

## **AUTOREFERAT**

**do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**

**Dr n. biol. Ewa Wypasek**

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Zakład Kardiochirurgii, Anestezjologii i Kardiologii Eksperymentalnej,  
Instytut Kardiologii,  
ul. Prądnicka 80

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Anetta Undas

**Kraków 2016**

1. **Imię i nazwisko:** Ewa Wypasek
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

Urodziłam się 7 lutego 1975 roku w Krośnie.

W latach 1982 - 1990 byłam uczennicą Szkoły Podstawowej w Dobieszynie.

W latach 1990 - 1994 uczęszczałam do Liceum Ogólnokształcącego im. Marii Konopnickiej w Jedliczu do klasy o profilu biologiczno-chemicznym. W 1994 r. zdałam egzamin maturalny i otrzymałam świadectwo dojrzałości.

W latach 1994 - 1999 studiowałam na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego na kierunku Biologia. Na trzecim roku studiów wybrałam specjalizację Biologia Molekularna. Pracę magisterską pt. „Badanie modelu multiple sclerosis u myszy SJL: przebieg choroby i wpływ na narządy limfatyczne” wykonałam pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Płytycz w Zakładzie Immunobiologii Ewolucyjnej. Tytuł magistra otrzymałam 14 czerwca 1999 roku w zakresie biologii molekularnej.

W latach 1997-1999 byłam uczestnikiem Studium Pedagogicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego i uzyskałam kwalfikacje pedagogiczne do pracy nauczycielskiej w zakresie biologii i chemii.

Dnia 15 października 2003 roku Uchwałą Krajowej Izby Diagnostów laboratoryjnych nr 31/2003 uzyskałam prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego.

Dnia 22 czerwca 2004 roku decyzją Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego uzyskałam stopień naukowy doktora nauk biologicznych w zakresie biologii na podstawie rozprawy doktorskiej: „Badania porównawcze udziału komórek tucznych w odczynie zapalnym”.

W postępowaniu kwalifikacyjnym wg naboru 15.06-15.07.2012 roku przeprowadzonym przez Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, zostałam zakwalifikowana do rozpoczęcia specjalizacji z Laboratoryjnej Genetyki Medycznej, która jest w toku.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/  
artystycznych.**

2011 – obecnie, Pracownia Biologii Molekularnej, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, p.o. Kierownika Pracowni

2008 – obecnie, Zakład Kardiochirurgii, Anestezjologii i Kardiologii Eksperymentalnej, Instytut Kardiologii, Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, asystent

2006 – 2011, Samodzielna Pracownia Biologii Molekularnej i Badań Naukowych, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, młodszy asystent diagnostyki laboratoryjnej

2006 – 2008, Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, asystent

2004 – 2006, Postdoctoral Researcher w Ohio State University Medical Center, Biomechanics and Tissue Engineering Laboratory pod kierunkiem prof. Sudha Agarwal

4. **Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

**Polimorfizmy genetyczne związane ze stanem zapalnym i stabilnością antykoagulacji u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi**

b) autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

1. **Wypasek E, Potaczek DP, Undas A.** Association of the C-Reactive Protein Gene (CRP) rs1205 C>T Polymorphism with Aortic Valve Calcification in Patients with Aortic Stenosis. *Int J Mol Sci.* 2015;16:23745-59. **IF – 2,862; KBN/MNiSW – 30.**
2. **Wypasek E, Cieśla M, Suder B, Janik Ł, Sadowski J, Undas A.** CYP2C9 Polymorphism and Unstable Anticoagulation with Warfarin in Patients Within the First 3 Months Following Heart Valve Replacement. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24:607-14. **IF – 1,095; KBN/MNiSW – 15.**
3. **Wypasek E, Potaczek DP, Lamplmayr M, Sadowski J, Undas A.** Interleukin-6 receptor Asp358Ala gene polymorphism is associated with plasma C-reactive protein levels and severity of aortic valve stenosis. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:1049-56. **IF – 2,707; KBN/MNiSW – 35.**
4. **Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A.** Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. *Thromb Res.* 2014;134:604-9. **IF – 2,447; KBN/MNiSW – 25.**
5. **Wypasek E, Stepień 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. **IF – 2,457; KBN/MNiSW – 20.**

- 6. Wypasek E, Undas A, Sniezek-Maciejewska M, Kapelak B, Plicner D, Stepień E, Sadowski J.** The increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery are associated with the interleukin-6-174G > C gene polymorphism. *Ann Clin Biochem*. 2010;47:343-9. **IF – 2,209; KBN/MNiSW – 27.**

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

Liczne dane doświadczalne i kliniczne wskazują na kluczowy udział procesów zapalnych w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Rola czynników genetycznych w tym polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*) wpływających na regulację stężenia markerów zapalnych i związaną z tym progresję/regresję chorób sercowo-naczyniowych nie jest jasna. Celem niniejszej rozprawy habilitacyjnej było określenie wpływu wybranych polimorfizmów genetycznych na stan zapalny i stabilność antykoagulacji u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi. Badania genetyczne różnego typu, w tym badania asocjacyjne całego genomu (GWAS, *genome-wide association study*), wykazały, że znaczna część zmienności osobniczej stężenia biomarkerów zapalnych jest uwarunkowana genetycznie i zależy od danej populacji, regionu w jakim występuje populacja jak i rodzaju choroby. Dzięki temu, określone SNP mogą stać się potencjalnymi markerami identyfikującymi pacjentów podatnych na nasilenie danej choroby bądź przeciwnie, mogą chronić przed ostrym fenotypem.

