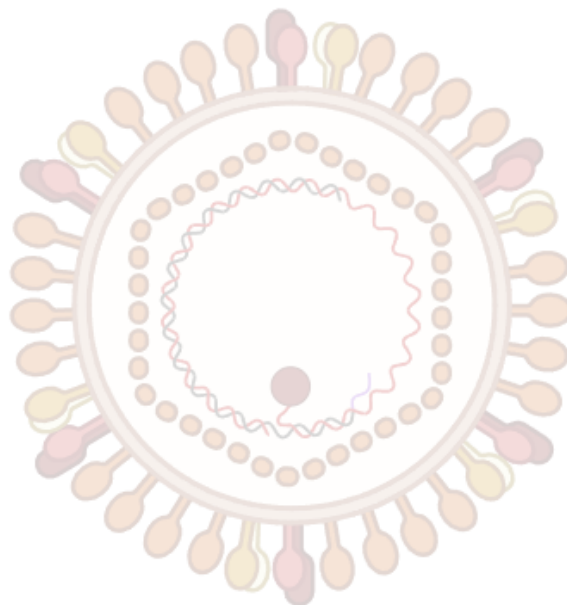


# Autoreferat

**Dr Magda Rybicka-Misiejko**



**Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**Gdańsk, 2025**

**1. Imię i nazwisko.**

Magda Rybicka-Misiejko, <https://orcid.org/0000-0003-3768-3514>

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

- **Stopień doktora** nauk biologicznych w zakresie biochemii nadany przez Uniwersytet Gdański, 2015 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza wpływu zmienności genetycznej wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV) na przebieg terapii przeciwwirusowej”. Praca wykonana pod opieką prof. dr hab. Krzysztofa Piotra Bielawskiego i dr n. med. Piotra Brunona Stalke (promotor pomocniczy) .
- **Stopień magistra** nadany przez Uniwersytet Gdański, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, kierunek biotechnologia, 2009 r. Tytuł pracy: „Badanie odpowiedzi gospodarza na obecność bakterii z rodzaju *Helicobacter* w wątrobie pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby w populacji Polski Północnej”. Promotor: dr hab. Joanna Nakonieczna, prof. UG.
- **Stopień licencjata** nadany przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy; kierunek biotechnologia medyczna, 2007 r. Tytuł pracy: „Rola receptora muskarynowego M3 w regulacji mięśniówki gładkiej dna żołądka”. Promotor: prof. dr hab. n. med. Leszek Szadujkis-Szadurski.

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.**

- **od 2021 – obecnie** – adiunkt naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej, MWB UG i GUMed
- **2018-2021** – pracownik naukowo-techniczny w Zespole Laboratoriów Specjalistycznych, MWB UG i GUMed
- **2015-2017** – pracownik naukowy/post-doc w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej, MWB UG i GUMed
- **2014-2015** – pracownik naukowy/asystent w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej, MWB UG i GUMed

#### 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Jako moje główne osiągnięcie naukowe na potrzeby postępowania habilitacyjnego wskazuję cykl ośmiu powiązanych tematycznie publikacji, w tym 6 doświadczalnych. Prace te dotyczą **wpływu czynników genetycznych i molekularnych na przebieg przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) oraz jego diagnostykę**. W większości publikacji (z wyjątkiem jednej) pełniłam rolę autora wiodącego lub korespondencyjnego, co podkreśla mój znaczący wkład w realizację badań i opracowanie wyników. Żadna z publikacji ujętych w cyklu nie została wcześniej wykorzystana w postępowaniu o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego. Pozostałe osiągnięcia naukowe z okresu po uzyskaniu stopnia doktora omówiłam w **punktach 4.4 oraz 4.5 niniejszego dokumentu**.

##### 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Identyfikacja czynników wirusowych oraz genetycznych uwarunkowań gospodarza w kontekście przebiegu i leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B.

##### 4.2 Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

Współczynnik IF (Impact factor) oraz punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) są zgodne z rokiem ukazania się prac, przy czym system punktacji ministerialnej ewoluował w czasie, wpływając na ocenę prac z różnych okresów.

##### **PUBLIKACJA 1**

*Current molecular methods for the detection of hepatitis B virus quasispecies.*

**Rybicka M\***, Stalke P, Bielawski KP.

Reviews in Medical Virology 2016 Sep;26(5):369-81. doi: [10.1002/rmv.1897](https://doi.org/10.1002/rmv.1897)

\*autor korespondencyjny

IF<sub>2016</sub>=5,439; MEiN<sub>2016</sub>=45

Praca poglądowa

Mój wkład w publikację obejmował:

- sformułowanie koncepcji oraz konspektu pracy
- wykonanie przeglądu i doboru literatury
- przygotowanie pierwotnej wersji artykułu (w tym tabel oraz rycin)
- wprowadzenie poprawek manuskryptu po otrzymaniu recenzji z czasopisma
- przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz korespondencja z edytorem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

**PUBLIKACJA 2**

*Differences in sequences between HBV-relaxed circular DNA and covalently closed circular DNA.*

**Rybicka M**, Woziwodzka A, Romanowski T, Stalke P, Dręczewski M, Bielawski KP

Emerging Microbes and Infection 2017 Jun 21;6(6):e55. doi: [10.1038/emi.2017.41](https://doi.org/10.1038/emi.2017.41)

