergentów, było jedną z zalecanych metod usunięcia MP, przed analizą próbki w cytometrze przepływowym [ix]. Nowe podejście do diagnostyki wskazało na MP jako wyznaczniki uszkodzenia lub pobudzenia komórek, a tym samym zaproponowano MP jako potencjalny marker.

STĘPIEŃ E, Stankiewicz E, Zalewski J, Godlewski J, Żmudka K, Wybrańska I. Number of microparticles generated during acute myocardial infarction and stable angina correlates with platelet activation. *Arch Med Res.* 2012; 43: 31-35.

W pracy tej wskazuję nie tylko na zwiększoną liczbę MP w krwi chorych z zawałem w porównaniu do chorych ze stabilną chorobą wieńcową, ale także pokazuje, że u chorych z zawałem zwiększa się liczba MP pochodzenia płytkowego transportujących czynnik tkankowy (CD142) [47]. Po raz pierwszy wskazuję, że MP w zawale mogą być nośnikiem istotnych dla krzepnięcia czynników, prawdopodobnie poprzez ich zdolność do wzajemnej agregacji, co zaobserwowałam w moich wcześniejszych pracach. Zależność między markerami aktywacji płytek (powierzchniowa P-selektyna) a liczbą MP, zarówno pochodzenia płytkowego jak i śródbłonkowego pokazuje na znaczący udział płytek w uwalnianiu MP w zawale, nie tylko jako źródła MP ale także jako regulatora uwalniania MP z innych komórek.

^{vii} Katz AM, Messineo FC. Fatty acid effects on membranes: possible role in the pathogenesis of ischemic myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol.* 1982; Suppl. 3:119-22.

^{viii} Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13:269-288.

^{ix} Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry.* 1997; 30:124-33.

Zejscie do poziomu „mikro” i „nano” otwiera nowe możliwości przed metodami diagnostycznymi. Przykładem zastosowania technik w skali nanotechnologii jest mój dorobek poświęcony analizie struktury skrzepu fibrynowego (patrz: pkt 2.2.3.). W szczególności moja praca, w której po raz pierwszy wskazuję na związek między grubością ściany naczyniowej tętnicy szyjnej mierzone od linii granicznej przydanka – błona środkowa do linii granicznej błona wewnętrzna – światło naczynia, a gęstością skrzepu fibrynowego u chorych z wielopoziomą miażdżycą [49].

STĘPIEŃ E, Kabłak-Ziembicka A, Musiałek P, Tylko G, Przewłocki T. Fibrinogen and carotid intima media thickness determine fibrin density in different atherosclerosis extents. *Int J Cardiol.* 2012; 157: 411-413.

Pomiar grubości kompleksu błony wewnętrznej (*tunica intima*) i środkowej (*tunica media*) - kompleksu intima-media (CIMT) pozwala na ocenę wczesnych zmian miażdżycowych. Jednocześnie, moje wcześniejsze badania nad strukturą skrzepu fibrynowego pokazały, związek między czynnikami ryzyka a gęstością skrzepu fibrynowego, jego przesączalnością i podatnością na lizę. W powyższej pracy wykazałam, że mimo braku zależności między markerami zapalenia a wartością CIMT u chorych z miażdżycą wielopoziomą, istnieje związek ze stopniem zaawansowania miażdżycy i architekturą skrzepu fibrynowego wyrażona jako gęstość skrzepu i grubość włókien fibrynowych. Praca ta jest kolejnym przykładem na wykorzystanie diagnostyki synergistycznej do poszukiwania nowych markerów w kardiologii.

Praca zamykająca mój cykl publikacji jest list do redakcji Kardiologii Polskiej, w którym wskazuję na zasadność wykonywania oznaczeń polimorfizmów genowych w ocenie krótkoterminowego ryzyka powikłań po zabiegach CABG [65].

STĘPIEŃ E, Kapelak B, Drwiła R, Sadowski J. Single nucleotide polymorphisms may be useful as short-term predictors after coronary artery by-pass grafting surgery: the role of FGB g.4884C>T polymorphism. *Kardiol Pol.* 2012; 70: 109-110.

Jest to podsumowanie mojej kilkunastoletniej działalności jako diagnosty laboratoryjnego i genetyka i współpracującego z kardiochirurgami i kardioanestezjologami. W pracy tej wskazuję na potrzebę rozszerzenia diagnostyki laboratoryjnej także o badania genetyczne w celu zindywidualizowania podejścia do chorego, szczególnie chorego obciążonego wysokim ryzykiem powikłań. Synergizm w badaniach diagnostycznych dotyczy zatem nie tylko diagnostyki obrazowej i biochemicznej, lecz także badań molekularnych i genetycznych.