Najintensywniej badanym biomarkerem zapalenia w chorobach sercowo-naczyniowych jest białko C-reaktywne (CRP, *C-reactive protein*) produkowane głównie przez hepatocyty. Wątrobowa synteza CRP jest stymulowana przez interleukinę-6 (IL-6). Oba markery odgrywają kluczową rolę w nasileniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej u pacjentów po pomostowaniu aortalno-wieńcowym (CABG, *coronary artery bypass grafting*). Jednym z potencjalnych modulatorów genetycznych ogólnoustrojowego zapalenia po CABG jest polimorfizm w promotorze genu *IL6* -174G>C (rs1800795). Jednak liczne badania na temat jego wpływu na stężenie CRP lub/i IL-6 dawały sprzeczne wyniki. **W pracy: Wypasek E, Undas A, Śniezek-Maciejewska M, Kapelak B, Plicner D, Stepień E, Sadowski J. The increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in patients undergoing**

**coronary artery bypass grafting surgery are associated with the interleukin-6-174G>C gene polymorphism** po raz pierwszy pokazałam, że obecność allelu -174C jest niezależnym predyktorem zwiększonego stężenia CRP i IL-6 zarówno przed- jak i 5-7 dni po zabiegu CABG [1]. Ponad to czas trwania intubacji i pobyt na intensywnej terapii były pozytywnie skorelowane z pooperacyjnym wzrostem stężenia IL-6. Podobnie, w pracy: **Wypasek E, Stepień 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(2):429-35** po raz pierwszy pokazałam, że polimorfizm -148C>T jest niezależnym predyktorem przed i pooperacyjnego wzrostu stężenia CRP. Ponad to nosiciele allelu T wykazywali się wyższym przedoperacyjnym stężeniem fibrynogenu i wyższym pooperacyjnym stężeniem IL-6 [2]. Co więcej, zaobserwowałam, że udary niedokrwienne mózgu niezakończone zgonem pojawiły się u 4% nosicieli allelu -148T podczas okresu pooperacyjnego, podczas gdy taki epizod nie wystąpił u żadnego z pacjentów z genotypem CC. Dodatkowo, pacjenci z poziomem fibrynogenu z najwyższego kwartyłu mieli zwiększone ryzyko wystąpienia śródoperacyjnego zawału serca [2].

Obie prace pokazują, że badane polimorfizmy genów prozapalnych mogą nasilać stan zapalny u pacjentów z miażdżycą i wpływać na zdarzenia niepożądane w okresie okołoperacyjnym u chorych poddawanych planowej operacji CABG.

Mechanizm rozwoju miażdżycy tętnic jest podobny do mechanizmu obserwowanego w stenozie aortalnej (AS, *aortic stenosis*). Dotyczy to głównie procesu zapalnego, któremu towarzyszy naciek makrofagów, gromadzenie złogów lipidów i przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednak tylko w przypadku AS toczący się stan zapalny prowadzi do postępującego zwłóknienia i zwapnienia wraz ze stopniowym zmniejszaniem się powierzchni ujścia zastawki prawdopodobnie w wyniku transformacji osteoblastycznej komórek śródmiaższowych. Dlatego postanowiłam zbadać związki pomiędzy polimorfizmami genów kodujących biomarkery stanu zapalnego a osoczowymi stężeniami tych biomarkerów i nasileniem choroby mierzone stopniem kalcyfikacji zastawki i/lub parametrami echokardiograficznymi. W pracy: **Wypasek E, Potaczek DP, Undas A. Association of the C-Reactive Protein Gene (CRP) rs1205C>T Polymorphism with Aortic Valve Calcification in Patients with Aortic Stenosis. Int J Mol Sci. 2015;16:23745-59** po raz pierwszy pokazałam, że nosiciele allelu rs1205T charakteryzują się podwyższonym stężeniem

CRP w surowicy i cięższym zwapnieniu zastawki aortalnej w porównaniu do osób z allelem dzikim [3]. Wpływ polimorfizmu rs1205 na stężenie CRP u pacjentów z AS okazał się być przeciwny niż ten obserwowany u osób zdrowych co sugeruje istnienie molekularnych procesów regulacyjnych specyficznych tylko dla AS. Jednak mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska nie są do końca jasne. Przeprowadzając analizę *in silico* wykazałam, że nie jest to związane z położeniem mutacji w rejonie 3'-UTR, co mogłoby mieć wpływ na stabilność mRNA i ekspresję genów tam umiejscowionych. Ponadto w obszarze tym nie ma motywów docelowych dla miRNA, które również mogłyby wpływać na stabilność transkryptu. Prawdopodobnie mamy tu do czynienia z wpływem innych polimorfizmów pozostających w wysokiej nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem rs1205. Poprzez analizę *in silico* pokazałam, że polimorfizmy rs2027471, rs1341665, rs7551731, rs7553007 wpływają na wiązanie czynników transkrypcyjnych i poprzez zmianę aktywności promotora, mogą wpływać na ekspresję CRP.