IF<sub>2017</sub>=6,032; MEiN<sub>2017</sub>=30

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- opracowanie hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- udział w opracowaniu i optymalizacji metodyki badań
- udział we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach począwszy od izolacji materiału genetycznego wirusa HBV aż do wykrywania wariantów lekoopornych HBV
- udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników
- przeprowadzenie wszystkich analiz statystycznych
- przygotowanie pierwotnej wersji manuskryptu wraz tabelami i rycinami
- pełnienie wiodącej roli w przygotowaniu odpowiedzi na zarzuty recenzentów oraz wprowadzeniu poprawek do ostatecznie przyjętej wersji pracy
- zdobyciu finansowania na część przeprowadzonych badań

**PUBLIKACJA 3**

*Host genetic background affects the course of infection and treatment response in patients with chronic hepatitis B.*

**Rybicka M\***, Woziwodzka A\*, Romanowski T, Sznarkowska A, Stalke P, Dręczewski M, Bielawski KP.

Journal of Clinical Virology 2019 Nov;120:1-5. doi: [0.1016/j.jcv.2019.09.002](https://doi.org/0.1016/j.jcv.2019.09.002)

\*równy wkład autorów

IF<sub>2019</sub>=2,777; MEiN<sub>2019</sub>=100

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w tworzeniu hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- udział w opracowaniu i optymalizacji metodyki badań
- udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów
- udział w zbieraniu materiału do badań
- tworzenie kliniczno-patologicznej bazy danych chorych
- udział w interpretacji wyników oraz ich wizualizacji
- przeprowadzenie analiz statystycznych uzyskanych wyników
- wiodący udział w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu
- aktywny udział w odpowiadaniu na zarzuty recenzentów oraz wprowadzanie wymaganych poprawek do wersji ostatecznej

**PUBLIKACJA 4**

*TNF- $\alpha$  polymorphisms affect persistence and progression of HBV infection.*

Woziwodzka A, **Rybicka M**, Sznarkowska A, Romanowski T, Dręczewski M, Stalke P, Bielawski KP.

Molecular Genetics & Genomic Medicine 2019 Oct;7(10):e00935. doi: [10.1002/mgg3.935](https://doi.org/10.1002/mgg3.935)

IF<sub>2019</sub>=1,995; MEiN<sub>2019</sub>=70

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- udział w tworzeniu hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- udział w opracowaniu i optymalizacji metodyki badań
- udział w przeprowadzeniu eksperymentów (tj. izolacja DNA, genotypowanie pacjentów)
- udział w analizie i interpretacji wyników
- udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu oraz wprowadzanie poprawek do manuskryptu w trakcie recenzji

**PUBLIKACJA 5**

*Genetic variation in IL-10 influences the progression of hepatitis B infection.*

**Rybicka M\***, Woziwodzka A, Sznarkowska A, Romanowski T, Stalke P, Dręczewski M, Verrier ER, Baumert TF, Bielawski KP\*.

International Journal of Infectious Diseases 2020 Jul;96:260-265. doi: [10.1016/j.ijid.2020.04.079](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.079)

\*współautorstwo korespondencyjne

IF=3,623; MEiN=100

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- opracowanie hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- opracowanie i optymalizacja metodyki badań
- udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów
- udział w zbieraniu materiału do badań
- tworzenie kliniczno-patologicznej bazy danych chorych
- interpretacja wyników oraz ich wizualizacja
- przeprowadzenie analiz statystycznych uzyskanych wyników
- przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, w tym tabel i rycin
- wprowadzenie poprawek manuskryptu po otrzymaniu recenzji z czasopisma
- przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz korespondencja z edytorem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

**PUBLIKACJA 6**

*Recent Advances in Understanding, Diagnosing, and Treating Hepatitis B Virus Infection.*

**Rybicka M\***, Bielawski KP.

Microorganisms 2020 Sep 15;8(9):1416. doi: [10.3390/microorganisms8091416](https://doi.org/10.3390/microorganisms8091416)

\*autor korespondencyjny

IF=4,128; MEiN=40

Praca poglądowa

Mój wkład w publikację obejmował:

- sformułowanie koncepcji oraz konspektu pracy
- wykonanie przeglądu i doboru literatury
- przygotowanie pierwotnej wersji artykułu (w tym tabel oraz rycin)
- wprowadzenie poprawek manuskryptu po otrzymaniu recenzji z czasopisma
- przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz korespondencja z edytorem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

**PUBLIKACJA 7**

*Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients Is Associated with Genetic Variations in DNA Repair Pathway Genes.*

**Rybicka M\***, Woziwodzka A, Sznarkowska A, Romanowski T, Stalke P, Dręczewski M, Verrier ER, Baumert TF, Bielawski KP\*.