4. Spis załączników do niniejszego autoreferatu

1. Poświadczona notarialnie kopia odpisu dyplomu doktora nr 4078.
2. Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki
3. Kopie publikacji stanowiących dorobek naukowy będący monotematycznym cyklem publikacji (razem 7 szt)
4. Oświadczenia zgody współautorów na wykorzystanie dorobku w przewodzie habilitacyjnym do wymienionych publikacji (razem 24 sztuki)
5. Analiza bibliometryczna sporządzona przez mgr Martę Stokaluk z Biblioteki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (z dn. 24-08-2012).
6. Autoreferat w języku angielskim.

Ewa Stępień

5. Cytowane prace naukowe i publikacje z dorobku habilitanta

- 1 STĘPIEŃ E, Korohoda W. Guided outgrowth of DRG neurites and chick embryo cerebral neuron aggregates on human skin fibroblasts. *Folia Hist. Cyt.* 1996; 34 (Suppl. 2): 76.
- 2 Waligórska A, STĘPIEŃ E, Korohoda W. Experimental model for quantitative characterization of neuronal chemotaxis. 7th Conference on Cell Biology. 9-11.09.1999 Kraków. *Folia Histo. Cytobiologia.* 1999; 37 (suppl. 1): 24.
- 3 STĘPIEŃ E. (1999) "Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost komórek nerwowych *in vitro*". Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego, promotor Prof. Włodzimierz Korohoda.
- 4 STĘPIEŃ E, Stanisław J, Korohoda W. Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biol. Inter.* 1999; 23 (2): 10-116.
- 5 STĘPIEŃ E. Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost neuronów. Factors influencing on guided neural outgrowth. (Polish) *Postępy Biol. Kom.* 1996; 23: 573-596.
- 6 STĘPIEŃ E. Bodziec pozytywny, bodziec negatywny – czyli rzecz o ruchach komórek nerwowych. Positive cue versus negative cue – matter about neural cells movement. (Polish) *Wszechświat.* 1998; 99 (4-6): 100-104.
- 7 Pieniżek P, Karczewska E, STĘPIEŃ E, Tracz W, Konturek SJ. Incidence of Chlamydia pneumoniae infection in patients with coronary artery disease subjected to angioplasty of bypass surgery. *Medical Sci. Monitor.* 2001; 7: 995-1001.
- 8 STĘPIEŃ E, Branicka A, Pieniżek P, Bożek M. Zakażenia Chlamydia pneumoniae – metody diagnostyczne. *Chlamydia pneumoniae infections – diagnostic methods.* (Polish) *Przegląd Lekarski;* 2001: 58; 142-146.
- 9 Pieniżek P, STĘPIEŃ E, Świat A, Marcinkowska Z, Andres J, Działkowiak A. Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary aortic lesions of atherosclerosis in explanted hearts – confocal microscopy analysis. 33rd ESCI Meeting 8-10.04.1999. Milan, Italy. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999; 29 (Suppl. 1): 73
- 10 Pieniżek P, STĘPIEŃ E, Kądzielski A, Żmudka K, Sędziwy E, Tracz W. Przewlekłą infekcją Chlamydia pneumoniae czynnikiem ryzyka wystąpienia ostrego zespołu wieńcowych. VI Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego 19-21.09.2002. Poznań. *Kardiologia Polska* 57 (Supl. II). P-254.
- 11 Przewłocki T., Kablak-Ziembicka A., Pieculewicz M., Stopa I., Pieniżek P., Zalewski J., STĘPIEŃ E, Żmudka K., Tracz W. Infekcja Chlamydia pneumoniae i białka zapalne u chorych po CABG poddanych przezskórnej rewaskularyzacji z powodu nawrotu dolegliwości stenokardialnych. *Postępy w Kardiologii Interwencyjnej.* 2006; 2, 87-93.