Ponadto pokazałam, że posiadanie wariantu rs1205T predysponuje do silniejszego zwapnienia zastawki aortalnej i może być potencjalnym genetycznym markerem ryzyka progresji choroby. Co ciekawe, nasilenie zwapnienia zastawki aortalnej nie korelowało z podwyższonym stężeniem CRP. Może to wynikać ze współdziałania polimorfizmu rs1205 z polimorfizmami w sąsiednich rejonach genu *CRP* na chromosomie 1q23, który jest miejscem nagromadzenia genów związanych z zapaleniem (mogących wpływać na proces zwapnienia zastawki). Podobny związek zaobserwowano w miażdżycy, gdzie warianty alleliczne genu *CRP* związane ze stężeniem CRP nie wykazały żadnego lub odwrócony (przypadek rs1205) związek z zawałem serca lub udarem niedokrwiennym mózgu, podczas gdy jeden z wariantów nie wpływający na stężenie CRP wpływał na ryzyko objawowej miażdżycy [3].

U pacjentów z miażdżycą wykazano również, że stężenie CRP może być regulowane przez polimorfizm receptora IL-6 (IL-6R) Asp358Ala (A>C; rs2228145) znajdujący się w eksonie 9 genu *IL-6R* na chromosomie 1q21. Polimorfizm ten wpływa na złuszczenie związanego z błoną IL-6R i powstanie jego rozpuszczalnej formy (sIL-6R), która poprzez interakcje z gp130 receptora zlokalizowaną na powierzchni komórek, może indukować przekazanie sygnału procesie trans-sygnalizacji. Obecność wariantu 358Ala wpływając na redukcję ilości związanego z błoną receptora może upośledzać klasyczną drogę sygnalizacji IL-6, a tym samym łagodzić procesy zapalne poprzez m.in. obniżenie stężenia CRP – co było

obserwowane u pacjentów z miażdżycą. W pracy: **Wypasek E, Potaczek DP, Lamplmayr M, Sadowski J, Undas A. Interleukin-6 receptor Asp358Ala gene polymorphism is associated with plasma C-reactive protein levels and severity of aortic valve stenosis. Clin Chem Lab Med. 2014;52:1049-56** po raz pierwszy pokazałam, że wśród chorych z ciężką AS, nosiciele allelu 358Ala charakteryzują się o 22% niższym stężeniem CRP w osoczu krwi dla każdej dziedziczonej kopii allelu, w porównaniu do pacjentów z wariantem dzikim [4]. Co ciekawe, obniżenie to było ok. trzykrotnie wyższe w porównaniu do pacjentów z chorobą wieńcową, gdzie sięgało 7% dla każdej kopii allelu. Ponadto, w porównaniu do typu dzikiego, posiadanie zmutowanego wariantu związane było z mniej zaawansowaną postacią AS, odzwierciedloną niższym gradientem przez zastawkowym i większą powierzchnią ujścia zastawki. Obecność allelu 358Ala i związane z nim osłabienie ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej może chronić przed zaawansowaną postacią AS [4]. Tym samym modulacja sygnalizacji IL6R może być nowym celem w zapobieganiu i leczeniu AS.

Podstawową metodą leczenia AS jest operacja wymiany zastawki, po której wymagana jest doustna antykoagulacja. Dużym problemem klinicznym jest stabilność antykoagulacji zależna w dużej mierze od czynników genetycznych, w tym SNP, które mogą modyfikować farmakokinetykę i farmakodynamikę leków przeciwkrzepliwych - antagonistów witaminy K (VKA, *vitamin K antagonist*). Pomimo rosnącego klinicznego zastosowania bezpośredniego inhibitora trombiny i czynnika Xa, głównie u pacjentów z niezastawkowym migotaniem przedsionków (AF, *atrial fibrillation*), VKA są ciągle stosowani w terapii przeciwzakrzepowej u pacjentów ze sztucznymi zastawkami serca. Najważniejsze polimorfizmy warunkujące nawet do 50% zmienności osobniczej w dawkowaniu VKA to polimorfizmy dwóch enzymów: bezpośrednio uczestniczącej w metabolizmie witaminy K podjednostki 1 reduktazy epoksydu witaminy K (VKORC1) i biorącego udział w biotransformacji pochodnych 4-hydroksykumaryny cytochromu P450 2C9 (CYP2C9). Haplotyp VKORC1\*2 z głównym SNP w regionie promotorowym -1639G>A (rs9923231) został zidentyfikowany jako marker zapotrzebowania na niższą dawkę warfaryny. Odpowiada on za mniejszą o około 50% ekspresję genu *VKORC1* w wyniku zmniejszonej transkrypcji mRNA, a w konsekwencji za mniejszą ilość enzymu, co z kolei wpływa na wielkość efektywnej dawki warfaryny. Z kolei, warianty alleliczne *CYP2C9*, *CYP2C9*\*2 (Arg144Cys, c.430C NT, rs1799853) i *CYP2C9*\*3 (Ile359Leu, c.1075A NC, rs1057910), kodują enzymy