Cancers (Basel). 2020 Nov 7;12(11):3295. doi: [10.3390/cancers12113295](https://doi.org/10.3390/cancers12113295)

\*współautorstwo korespondencyjne

IF=6,639; MEiN=140

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- opracowanie hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- opracowanie i optymalizacja metodyki badań
- wiodący udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów
- wiodący udział w zbieraniu materiału do badań
- tworzenie kliniczno-patologicznej bazy danych chorych
- interpretacja wyników oraz ich wizualizacja
- przeprowadzenie analiz statystycznych uzyskanych wyników
- przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, w tym tabel i rycin
- wprowadzenie poprawek manuskryptu po otrzymaniu recenzji z czasopisma
- przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz korespondencja z edytorem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

**PUBLIKACJA 8**

*Polymorphisms within DIO2 and GADD45A genes increase the risk of liver disease progression in chronic hepatitis b carriers.*

**Rybicka M\***, Verrier ER, Baumert TF, Bielawski KP.

Scientific Reports 2023 Apr 14;13(1):6124. doi: [10.1038/s41598-023-32753-8](https://doi.org/10.1038/s41598-023-32753-8)

\*autor korespondencyjny

IF=3,8; MEiN=140

Praca oryginalna

Mój wkład w publikację obejmował:

- zaproponowanie hipotezy badawczej i koncepcji pracy
- opracowanie i optymalizacja metodyki badań
- wiodący udział w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów
- wiodący udział w zbieraniu materiału do badań
- tworzenie kliniczno-patologicznej bazy danych chorych
- interpretacja uzyskanych wyników oraz ich wizualizacja
- przeprowadzenie analiz statystycznych uzyskanych wyników
- przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu, w tym tabel i rycin
- wprowadzenie poprawek manuskryptu po otrzymaniu recenzji z czasopisma
- przygotowanie odpowiedzi dla recenzentów oraz korespondencja z edytorem
- pełnienie funkcji autora korespondencyjnego

Dane naukometryczne ośmiu prac wchodzących w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego:

Sumaryczny IF publikacji: 34,433

Sumaryczna liczba punktów MEiN według wykazu z roku publikacji: 665

Sumaryczny IF5-letni (2024): 37,2

Aktualna sumaryczna liczba punktów MEiN (2025): 830

### **4.3 Omówienie celu naukowego prac wymienionych w pkt. 4.2 oraz otrzymanych wyników.**

#### **Wprowadzenie**

Zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (ang. hepatitis B virus, HBV) stanowią globalny problem zdrowotny, dotyczący około 296 milionów osób z przewlekłym zakażeniem. Szacuje się, że nawet 2 miliardy ludzi miało kontakt z wirusem, co oznacza, że niemal co czwarta osoba na świecie została narażona na infekcję. W krajach Unii Europejskiej (UE) oraz Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EEA) w 2022 roku zgłoszono 28 855 nowych przypadków zakażeń HBV, z czego większość dotyczyła przewlekłych infekcji. Szacuje się, że około 3,6 miliona osób w tym regionie żyje z

przewlekłym zakażeniem HBV, co powoduje około 64 000 zgonów rocznie. Globalnie HBV powoduje około 820 000 zgonów każdego roku, a prognozy wskazują na 39% wzrost tej liczby do roku 2030 (1,2).

Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW typu B) rozwija się u 5-10% zakażonych dorosłych, ale aż u 90% nowo zakażonych niemowląt z powodu niedojrzałego układu immunologicznego. Kluczowe powikłania zakażenia HBV obejmują marskość wątroby, która rozwija się u 20-30% osób z przewlekłą postacią infekcji, prowadząc do 331 000 zgonów rocznie. Innym ważnym powikłaniem jest rak wątrobowokomórkowy (ang. hepatocellular carcinoma, HCC), który odpowiada za 57% wszystkich przypadków HCC na świecie. Ryzyko rozwoju HCC u osób z przewlekłym zakażeniem HBV jest 10–100 razy wyższe w porównaniu do osób zdrowych, zwłaszcza przy współistniejącej marskości. Do głównych czynników ryzyka zwiększających częstość powikłań należy współzakażenie wirusem zapalenia wątroby typu D (ang. hepatitis D virus, HDV), które 4–5-krotnie zwiększa ryzyko marskości i HCC w porównaniu do monoinfekcji HBV. W 2019 r. odnotowano 192 000 zgonów z powodu HBV-pochodnego HCC. Ponadto, HBV może prowadzić do niewydolności wątroby, zarówno ostrej (rzadko), jak i przewlekłej, będącej konsekwencją postępującego włóknienia (1–3).

Pomimo istnienia skutecznej szczepionki, która stanowi podstawową metodę zapobiegania WZW typu B, walka z tą chorobą napotyka szereg poważnych wyzwań. Jednym z głównych problemów jest niedostateczna profilaktyka. Okazuje się bowiem, że jedynie około 46% noworodków na świecie otrzymuje pierwszą dawkę szczepionki w ciągu pierwszych 24 godzin po urodzeniu. Jest to szczególnie niepokojące w regionach o wysokiej endemiczności, takich jak Azja Południowo-Wschodnia i Afryka Subsaharyjska. Niskie globalne pokrycie szczepieniami przeciwko HBV stanowi istotną przeszkodę w skutecznej kontroli choroby. Wiele krajów nie osiąga zalecanego przez Światową Organizację Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO) poziomu 95% pokrycia, który jest kluczowy dla efektywnego zapobiegania rozprzestrzenianiu się zakażenia. Jednym z istotnych czynników wpływających na niski poziom wyszczepienia jest dezinformacja na temat szczepień. Brak rzetelnej wiedzy na temat korzyści płynących ze szczepień oraz niezrozumienie mechanizmu ich działania sprzyja niechęci wobec szczepień, zarówno wśród społeczeństwa, jak i niekiedy wśród pracowników ochrony zdrowia. Dodatkowo, w niektórych krajach system ochrony zdrowia jest słabo zorganizowany, co utrudnia dostęp do szczepionek oraz innych niezbędnych usług medycznych. Ograniczone finansowanie programów szczepień w wielu regionach również stanowi poważną barierę w osiągnięciu wysokiego poziomu wyszczepienia. Dodatkowym problemem jest brak dostępu do immunoglobuliny anti-HBs (skierowanej przeciwko antygenowi powierzchniowemu HBV) w niektórych regionach, zwłaszcza w krajach rozwijających się. Immunoglobulina ta jest istotnym elementem w zapobieganiu transmisji HBV, a jej brak powoduje, że noworodki urodzone przez matki zakażone wirusem HBV są bardziej narażone na infekcję (1–4).