- 12 Pieniżek P, STĘPIEŃ E, Sadowski J, Przewłocki T, Sokołowski A, Podolec P, Kapelak B, Przybyłowski P, Kądzielski A, Tracz W. Impact of Chlamydia pneumoniae infection on survival rate after heart transplantation. *Med Sci Monit.* 2003; 2; CR67-72.
- 13 Zalewski J, STĘPIEŃ E, Szajna-Zych M., Milewicz T., Sadowski J. Protection of human endothelial cell viability with ischemic preconditioning. *Adv. Rec. Cardiovasc. Res.* 2002: 73-77.
- 14 STĘPIEŃ E, Andres J, Wygrecka M, Lorenowicz M, Sadowski J, Działkowiak A. An aspirin induced HSP72 expression in endothelial cells *in vitro*. V Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK Konstancin 1-2.12. 2000. *Kardiologia Polska (Supl.)*. 2000.
- 15 Wygrecka M, STĘPIEŃ E, Andres J, Sadowski J, Przybyłowski P, Działkowiak A. Aspirin may induce preconditioning effect by stimulation of HSP 72 expression in endothelial cells *in vitro*. *J Cell Mol Cardiology.* 2001; 6: A131.
- 16 Szajna-Zych M, Andres J, STĘPIEŃ E, Sadowski J. Propofol-induced cellular stress response in human endothelial cells *in vitro*. *Adv. Rec. Cardiovasc. Res.* 2002: 67-72.
- 17 Małgorzata Sekuła (2009) „Homocysteina jako czynnik indukujący tworzenie mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w hodowlach *in vitro*” Praca magisterska wykonana w Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i badań Naukowych KSS im. Jana Pawła II w Krakowie, obroniona na Uniwersytecie Rolniczym. Promotor: dr Ewa STĘPIEŃ.
- 18 Greta Janawa (2009) „Analiza związku między polimorfizmem (C677T) reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) a generacją mikrocząstek u chorych z ostrym zespołem wieńcowym” Praca magisterska wykonana w Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i badań Naukowych KSSim. Jana Pawła II w Krakowie, obroniona na Uniwersytecie Rolniczym. Promotor: dr Ewa STĘPIEŃ.
- 19 Sekuła M, Janawa G, Stankiewicz E, STĘPIEŃ E. Endothelial microparticle formation in moderate concentrations of homocysteine and methionine *in vitro*. *Cell Mol Biol Lett.* 2011;16:69-78
- 20 E Stankiewicz, E STĘPIEŃ, A Undas, J Zalewski, J Godlewski, K Żmudka. Platelet, endothelial and monocyte microparticles are generated during acute myocardial infarction and in stable angina. 77 Congress European Artherosclerosis Society Istambul 24-28. kwiecień, 2008. *Artherosclerosis* 2008; (Abstract Supplement).
- 21 Elżbieta Paszek (2010) „Wpływ nanocząstek tlenku cynku na integralność warstwy śródbłonka naczyniowego *in vitro*”. Praca magisterska wykonana w Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i badań Naukowych KSSim. Jana Pawła II w Krakowie obroniona na Uniwersytecie Jagiellońskim. Promotor: dr Ewa STĘPIEŃ.
- 22 Dominik Jakubiak (2011) „Rola białek cytoszkieletu komórek śródbłonka naczyniowego w odpowiedzi na nanocząstki nieorganiczne”. Praca magisterska wykonana w Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i badań Naukowych KSSim. Jana Pawła II w Krakowie obroniona na Uniwersytecie Rolniczym. Promotor: dr Ewa STĘPIEŃ.
- 23 Paszek E, Czyż J, Woźnicka O, Jakubiak D, Wojnarowicz J, Łojkowski W, STĘPIEŃ E. Zinc Oxide Nanoparticles Impair the Integrity of Human Umbilical Vein Endothelial Cell Monolayer *In Vitro*. *J of Biomedical Nanotech.* 2012;8:1–11.