o zmniejszonej aktywności, co prowadzi do potrzeby zmniejszenia podawanej dawki warfaryny odpowiednio o ok. 15-20% i 30-40% w stosunku do dawki przyjmowanej przez osoby z wariantem dzikim (CYP2C9\*1). Inne warianty, w tym polimorfizmy genów cytochromu P450 4 F2 (CYP4F2), apolipoproteiny E (APOE) i gamma-glutamyl karboksylazy (GGCX) wykazują mniejszy wpływ na dawkowanie VKA, ale ich rola nie została potwierdzona w badaniach replikacyjnych. Ze względu na brak pełnych i szczegółowych informacji o wpływie polimorfizmów warunkujących dawkowanie VKA w populacji polskiej postanowiłam zbadać ich rolę w terapii przeciwkrzepliwiej u pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (ŻChZZ) [5] i po wymianie zastawki aortalnej [6] pochodzących z terenów Europy Środkowo-Wschodniej. Mieszkańcy Europy Środkowo-Wschodniej to w większości Słowianie. Dowody archeologiczne, historyczne, jak i genetyczne pokazują, że region Małopolski, gdzie mieszkają nasi pacjenci nie przechodził żadnego znaczącego ruchu ludności przez ostatnie 300 lat. Ostatni napływ około 18 000 mieszkańców (3000 rodzin) z Niemiec miał miejsce pod koniec XVIII wieku ale dotyczył on tylko 1% mieszkańców Małopolski i nie miał wpływu na pulę genową tej populacji. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, moja praca: Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of CYP4F2 and GGCX polymorphisms. Thromb Res. 2014;134:604-9 jest pierwszym tak dużym badaniem analizującym wpływ polimorfizmów genetycznych, związanych z metabolizmem witaminy K, na dawkowanie VKA u Słowian. Stwierdziłam, że u chorych ze stabilną antykoagulacją posiadanie wariantu c.1297A genu CYP4F2 związane jest z zapotrzebowaniem na wyższą dawkę acenokumarolu i warfaryny (odpowiednio o około 9 i 7 mg/tydzień) w porównaniu do allelu c.1297GG [5]. CYP4F2 działa prawdopodobnie jako monooksydaza witaminy K, generując ω-hydroksywitaminę K. Polimorfizm genu CYP4F2 c.1297G>A powoduje utratę aktywności enzymatycznej CYP4F2, przez co nosiciele wariantu CYP4F2 c.1297A wykazują zmniejszoną zdolność metabolizowania witaminy K. Skutkuje to jej podwyższonym poziomem w wątrobie i tym samym potrzebą wyższej dawki VKA, w porównaniu do pacjentów z genotypem dzikim, aby osiągnąć ten sam efekt antykoagulacyjny. Wykazałam, że polimorfizm CYP4F2 c.1297G>A może wyjaśnić 18% zmienności dawki acenokumarolu u pacjentów słowiańskich, co jest zgodne z danymi pochodzącymi z Włoch i USA. Pojawiły się też poparte metaanalizami propozycje, by polimorfizm w genie CYP4F2 traktować jako trzeci najważniejszy czynnik genetyczny, obok VKORC1 i CYP2C9, wpływający

na dawkowanie VKA.

Zgodnie z oczekiwaniami, moje wyniki potwierdziły, iż posiadanie allelu genu *VKORC1* - 1639A jest związane z niższym zapotrzebowaniem na acenokumarol i warfarynę i wyjaśnia do 40% zmienności dawkowania VKA. Warianty *CYP2C9* były natomiast związane z niższą dawką warfaryny, lecz nie acenokumarolu. Częściowo można to wytłumaczyć farmakogenetyką tych dwóch leków. Acenokumarol i warfaryna to racemiczne mieszaniny równych ilości R- i S-enancjomerów. Warfaryna wywiera swoje działanie przeciwzakrzepowe w formie S, która jest metabolizowana w 90% przez *CYP2C9*. Z kolei w przypadku acenokumarolu, to R-enancjomer jest silniejszym antykoagulantem niż S-enancjomer. R-enancjomer acenokumarolu jest metabolizowany tylko w 50% przez *CYP2C9* – pozostałe 50% jest metabolizowane przez *CYP1A2* i *CYP2C19*. W moim badaniu zaobserwowałam także, że niższa wymagana dawka warfaryny związana jest z posiadaniem allelu *GGCX* c.2084+45G. Zdania na temat roli tego polimorfizmu w innych populacjach są niejednoznaczne [5].