Kolejny istotny problem stanowi niski dostęp do skutecznej diagnostyki zakażenia HBV. Wczesne rozpoznanie zakażenia HBV jest kluczowe dla zapobiegania powikłaniom, takim jak marskość i HCC. Niestety, tylko 14% zakażonych ma postawioną diagnozę, co oznacza, że większość przypadków pozostaje nierozpoznana. Przyczyną tego stanu rzeczy jest często brak objawów w ostrej fazie zakażenia oraz ograniczony dostęp do badań diagnostycznych. Diagnostyka zakażenia HBV opiera się na badaniach serologicznych (Tabela 1), takich jak wykrywanie obecności antygenu powierzchniowego wirusa (HBsAg), oraz badaniach molekularnych, które pozwalają na oznaczenie poziomu HBV DNA we krwi. Coraz częściej stosuje się także szybkie testy immunochromatograficzne umożliwiające wykrycie antygenu HBsAg w krótkim czasie, co może przyczynić się do zwiększenia wykrywalności zakażeń. Pomimo postępu technologicznego w dziedzinie diagnostyki, dostęp do leczenia HBV nadal pozostaje ograniczony. Szacuje się, że mniej niż 10% zakażonych otrzymuje odpowiednią terapię, co stanowi poważny problem, zwłaszcza w krajach rozwijających się (5–7).

**Tabela 1.** Najważniejsze markery HBV i ich znaczenie kliniczne.

Marker	Znaczenie kliniczne
<b>HBsAg</b>	Antygen powierzchniowy HBV. Jego obecność świadczy o ostrym lub przewlekłym zakażeniu HBV. Jest jednym z pierwszych markerów pojawiających się po zakażeniu i utrzymuje się przez cały okres aktywnej infekcji. Utrzymywanie się HBsAg >6 miesięcy oznacza przewlekłe zakażenie.
<b>HBeAg</b>	Wydzielniczy antygen „e” HBV. Marker intensywnej replikacji wirusa i wysokiej zakaźności. Jego obecność wskazuje na aktywną fazę choroby i duże ryzyko transmisji HBV. Utrzymywanie się HBeAg >3 miesięcy sugeruje przejście w fazę przewlekłą.
<b>anty-HBc IgM</b>	Przeciwciała przeciwko antygenowi rdzeniowemu HBV w klasie IgM. Pojawiają się wczesnie w ostrej fazie zakażenia, utrzymują się ok. 6 miesięcy. Obecność wskazuje na świeże, ostre zakażenie.
<b>anty-HBc total</b>	Przeciwciała przeciwko antygenowi rdzeniowemu HBV (IgM + IgG). Marker kontaktu z HBV w przeszłości lub aktualnej infekcji. IgG utrzymuje się przez całe życie.
<b>anty-HBe</b>	Przeciwciała przeciwko antygenowi HBe. Ich pojawienie się świadczy o wygaszaniu replikacji wirusa i przechodzeniu zakażenia w mniej zakaźną fazę. W przewlekłej infekcji obecność anty-HBe zwykle oznacza mniejszą aktywność wirusa.
<b>anty-HBs</b>	Przeciwciała przeciwko antygenowi powierzchniowemu HBV. Ich obecność świadczy o odporności na HBV (po szczepieniu lub po przebyciu zakażenia).
<b>HBV-DNA</b>	Materiał genetyczny wirusa. Najwcześniejszy marker zakażenia, pozwala ocenić ilościowo aktywność replikacji wirusa i monitorować skuteczność leczenia.

Terapia przewlekłego WZW typu B obejmuje kilka kluczowych strategii leczniczych, które mają na celu zahamowanie replikacji wirusa i poprawę stanu zdrowia pacjenta. Jednym z leków stosowanych w leczeniu HBV jest pegylowany interferon- $\alpha$ 2a (Peg IFN  $\alpha$ 2a), który jest cytokiną modulującą odpowiedź immunologiczną organizmu. Kolejną grupą leków są nukleozydowe i nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI), spośród których w praktyce klinicznej