- 24 Andres J, STĘPIEŃ E, Szajna-Zych M, Drwiła R, Ziętkiewicz M, Sadowski J, Kapelak B, Działkowiak A. Poziomy Troponiny I, troponiny T, izoenzymu MB kinazy kreatyny oraz mioglobiny w surowicy krwi w diagnostyce okołoperacyjnego zawału mięśnia sercowego u chorych po operacjach naczyń wieńcowych z użyciem krążenia pozaustrojowego (Polish) *Folia Medica Cracoviensia*. 2001; XLII: 263-272.
- 25 Andres J, Drwiła R, Kapelak B, Szajna-Zych M, STĘPIEŃ E, Działkowiak A. Cardiac troponin I and CKMBmass blood levels for diagnosis of postoperative myocardial infarction after coronary artery bypass graft surgery. EASA Meeting. 16-19.06.1999. Budapest Hungary.
- 26 Andres J, Drwiła R, Kapelak B, Szajna-Zych M, STĘPIEŃ E, Działkowiak A. Cardiac troponin I and CKMBmass blood levels for diagnosis of postoperative myocardial infarction after coronary artery bypass graft surgery. ESA Meeting. 29.05-01.06.1999. Amsterdam. Netherlands. *British J Anaesth*. 1999; 82 (Suppl. 1): A170.
- 27 Andres J, Drwiła R, Kapelak B, Szajna-Zych M, STĘPIEŃ E, Sadowski J, Działkowiak A. Cardiac troponin T, CK-MBmass and myoglobin blood levels for diagnosis of postoperative myocardial infarction after coronary artery bypass graft surgery. EACTA Meeting. 21-24.06.2000 Aarhus, Denmark. Abstract Book P06 8: 89.
- 28 STĘPIEŃ E, Śnieżek-Maciejewska M, Szajna-Zych M, Sadowski J. Biochemiczne markery niedokrwienia mięśnia sercowego w diagnostyce zawału okołoperacyjnego uszkodzenia serca. Biochemical markers in diagnostics of perioperative cardiac injury. (Polish) *Forum Kardiologów*. 2002; 7: 135-142.
- 29 Śnieżek-Maciejewska M, STĘPIEŃ E, Kurowska I, Stefko K, Kapelak B, Sadowski J. Cytokiny prozapalne a ryzyko zawału okołoperacyjnego u pacjentów poddanych chirurgicznej rewaskularyzacji mięśnia sercowego. IX Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologiczne-go, 20/22-09-2005 Katowice. *Kardiologia Polska* 2005 2.10.2.P212.
- 30 M. Śnieżek-Maciejewska, E. STĘPIEŃ, A. Undas, K. Sztefko, B. Kapelak, J. Sadowski. Proinflammatory cytokines and the risk of perioperative myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass grafting. ESC (European Society of Cardiology) 29 August-2 September Barcelona, Spain. *E. Heart J*. 2009;30 (Abstract Supplement): 383
- 31 the Multicentre Evaluation of Routine Immunoassay of Troponin T study (MERIT). P O Collinson, P J Stubbs, A-C Kessler. Multi-centre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart* 2003;89:280-286.
- 32 STĘPIEŃ E, Fedak D, Klimeczek P, Wilkosz T, Banyś RP, Starzyk K, Bazanek M, Pasowicz M. Osteoprotegerin, but not osteopontin, as a potential predictor of vascular calcification in normotensive subjects. *Hypertens Res*. 2012; 35: 531-538.
- 33 STĘPIEŃ E, Wypasek E, Stopyra K, Koniecznyńska M, Przybyło M, Pasowicz M. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals. *Clin Biochem*. 2011; 44: 826-831.
- 34 STĘPIEŃ E, Miszański-Jamka T, Kapusta P, Tylko G, Pasowicz M. Beneficial effect of cigarette smoking cessation on fibrin clot properties. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32:177-182.
- 35 STĘPIEŃ E. Osteoprotegerin as a possible novel predictor of cardiovascular dysfunction. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*. 2012; 1: 82-85.
- 36 Pasowicz M, Starzyk K, Klimeczek P, STĘPIEŃ E, Tracz W. Comparative study of elevated hs C-reactive protein and lipid profile, the selected markers of atherosclerotic inflammation and coronary artery calcification in the middle-aged men with no artery disease or diabetes. ESC (European Society of Cardiology), Vienna, Austria. 30-08-2003-03-09-2003 *Eur Heart J*. 2003; (Abstract Suppl.) 24574.
- 37 Undas A, STĘPIEŃ E, Topór-Madry R, Miszański-Jamka T, Tracz W, Pasowicz M. Effect of cigarette smoking on plasma fibrin clot properties. *J Thromb Haemost*. 2009; Volume 7, Supplement 2: Abstract PP-MO-207.
- 38 Pasowicz M, Starzyk K, Moczurad K, Rumian S, Kolasa-Trela R, Wicher-Muniak E, Wilkosz T, Klimeczek P, Koniecznyńska M, STĘPIEŃ E. Małopolski program globalnej oceny ryzyka sercowo-naczyniowego Lesser Polish program of global cardiovascular risk assessment. IX Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologiczne-go, 20/22-09-2005 Katowice. *Kardiologia Polska* 2005 2.10.3.P220
- 39 STĘPIEŃ E, Wypasek E, Wilkosz T, Bazanek M, Pasowicz M. Podwyższone stężenia markerów kalcyfikacji (osteoprotegeriny i osteopontyny) u osób z nadciśnieniem tętniczym. Wiosenna Konferencja Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego 18-19/06/2009. Kraków. *Kardiologia Polska* 2009; 67: 6 (supl. 3) R21.
- 40 STĘPIEŃ E, Stankiewicz E, Sekuła M, Pasowicz M, Grudzień G, Żmudka K, Sadowski J. Potential role of osteoprotegerin in stem cells homing behavior after hypoxia. XVI Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego Poznań, 24-26 listopada 2011.
- 41 STĘPIEŃ E, Kablak-Ziembicka A, Czyż J, Przewłocki T, Małecki M. Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16:677-88.
- 42 E STĘPIEŃ, J Stoliński, J Grzybowska et al. Potential role of platelet derived microparticles and their aggregates in atherosclerotic plaque vascularization. 2nd Congress of the European-Society-of-Cardiology Council on Basic Cardiovascular Science - Frontiers in Cardiovascular Biology. Location: London, England Mar 30-Apr 01, 2012; Source: *Cardiovasc Res*. Volume: 93 Supplement: 1 Pages: S76-S76.
- 43 E. STĘPIEŃ, A Gruca, J Grzybowska et al. Different population of platelet derived microparticles from healthy donors stimulate angiogenesis *in vitro*. 2nd Congress of the European-Society-of-Cardiology Council on Basic Cardiovascular Science - Frontiers in Cardiovascular Biology Location: London, England Mar 30-Apr 01, 2012; Source: *Cardiovasc Res*. Volume: 93 Supplement: 1 Pages: S76-S76.