Praktycznym wnioskiem z tego badania jest stwierdzenie, że przeprowadzenie genotypowania u poszczególnych pacjentów może pozwolić na taką indywidualizację dawkowania VKA, która zagwarantuje dużą stabilność antykoagulacji i znacznie ograniczy częstość występowania groźnych powikłań leczenia przeciwzakrzepowego.

Ze względu na to, że większość badań dotyczących wpływu genów na jakość antykoagulacji wykonywana była u pacjentów z AF i ŻChZZ, zdecydowałam się ocenić związek między wariantami allelicznymi genu *CYP2C9* a jakością antykoagulacji, mierzoną czasem, w którym INR mieści się w zakresie terapeutycznym (*therapeutic time range*, TTR) u pacjentów po wymianie zastawki aortalnej. Pomiar INR monitorowano u nich za pomocą 2 różnych sposobów: w poradni kardiologicznej i samodzielnie przez pacjenta w domu z użyciem aparatu Alere INRatio<sup>®</sup> 2 PT/INR Monitoring Systems, (ALERE<sup>™</sup>, San Diego, CA, USA).

W pracy: **Wypasek E, Cieśla M, Suder B, Janik Ł, Sadowski J, Undas A. CYP2C9 Polymorphism and Unstable Anticoagulation with Warfarin in Patients Within the First 3 Months Following Heart Valve Replacement. Adv Clin Exp Med. 2015;24:607-14** wykazałam, iż u pacjentów po planowej wymianie zastawki aortalnej, warianty alleliczne *CYP2C9*\*2 i/lub \*3 są związane z niższym zapotrzebowaniem na warfarynę i niższym TTR, w porównaniu do nosicieli *CYP2C9*\*1/\*1 w ciągu pierwszych 3 miesięcy leczenia przeciwkrzepliwego [6]. Jest to zgodne z wcześniejszymi raportami opublikowanymi głównie

dla chorych z AF i/lub ŻChZZ. Ponadto, u pacjentów z mutacjami w genie *CYP2C9* wykonywanie pomiarów INR samodzielnie nie pogorszyło jakości antykoagulacji w porównaniu do monitorowania INR w lokalnych poradniach. Co ważne, nasze badanie pokazuje podobny wpływ dwóch mutacji genu *CYP2C9* na jakość leczenia przeciwkrzepliwego u pacjentów po wymianie zastawki również w przypadku obecności wielu chorób współistniejących np. niewydolności serca, które mogą być postrzegane jako czynniki przyczyniające do dużych wahań wartości INR i TTR. Wykazałam, że posiadanie wariantu CYP2C9\*2 i/lub\*3 może zwiększyć ryzyko niestabilnej antykoagulacji warfaryną u pacjentów w pierwszych 3 miesiącach po wymianie zastawki serca, a genotypowanie wariantów genu CYP2C9 może poprawić rokowanie u tych chorych [6].

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

### 1. Mój dorobek naukowy obejmuje:

- a. 39 prac oryginalnych (9 publikacji jako 1-szy autor)
- b. 1 praca w czasopiśmie bez „impact factor”
- c. 4 opisy przypadków
- d. 2 prac poglądowych
- e. 9 listów do redakcji (7 jako pierwszy autor)
- f. 33 doniesień zjazdowych (19 ze zjazdów krajowych, 14 ze zjazdów międzynarodowych)

Całkowita punktacja wskaźników dokonań naukowych (nie zawierająca streszczeń, komentarzy redakcyjnych, publikacji pełno tekstowych w suplementach czasopism) wynosiła:

Impact factor = 94,629

KBN/MNiSz = 914

IC = 180,13

Liczba cytowań = 291

Indeks Hirscha = 9

2. **Badania w ramach doktoratu.** Moja praca doktorska dotyczyła zwierzęcego modelu zymosanowego zapalenia otrzewnej (*peritonitis*) modulowanego morfiną ze szczególnym uwzględnieniem roli komórek tucznych (mastocytów). Suplementacja

zymosanu wysoką dawką morfiny hamowała zapalenie jamy otrzewnej u większości szczepów myszy (w tym Swiss) ale nie u myszy CBA. Wykazałam, że zahamowanie bądź nasilenie *peritonitis* po dootrzewnowym podaniu morfiny zależało w dużej mierze od liczby komórek tucznych zarówno w jamie otrzewnej jak i w płamkach mlecznych, ich wrażliwości na degranulację i różnej zawartości mediatorów preformowanych w ziarnistościach mastocytów (m. in.  $TNF\alpha$ , mKC) [7]. U myszy CBA ale nie u Swiss, po dootrzewnowej iniekcji morfiny zaobserwowałam nasiloną degranulację komórek tucznych i gwałtowny wzrost ich liczby co w konsekwencji wywoływało nasilenie a nie osłabienie zapalenia. W pracy: **Wypasek E, Natorska J, Stankiewicz E, Kolaczkowska E. Morphine-Modulated Mast Cell Migration and Proliferation during Early Stages of Zymosan-Induced Peritonitis in CBA Mice. Folia Biol. 2011;59:99-106** pokazałam, że wzrost liczby komórek tucznych w ognisku zapalnym u myszy CBA może wynikać z indukowanej morfiną ich proliferacją i/lub migracją [8].