stosuje się lamiwudynę, telbivudynę i entecavir (analogi nukleozydów) oraz adefowir i tenofowir (analogi nukleotydów). Leki te skutecznie hamują replikację wirusa, zmniejszając ryzyko rozwoju marskości i raka wątrobowokomórkowego. Niestety długotrwała terapia z użyciem NRTI prowadzi do selekcji szczepów lekoopornych i utraty efektu terapeutycznego, co u pacjentów z niewydolnością wątroby prowadzić może do uszkodzenia tego narządu, a nawet śmierci. Ponadto mutacje warunkujące lekooporność mogą występować u pacjentów uprzednio nigdy nieleczonych. Skuteczną alternatywą dla terapii analogami jest leczenie wcześniej wspomnianym interferonem, które nie powoduje powstawania zjawiska lekooporności. Niestety z powodu licznych działań ubocznych i przeciwwskazań nie u każdego pacjenta może być stosowane. Pomimo wielu zalet terapii pożądanym efektem końcowym jest zależny od genotypu wirusa i uzyskuje się go jedynie u około 30-40% pacjentów. Przyczyną braku skuteczności leczenia, w przeciwieństwie do NRTI nie jest pojawienie się oporności wirusa na lek, a najpewniej interakcja wirusa i komórek układu odpornościowego. Dokładna przyczyna niepowodzenia terapii interferonem nie została jak dotąd poznana. Pomimo odmiennych mechanizmów działania, żaden z dostępnych obecnie leków nie jest w stanie skutecznie wyeliminować wirusa, ponieważ nie wpływa znacząco na kowalencyjnie zamknięty kolisty DNA (cccDNA) – kluczowy rezerwuuar replikacyjny HBV, który umożliwia produkcję nowych cząstek wirusowych. Nawet niewielka liczba kopii cccDNA w hepatocytach może prowadzić do reaktywacji zakażenia po zaprzestaniu leczenia lub osłabieniu kontroli immunologicznej. Z tego powodu całkowite wyleczenie przewlekłego WZW typu B wymaga eliminacji cccDNA. Ze względu na niedostateczną wiedzę dotyczącą cyklu replikacyjnego HBV, która wynika z braku idealnego modelu eksperymentalnego, znalezienie optymalnego schematu terapeutycznego nadal pozostaje dużym wyzwaniem klinicznym (8–11).

Aktualnie trwają badania nad nowymi lekami, które mogą działać na stabilną formę cccDNA lub uniemożliwiać penetrację wirusa do komórek hepatocytów. Niedawne odkrycie białka NTCP (ang. sodium taurocholate cotransporting polypeptide) jako głównego receptora umożliwiającego wnikanie HBV do hepatocytów, a także poznanie roli enzymów naprawczych gospodarza w procesie replikacji wirusa, mogą pomóc w opracowaniu bardziej skutecznych strategii leczniczych. Wytyczne European Association for the Study of the Liver (EASL) z 2022 roku dotyczące leczenia przewlekłego zakażenia HBV obejmują zalecenia dotyczące stosowania interferonów i NRTI. Raporty WHO z 2024 roku podkreślają wagę wczesnej diagnostyki i leczenia w zapobieganiu powikłaniom HBV (9,12–16).

### **Omówienie celu naukowego cyklu prac oraz uzyskanych wyników**

Celem naukowym przedstawionego cyklu publikacji było znalezienie czynników wirusowych oraz genetycznych uwarunkowań gospodarza, które determinują przebieg kliniczny i odpowiedź na leczenie w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu B (WZW typu B). Badania oparto na zastosowaniu czułych i nowoczesnych metod molekularnych, umożliwiających precyzyjną analizę genomu HBV,

w tym jego postaci cccDNA, oraz wybranych regionów genomu człowieka. W szczególności prace miały na celu:

1. **Charakterystykę molekularną genomu HBV**, ze szczególnym uwzględnieniem różnic w sekwencjach formy zrelaksowanej (rcDNA) i kowalencyjnie zamkniętej kolistej formy DNA (cccDNA), która stanowi trwały rezerwuuar wirusa i jest główną przeszkodą w całkowitej eliminacji zakażenia. (Publikacja 1, Publikacja 2)
2. **Identyfikację i charakterystykę genetycznych uwarunkowań gospodarza, wpływających na naturalny przebieg zakażenia HBV, ryzyko progresji choroby oraz skuteczność terapii.**  
Badania objęły analizę:
  - genów kodujących białka zaangażowane w kluczowe etapy cyklu życiowego wirusa (Publikacja 3, Publikacja 6)
  - genów regulujących odpowiedź immunologiczną (Publikacja 4, Publikacja 5)
  - genów uczestniczących w naprawie uszkodzeń DNA (Publikacja 7)
  - genów zaangażowanych w regulację odpowiedzi komórkowej i adaptacyjnej (Publikacja 8)
3. **Zintegrowanie danych molekularnych wirusa i gospodarza z informacjami kliniczno-patologicznymi** w celu identyfikacji markerów prognostycznych i predykcyjnych, możliwych do wykorzystania w praktyce klinicznej. (Publikacje: 2,3,4,5,7,8)
4. **Opracowanie i optymalizację czułych narzędzi badawczych**, umożliwiających precyzyjną analizę sekwencji cccDNA, analizę polimorfizmów genetycznych gospodarza oraz integrację wyników przy użyciu nowoczesnych metod bioinformatycznych i statystycznych. (Publikacje: 2,3,4,5,7,8)

Przedstawiony cykl publikacji obejmował badania podstawowe i translacyjne, których wyniki mogą znaleźć zastosowanie w personalizacji leczenia, prognozowaniu przebiegu choroby oraz rozwoju nowych strategii terapeutycznych integrujących informacje o czynnikach genetycznych zarówno wirusa, jak i gospodarza.