- 44 Stankiewicz E, E STĘPIEŃ, A Undas, J Zalewski, J Godlewski, K Zmudka. Platelet activation is associated with generation of microparticles of different origin in patients with acute myocardial infarction. 41st Annual Scientific Meeting of ESCI Uppsala, Sweden 17/20-04- 2007. *Eur J Clin Invest.* 2007; 37 (Suppl. 1): 137.
- 45 E STĘPIEŃ, E Stankiewicz, K. Szuldrzynski, K Zmudka, A. Undas Platelet- and endothelial-derived microparticles associate with the fibrin clot resistance to lysis. Kongres ESC (European Society of Cardiology), Wiedeń, Austria, wrzesień 01-05, 2007 *E Heart J.* 2007; 28 (Abstract suppl.); 667.
- 46 E Stankiewicz, E STĘPIEŃ, A Undas, J Zalewski, J Godlewski, K Zmudka. Platelet, endothelial and monocyte microparticles are generated during acute myocardial infarction and in stable angina. 77 Congress European Artherosclerosis Society Istambul 24-28. kwiecień, 2008. *Artherosclerosis* 2008; (Abstract Supplement).
- 47 STĘPIEŃ E, Stankiewicz E, Zalewski J, Godlewski J, Żmudka K, Wybrańska I. Number of microparticles generated during acute myocardial infarction and stable angina correlates with platelet activation. *Arch Med Res.* 2012; 43: 31-35.
- 48 Undas A, STĘPIEŃ E, Szczeklik A. Lipoprotein(a) as a modifier of fibrin clot permeability and susceptibility to lysis. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 973-5.
- 49 STĘPIEŃ E, Kablak-Ziembicka A, Musiałek P, Tylko G, Przewłocki T. Fibrinogen and carotid intima media thickness determine fibrin density in different atherosclerosis extents. *Int J Cardiol.* 2012; 157: 411-413
- 50 Undas A, Szuldrzyński K, STĘPIEŃ E, Zalewski J, Godlewski J, Tracz W, Pasowicz M, Żmudka K. Reduced clot permeability and susceptibility to lysis in patients with acute coronary syndrome: Effects of inflammation and oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2008;196:551-7.
- 51 Undas A, Więk I, STĘPIEŃ E, Żmudka K, Tracz W. Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome. *Diabetes Care.* 2008;31:1590-5.
- 52 Matusik P, Mazur P, STĘPIEŃ E, Pfitzner R, Sadowski J, Undas A. Architecture of intraluminal thrombus removed from abdominal aortic aneurysm. *J Thromb. Thrombolysis.* 2010; 30: 7-9.
- 53 Undas A, STĘPIEŃ E, Rudziński P, Sadowski J. Architecture of a pulmonary thrombus removed during embolectomy in a patient with acute pulmonary embolism. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 140: E40-E41.
- 54 Undas A, Podolec P, Zawilska K, Pieculewicz M, Jedliński I, STĘPIEŃ E, Konarska-Kuszevska E, Weglarz P, Duszyńska M, Hanschke E, Przewłocki T, Tracz W. Altered fibrin clot structure/function in patients with cryptogenic ischemic stroke. *Stroke.* 2009;40:1499-501.
- 55 Wypasek E, STĘPIEŃ E, Pieculewicz M, Podolec P, Undas A. Factor XIII Val34Leu polymorphism and ischaemic stroke in patients with patent foramen ovale. *Thromb Haemost.* 2009;102:1280-2.