3. **W latach 2004-2006 odbyłam staż naukowy** jako postdoctoral researcher w **Ohio State University, Medical Centre**, Biomechanics and Tissue Engineering Laboratory, pod kierunkiem prof. Sudha Agarwal. Badałam udział sygnałów mechanicznych i zapalnych w aktywacji szlaków sygnalizacyjnych i ekspresji odpowiednich genów w reumatoidalnym zapaleniu stawów (m.in. kinaz Ras, MEK1/2, ERK1/2, genów *SOX-9*, *VEGF*, *Myc*). Badania były prowadzone na modelu *in vitro* (hodowla chondrocytów) i na modelu zwierzęcym (króliki). Pobyt ten zaowocował współautorstwem 5 publikacji [9-13] i 4 doniesień konferencyjnych.
4. Po powrocie do kraju w latach 2007-2010 byłam **kierownikiem** grantu: Interakcje receptorów opioidowych i Toll-podobnych; badania na liniach komórkowych oraz na mastocytach i makrofagach uczestniczących w zapaleniu otrzewnej myszy modulowanym morfiną (N N303 3569 33) co zaowocowało dwiema publikacjami [8, 14] i dwoma doniesieniami konferencyjnymi. Celem projektu była kontynuacja badań mechanizmów przeciwzapalnego działania morfiny poprzez wykazanie jej wpływu na ekspresję receptorów Toll-podobnych (TLR, *Toll-like receptor*) i czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B w komórkach (neutrofilach, makrofagach i mastocytach)

biorących udział w zapaleniu otrzewnej myszy oraz na modelowych liniach komórkowych (makrofagowej - RAW264.7 i mastocytowej - C57). U myszy Swiss, u których modulacja morfiną osłabiała odczyn zapalny zaobserwowałam, że dodanie morfiny do zymosanu istotnie obniżyło ekspresję receptorów TLR2 i NFκB we wszystkich badanych typach leukocytów na poziomie mRNA i białka jak również ekspresję genów dla cytokin prozapalnych. Poziom tlenku azotu (NO) w płynie otrzewnowym był istotnie podwyższony. Prawdopodobnie w wyniku osłabionej ekspresji receptorów TLR leukocyty rozpoznają mniej efektywnie antygeny prozapalne co z kolei powoduje osłabioną aktywację NFκB. Dodatkowo podwyższenie syntezy NO po iniekcji zymosanu z morfiną może przyczyniać się do zahamowania dysocjacji NFκB od jego inhibitora IκB i translokacji NFκB z cytoplazmy do jądra w mechanizmie zaproponowanym przez innych badaczy zaobserwowanym podczas infekcji bakteryjnych. Uzyskane przeze mnie wyniki częściowo wyjaśniały mechanizm przeciwzapalnego działania morfiny, która jest powszechnie stosowana jako środek przeciwbólowy i antyzapalny.

5. Od roku 2014 jestem **kierownikiem** grantu: Ekspresja białek układu krzepnięcia jako czynnik nasilający miejscowy stan zapalny, zaburzenia apoptozy i kalcyfikację w ludzkich zwężonych zastawkach aortalnych: wpływ czynników modyfikujących aktywność krzepnięcia. Celem projektu jest zbadanie czy inhibicja ekspresji białek układu krzepnięcia poprzez ich selektywne blokery (dabigatran, rywaroksaban, przeciwciała anti-TF) może prowadzić do zahamowania/spowolnienia procesów fibro-kalcyfikacji płatków zastawki aortalnej u ludzi.

Do tej pory opublikowałam jedna pracę [3] i 4 doniesienia zjazdowe z danych uzyskanych w projekcie.

Ponad to byłam wykonawcą w 5 grantach MNiSW i NCN oraz wielu projektach statutowych.

6. W roku 2014 odbyłam dwutygodniowy stażu naukowy w laboratorium genetycznym Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Belgia, pod kierunkiem prof. Paul Coucke i prof. Anne De Paepe gdzie zdobywałam doświadczenie z zakresu genetycznej diagnostyki zespołu Marfana i innych chorób tkanki łącznej. Pobyt ten

zaowocował ścisłą współpracą diagnostyczną i naukową z laboratorium genetycznym w Ghent. Dzięki tej współpracy jako pierwsza w Polsce opublikowałam opis dwóch przypadków mutacji będących przyczyną zespołu Marfana u polskich pacjentów [15].