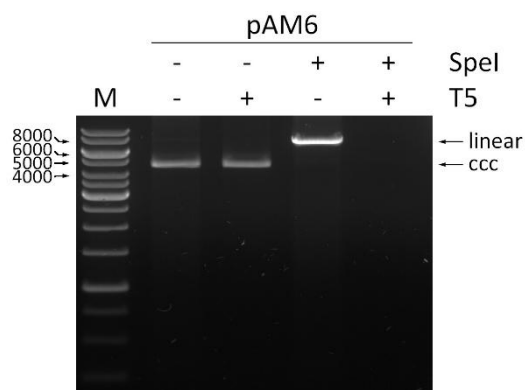
W ramach pierwszego etapu badań, skupiono się na przeglądzie i ocenie współczesnych metod diagnostycznych stosowanych do wykrywania wirusa HBV. Publikacja 1, („**Current molecular methods for the detection of hepatitis B virus quasispecies**”, *Reviews in Medical Virology* 2016), stanowi

kompleksową analizę dostępnych metod molekularnych stosowanych do wykrywania i charakterystyki zróżnicowania quasi-gatunków HBV oraz wariantów opornych na leczenie. Artykuł omawia zarówno klasyczne techniki (sekwencjonowanie bezpośrednie, polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP, polimorfizm konformacji pojedynczej nici – SSCP, techniki hybrydizacyjne), jak i zaawansowane technologie o wysokiej czułości, takie jak spektrometria mas typu MALDI-TOF, analiza topnienia o wysokiej rozdzielczości (HRM) oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Szczególna uwaga została poświęcona wykrywaniu tzw. wariantów mniejszościowych (<5% populacji wirusa), które są często niewidoczne w standardowych testach diagnostycznych, a mogą odpowiadać za niepowodzenie terapii i rozwój oporności. Omówiono zalety i ograniczenia każdej z metod w kontekście ich czułości, kosztów, powtarzalności i możliwości zastosowania w diagnostyce klinicznej. W publikacji podkreślono również potrzebę wprowadzenia zaawansowanych narzędzi diagnostycznych i monitorujących do praktyki klinicznej, co ma kluczowe znaczenie przy doborze terapii precyzyjnie dopasowanej do mutacji wirusa, oraz zapobieganiu powikłaniom przewlekłego WZW typu B. Publikacja ta pełni funkcję łącznika pomiędzy badaniami podstawowymi a ich zastosowaniem klinicznym, co wpisuje się w nurt badań wdrożeniowych w zakresie diagnostyki i biotechnologii.

Druga publikacja, oryginalna („**Differences in sequences between HBV-relaxed circular DNA and covalently closed circular DNA**”, *Emerging Microbes & Infections* 2017), przedstawia wyniki badań porównujących różnice sekwencyjne między dwiema formami genomu HBV: zrelaksowaną formą kolistą (rcDNA) obecną głównie w surowicy, oraz kowalencyjnie zamkniętą formą kolistą (cccDNA), która stanowi trwały rezerwuar wirusa w jądrach hepatocytów. Analiza przeprowadzona została na próbkach surowicy i biopsji wątroby pobranych jednocześnie od 67 pacjentów z przewlekłym WZW typu B, leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Poradni Hepatologicznej Pomorskiego Centrum Chorób Zakaźnych i Gruźlicy w Gdańsku. W pierwszym etapie opracowano metodykę analizy obu form DNA wirusa HBV, obejmującą zarówno formę rcDNA, jak i formę superzwiniętego kolistego DNA (cccDNA). Przeprowadzono również eksperymenty potwierdzające wysoką czułość i swoistość opracowanej metody genotypowania tych form DNA z prób klinicznych. Genotypowanie formy rcDNA przeprowadzono bezpośrednio po izolacji DNA. Do analizy formy cccDNA zastosowano dwa podejścia. Pierwsze polegało na powieleniu cccDNA metodą toczącego się koła (ang. rolling circle amplification, RCA), która naśladuje naturalną replikację kolistego DNA i może służyć do wykrywania cccDNA HBV. Uzyskane produkty następnie trawiono enzymem restrykcyjnym SpeI, który tnie genom HBV tylko w jednym miejscu linearyzując go i umożliwiając wizualizację pełnej długości genomu na żelu agarozowym. Po oddzieleniu produktów trawienia na 1% żelu agarozowym, wszystkie pasma odpowiadające cccDNA zostały oczyszczone i przeanalizowane za pomocą spektrometrii mas.

Amplifikację RCA oraz trawienia enzymem SpeI przeprowadzano w takich samych warunkach, jak opisano przez Margeridonet i wsp (17).

Druga strategia polegała na usunięciu formy rcDNA z wyizolowanych próbek DNA poprzez zastosowanie egzonukleazy T5. Enzym ten trawi ssDNA w kierunku od 5' do 3' i jest zdolny do usuwania nukleotydów z końca 5', zarówno w ssDNA oraz w miejscach przerw w dwuniciowej strukturze liniowej lub kolistego dsDNA. Superzwinięty cccDNA jest odporny na trawienie przez egzonukleazę T5, ponieważ brak w nim wolnych końców 5' oraz przerw w strukturze. Do optymalizacji trawienia rcDNA zastosowano oczyszczony plazmid pAM6 (ATCC 45020D), zawierający pełnej długości monomer HBV, który służył jako standard (Rycina 1). Plazmid ten został wcześniej skalibrowany względem standardu Światowej Organizacji Zdrowia dla HBV (plazmid HBV-A) i wykazywał taką samą efektywność amplifikacji, co zapewnia wiarygodność wyników uzyskiwanych w testach molekularnych (18). W kolejnych eksperymentach udowodniono selektywność trawienia egzonukleazą T5. Wykorzystując plazmid pAM6 wykazano, że egzonukleaza T5 nie uszkadza formy cccDNA i jednocześnie skutecznie trawi znaczny nadmiar (1 µg) przeciętej formy plazmidu pAM6, symulującej rcDNA.