- 56 Undas A, Kaczmarek P, Śladek K, STĘPIEŃ E, Skucha W, Rzeszutko M, Gorkiewicz-Kot I, Tracz W. Fibrin clot properties are altered in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Beneficial effects of simvastatin treatment. *Thromb Haemost.* 2009;102:1176-82.
- 57 STĘPIEŃ E, Miszański-Jamka T, Kapusta P, Tylko G, Pasowicz M. Beneficial effect of cigarette smoking cessation on fibrin clot properties. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;32:177-182.
- 58 Undas A, Zdziarska J, Iwaniec T, STĘPIEŃ E, Skotnicki AB, de Moerloose P, Neerman-Arbez M. Fibrinogen Krakow: a novel hypo/dysfibrinogenemia mutation in fibrinogen gamma chain (Asn325Ile) affecting fibrin clot structure and function. *Thromb Haemost.* 2009;101:975-6.
- 59 Małgorza Kot (2008) „Wpływ polimorfizmu C148T (S128R) genu b-fibrynowego na strukturę i funkcję skrzepu fibrynowego u chorych z zaawansowaną postacią miażdżycy” Praca magisterska wykonana w Samodzielnej Pracowni Biologii Molekularnej i badań Naukowych KSSim. Jana Pawła II w Krakowie, obroniona na Uniwersytecie Rolniczym. Promotor: dr Ewa STĘPIEŃ.
- 60 Wypasek E, STĘPIEŃ E, Kot M, Undas A. The fibrinogen beta-chain C148T polymorphism is involved with increase fibrinogen levels but not with fibrin structure in patients with advanced coronary artery disease. 43rd Annual Scientific meeting of the European Society for Clinical Investigation Frankfurt/Main 1-4/04/2009 *Eur J Clin Inv.* 2009; 39 (suppl. 10) 1-14. A36
- 61 Wypasek E, STĘPIEŃ E, Kot M, Plicner D, Kapelak B, Sadowski J, Undas A. Fibrinogen Beta-Chain -C148T Polymorphism is Associated with Increased Fibrinogen, C-Reactive Protein, and Interleukin-6 in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. *Inflammation.* 2012;35:429-35.
- 62 STĘPIEŃ E, Plicner D, Kapelak B, Pazdan A, Wypasek E, Sadowski J, Undas A Factor XIII Val34Leu polymorphism as a modulator of fibrin clot permeability and resistance to lysis in patients with severe coronary artery disease. *Kardiol Pol.* 2009; 67 (8A); 947-955
- 63 E STĘPIEŃ, E. Stankiewicz, K. Szuldrzynski, K. Żmudka, A. Undas Platelet- and endothelial-derived microparticles associate with the fibrin clot resistance to lysis. Kongres ESC (European Society of Cardiology), Wiedeń, Austria, wrzesień 01-05, 2007 *E Heart J.* 2007; 28 (Abstract suppl.); 667.
- 64 STĘPIEŃ E, Plicner D, Branicka A, Stankiewicz E, Pazdan A, Śnieżek-Maciejewska M, Górkiewicz I, Kapelak B, Sadowski J. Czynniki wpływające na generację trombin mierzonyj jako stężenie kompleksów trombina-antytrombina i metodą automatycznego skalibrowanego trombogramu u chorych z zaawansowaną chorobą wieńcową. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej.* 2007; 117:297-305.
- 65 STĘPIEŃ E, Kapelak B, Drwiła R, Sadowski J. Single nucleotide polymorphisms may be useful as short-term predictors after coronary artery by-pass grafting surgery: the role of FGB g.4884C>T polymorphism. *Kardiol Pol.* 2012; 70: 109-110.