7. Recenzowałam projekt badawczy: Odpowiedź mastocytów na stymulację syntetycznymi analogami genomów wirusowych (ligandy TLR3 i TLR7) w roku 2012 dla potrzeb NCN.
8. Brałam udział jako wykładowca w Małopolskiej Nocy Naukowców z ramienia Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II w roku 2013 i 2015.
9. Recenzowałam prace naukowe dla: Thrombosis and Haemostasis, Thrombosis Research, PlosOne, Pol Arch Med Wewn, Pharmacogenomics, Ann Am Thoracic Society.
10. Prowadzę staż z zakresu Podstaw Cytometrii Przepływowej dla diagnostów laboratoryjnych w ramach specjalizacji z Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej.
11. Posiadam pod opieką ok. 10 studentów/rok w ramach praktyk studenckich, wolontariatu i stażu z Urzędu Miasta. W ramach studiów doktoranckich w latach 1999-2004 prowadziłam ćwiczenia i seminaria w zakresie Immunologii Ewolucyjnej i Immunomorfologii. Obecnie prowadzę zajęcia z Diagnostyki Laboratoryjnej dla Obcokrajowców Wydziału Lekarskiego UJ CM (24 godziny/semestr).
12. Pracując w Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II zajęłam się m. in. diagnostyką wrodzonych stanów nadkrzepliwości związanych z niedoborem naturalnych antykoagulantów: białka C (PC, *protein C*), białka S (PS, *protein S*) i antytrombiny co zaowocowało licznymi publikacjami. Po raz pierwszy opisałam przypadek niezwyklej manifestacji klinicznej genetycznego niedoboru PC w wyniku mutacji c.109G>C (p.109G>R) w postaci zawału serca z uniesieniem odcinka ST u 28-letniego mężczyzny [16]. Przypadek ten zwraca uwagę na to, że wrodzony niedobór PC może predysponować nie tylko do zakrzepicy żyłnej, ale także tętniczej dlatego badania przesiewowe w kierunku dziedzicznej trombofilii, powinny zostać

przeprowadzone u młodych pacjentów po zawale, u których nie obserwuje się istotnych zwężeń tętnicy wieńcowej. Opisałam również nie opublikowaną do tej pory nową mutację w genie *PROC* 106T>C (C106R) u młodego mężczyzny z ŻChZZ [17]. Molekularne podłoże niedoboru PS opisałam u 5 polskich pacjentów, z czego trzy mutacje w genie *PROSI* to mutacje nowe [18-19]. Dwie z nich opisałam u dwóch rodzin z niedoborem PS manifestującym się ŻChZZ, której członkowie wykazywali oporność na przeciwzakrzepowy efekt rywaroksabanu, doustnego bezpośredniego inhibitora czynnika Xa [18]. Może to sugerować, że u pacjentów z ŻChZZ i znacznym niedoborem PS (<20%) leczenie inhibitorami czynnika Xa może być nieskuteczne i należy wziąć pod uwagę inne leki. Trzecia nowa mutacja to wykryta techniką MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) to delecja egzonów 1-12 genu *PROSI* [19]. MLPA pozwala na detekcję dużych rearanżacji genomowych w tym delecji i amplifikacji o wskazuje na to, że technika MLPA może być cennym narzędziem umożliwiającym diagnozę wrodzonej trombofilii, w przypadkach gdy metodą bezpośredniego sekwencjonowania nie udało się znaleźć mutacji punktowych [19]. Opisałam również dwa pierwsze w Polsce przypadki polimorfizmu Heerlen (501S>P) w genie *PROSI*, jeden u 45-letniego mężczyzny z zawałem serca wcześniej cierpiącego na ŻChZZ [20] a drugi, prawdopodobnie pierwszy na świecie przypadek opisujący współistnienie trzech czynników predysponujących do zakrzepicy: niedoboru PS, mutacji czynnika V Leiden i zespołu antyfosfolipidowego w połączeniu z pozytywnym wywiadem rodzinnym [21].

Byłam również współautorką dwóch prac dotyczących niedoboru antytrombiny u polskich pacjentów z ŻChZZ i współautorką posteru: „Identyfikacja i charakterystyka nowego mechanizmu zakrzepicy: recesywny niedobór antytrombiny lub przejściowy spowodowany hipoglikozylacją”, prezentowanego na sesji plenarnej XXXI Kongresu Hiszpańskiego Towarzystwa Zakrzepicy i Hemostazy w Valencji, w październiku 2015, który zdobył nagrodę dla najlepszego posteru kongresu.

13. Koordynuję współpracę z ośrodkami z zagranicy (m.in. Paryż, Murcia, Genewa, Gandawa, Rzym) w ramach diagnostyki genetycznej chorób sercowo-naczyniowych.