**Rycina 1.** Ocena trawienia egzonukleazą T5. W każdym przypadku użyto 1 µg plazmidu pAM6 (7,5 kb). Linearyzację plazmidu przeprowadzono przy użyciu 10 jednostek enzymu SpeI (NEB, Ipswich, MA, USA) w temperaturze 37 °C przez 1 h. Trawienie egzonukleazą T5 przeprowadzono przy użyciu 10 jednostek enzymu (Epicentre) w temperaturze 37 °C przez 30 min. Pozycje liniowych (linear) i kowalencyjnie zamkniętych kolistych (ccc) form plazmidu zostały oznaczone. Elektroforezę przeprowadzono w 0,8% żelu agarozowym w buforze 1×TAE. M oznacza marker DNA.

Następnym krokiem było porównano obu wyżej opisanych metod wykrywania formy cccDNA wirusa HBV. Technika RCA wykazała niską czułość – cccDNA wykryto w 1 z 67 próbek surowicy i w 48 z 67 próbek biopsji wątroby. Dodatkowo, wyniki tej metody nie korelowały z markerami klinicznymi, co sugerowało możliwość fałszywie negatywnych wyników i podważało jej wiarygodność. Natomiast metoda trawienia egzonukleazą T5 pozwoliła na wykrycie cccDNA we wszystkich próbkach wątroby, a jednocześnie nie wykryła go w próbkach surowicy, co jest zgodne z oczekiwaniami u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HBV. W efekcie metoda z egzonukleazą T5 została uznana za bardziej wiarygodną, czułą i adekwatną do detekcji cccDNA i wybrana jako technika przygotowania formy cccDNA do genotypowania.

Po odpowiednim przygotowaniu próbek porównano sekwencje form rc i cccDNA wirusa HBV za pomocą wysokoczułej techniki spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Analizowano mutacje związane z opornością na leki w regionie polimerazy (pol), mutacje wpływające na odpowiedź immunologiczną

gospodarza w regionie precore (PC), oraz mutacje w podstawowym promotorze genu rdzeniowego (BCP), które mogą zwiększać tempo replikacji wirusa i również wpływać na jego fenotyp czy jego wrażliwość na leczenie. Pierwszym etapem analizy była amplifikacja wybranych fragmentów HBV DNA zawierających analizowane mutacje. Następnie produkty PCR poddano działaniu enzymu SAP (fosfatazy alkalicznej z krewetek), który neutralizuje niewykorzystane dNTPs, eliminując ich wpływ na dokładność odczytu spektrometru mas w kolejnych etapach. Obecność wariantów genetycznych HBV badano w czterech osobnych reakcjach wydłużania starterów przy użyciu odczynników iPLEX Pro (Agena Bioscience, USA). Wszystkie startery zaprojektowano tak, żeby przyłączały się w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca polimorficznego i były wydłużane odpowiednim nukleotydem w zależności od sekwencji matrycy. Powstałe w ten sposób, zależne od wariantu wirusa, różnice w masie powstających produktów wydłużania wykrywano bezpośrednio przy użyciu spektrometru mas typu MALDI-TOF.

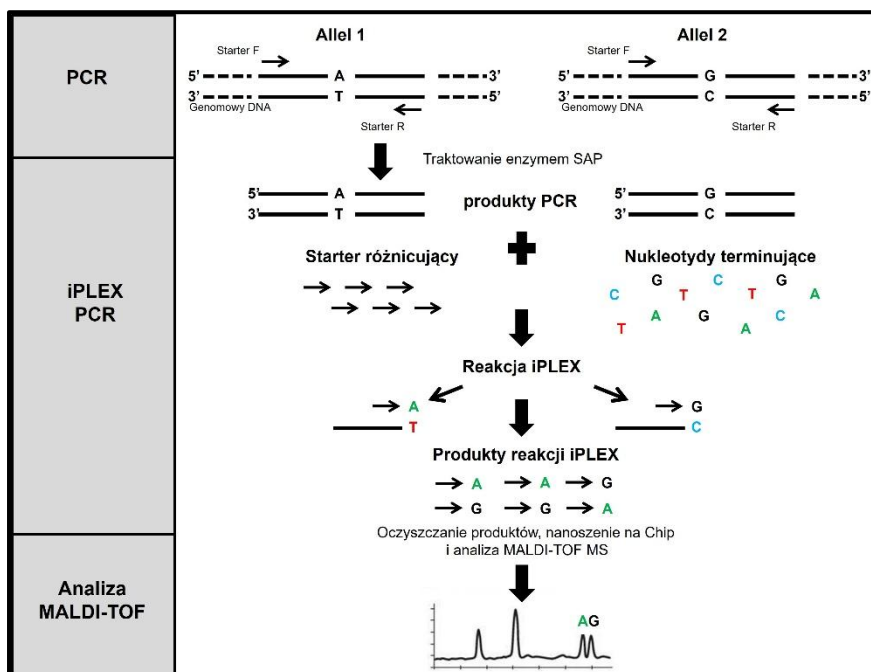
Stosując kolejne rozcieńczenia plazmidu pAM6 wykazano, że genotypowanie opisaną metodą można wykonać w sposób jednoznaczny dla ilości matrycy (plazmidowego DNA) wynoszących od 1 pg do 10 ng na reakcję, co odpowiada zawartości cccDNA w próbkach klinicznych (10-100 kopii na hepatocyt). Udowodniono również, że dodatek nawet 10 ng genomowego ludzkiego DNA nie przeszkadza w skutecznym i jednoznacznym genotypowaniu plazmidu pAM6 w ilościach od 1 pg do 10 ng. W powyższych eksperymentach uzyskano 100% zgodność z sekwencją referencyjną plazmidu pAM6.