## Literatura

1. **Wypasek E**, Undas A, Sniezek-Maciejewska M, Kapelak B, Plicner D, Stepień E, Sadowski J. The increased plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery are associated with the interleukin-6-174G > C gene polymorphism. *Ann Clin Biochem.* 2010;47:343-9.
2. **Wypasek E**, Stepień 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.
3. **Wypasek E**, Potaczek DP, Undas A. Association of the C-Reactive Protein Gene (CRP) rs1205 C>T Polymorphism with Aortic Valve Calcification in Patients with Aortic Stenosis. *Int J Mol Sci.* 2015;16:23745-59.
4. **Wypasek E**, Potaczek DP, Lamplmayr M, Sadowski J, Undas A. Interleukin-6 receptor Asp358Ala gene polymorphism is associated with plasma C-reactive protein levels and severity of aortic valve stenosis. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52:1049-56.
5. **Wypasek E**, Branicka A, Awiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of CYP4F2 and GGCC polymorphisms. *Thromb Res.* 2014;134:604-9.
6. **Wypasek E**, Cieśla M, Suder B, Janik Ł, Sadowski J, Undas A. CYP2C9 Polymorphism and Unstable Anticoagulation with Warfarin in Patients Within the First 3 Months Following Heart Valve Replacement. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24:607-14.
7. Stankiewicz E, **Wypasek E**, Plytycz B. Mast cells are responsible for the lack of anti-inflammatory effects of morphine in CBA mice. *Mediators Inflamm.* 2004;13:365-8.
8. **Wypasek E**, Natorska J, Stankiewicz E, Kołaczowska E. Morphine-modulated mast cell migration and proliferation during early stages of zymosan-induced peritonitis in CBA mice. *Folia Biol (Krakow).* 2011;59:99-106.
9. Perera PM, **Wypasek E**, Madhavan S, Rath-Deschner B, Liu J, Nam J, Rath B, Huang Y, Deschner J, Piesco N, Wu C, Agarwal S. Mechanical signals control SOX-9, VEGF, and c-Myc expression and cell proliferation during inflammation via integrin-linked kinase, B-Raf, and ERK1/2-dependent signaling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R106.
10. Deschner J, Rath-Deschner B, **Wypasek E**, Anghelina M, Sjöstrom D, Agarwal S. Biomechanical strain regulates TNFR2 but not TNFR1 in TMJ cells. *J Biomech.* 2007;40:1541-9.
11. Madhavan S, Anghelina M, Rath-Deschner B, **Wypasek E**, John A, Deschner J, Piesco N, Agarwal S. Biomechanical signals exert sustained attenuation of proinflammatory gene induction in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:1023-32.
12. Ferretti M, Madhavan S, Deschner J, Rath-Deschner B, **Wypasek E**, Agarwal S. Dynamic biophysical strain modulates proinflammatory gene induction in meniscal fibrochondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1610-5.
13. Deschner J, **Wypasek E**, Ferretti M, Rath B, Anghelina M, Agarwal S. Regulation of RANKL by biomechanical loading in fibrochondrocytes of meniscus. *J Biomech.* 2006;39:1796-803.
14. **Wypasek E**, Natorska J, Mazur AI, Kołaczowska E. Toll-like receptors expression and NF-κB activation in peritoneal leukocytes in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in swiss mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60:373-82.
15. **Wypasek E**, Potaczek DP, Stapor R, Coucke PJ, De Backer J, De Paepe AM, Undas A. First report of the genetic background of Marfan syndrome in Polish patients. *Pol Arch Med Wewn.* 2013;123:646-7.
16. **Wypasek E**, Pankiw-Bembenek O, Potaczek DP, Alhenc-Gelas M, Trebacz J, Undas A. A missense mutation G109R in the PROC gene associated with type I protein C deficiency in a young Polish man with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013;167:e146-8.
17. **Wypasek E**, Potaczek DP, Alhenc-Gelas M, Undas A. Novel missense mutation C106R in the PROC gene associated with type I protein C deficiency in a young Polish man with high-risk pulmonary embolism. *Pol Arch Med Wewn.* 2014;124:75-6.
18. **Wypasek E**, Potaczek DP, Alhenc-Gelas M, Undas A. PROS1 mutations associated with protein S deficiency in Polish patients with residual vein obstruction on rivaroxaban therapy. *Thromb Res.* 2014;134:199-201.
19. **Wypasek E**, Alhenc-Gelas M, Undas A. First report of a large PROS1 deletion from exon 1 through 12 detected in Polish patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res.* 2013;132:143-4.



20. **Wypasek E**, Potaczek DP, Płonka J, Alhenc-Gelas M, Undas A. Protein S deficiency and Heerlen polymorphism in a Polish patient with acute myocardial infarction and previous venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2013;132:776-7.

21. **Wypasek E**, Potaczek DP, Alhenc-Gelas M, Undas A. Heerlen polymorphism associated with type III protein S deficiency and factor V Leiden mutation in a Polish patient with deep vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25:84-5.

*Ewa Wypasek*