Wyniki przeprowadzonej analizy po raz pierwszy wykazały, że formy rcDNA i cccDNA HBV mogą mieć różne sekwencje nukleotydowe. Udowodniono również, że cccDNA nie występuje w surowicy krwi osób przewlekle zakażonych HBV. Istotnym odkryciem było także stwierdzenie różnic w sekwencji pomiędzy formą rcDNA wyizolowaną z próbek wątroby i krwi pobranych od tego samego pacjenta. Różnice te zaobserwowano u 39% badanych w regionie BCP/PC oraz u 16% w regionie P. Obserwacja ta wyjaśnia dlaczego brak mutacji w osoczu nie wyklucza obecności klinicznie istotnych mutacji HBV na poziomie poniżej 1% w hepatocytach zakażonych pacjentów. Te niewykrywalne w krążeniu lekooporne warianty HBV są sukcesywnie eliminowane z osocza, jednak prawdopodobnie utrzymują się w hepatocytach – w komórkowym rezerwuarze trwałego materiału genetycznego wirusa (cccDNA). W odpowiedzi na presję selekcyjną, na przykład w trakcie terapii przeciwwirusowej, odpowiednie warianty mogą ponownie pojawiać się w krwiobiegu. Co istotne, choć szczepy odporne na leki mają niższy potencjał replikacyjny, obecność mutacji w regionie BCP/PC zwykle poprawia ich zdolność replikacji. Ponadto w badaniu wykryto różnice pomiędzy sekwencjami rcDNA i cccDNA wyizolowanymi z tego samego fragmentu wątroby, co dodatkowo wspiera hipotezę, że HBV cccDNA działa jako rezerwuar mutacji HBV. Udokumentowano także, że to właśnie mutacje obecne w formie cccDNA mają istotny wpływ na wiele parametrów klinicznych u pacjentów leczonych interferonem, takich jak

obecność żelaza w bioptatach wątroby (mutacja G1764A), stopień aktywności zapalnej wątroby (G1764A, A1613T, G1899A), stopień zwłóknienia wątroby (C1858T, A1762T, G1764A), podwyższony poziom enzymów wątrobowych (G1899A). W przypadku rcDNA jedynie mutacja G1613A wykazała korelację z wymienionymi parametrami, co dodatkowo podkreśla większe znaczenie mutacji obecnych w cccDNA. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że mutacje w formie cccDNA są zapisywane w trakcie cyklu replikacyjnego HBV i mogą szybko pojawiać się w osoczu w momencie aktywnego zakażenia. Forma cccDNA może zatem pełnić rolę „magazynu mutacji” i mieć kluczowe znaczenie dla przewidywania odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe, zwłaszcza w przypadku pacjentów po przebytych terapiach. Praca ta dostarcza nowych danych o znaczeniu biologicznym i terapeutycznym trwałej formy HBV DNA i może stanowić podstawę do rozwoju strategii ukierunkowanych również na rezerwuar wirusa.

Kolejnym celem prezentowanego cyklu publikacji było zdefiniowanie zależności między polimorfizmami genetycznymi gospodarza a kluczowymi aspektami klinicznymi zakażenia HBV, takimi jak podatność na zakażenie, dynamika wirerii, ryzyko progresji do zaawansowanego uszkodzenia wątroby (włóknienie, marskość, HCC) oraz efektywność odpowiedzi na terapię przeciwwirusową. Badania te, prowadzone głównie na populacji europejskiej, pozwoliły na identyfikację nowych biomarkerów ryzyka, pogłębienie wiedzy o mechanizmach patogenezy HBV oraz wskazanie potencjalnych kierunków personalizacji terapii.

W ramach przeprowadzonych analiz skupiono się na polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphisms, SNPs) w genach gospodarza, które mogą mieć znaczenie w kontekście zakażenia wirusem HBV. Przeprowadzono ocenę 115 polimorfizmów typu SNP zlokalizowanych w 50 genach gospodarza, takich jak: *cGAS*, *CRP*, *DDB1*, *ERCC2 (XPD)*, *ERCC5*, *FOXP3*, *FXR*, *GPC5*, *GPC5-AS1*, *HJURP*, *HNF1A*, *HNF4A*, *IFI6*, *IFNL4*, *IL10*, *IL12A*, *IL13*, *IL18*, *IL1B*, *IL28B*, *IL4*, *IL6*, *IL9*, *MBL*, *miR-196a2*, *miR-499*, *MRE11*, *MRE11a*, *NBN*, *Nbs1*, *NTCP*, *OGG1*, *POKL*, *PPAR $\alpha$* , *RAD52*, *RRM2*, *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STING/TMEM173*, *TDP2*, *TIM-3/HAVCR2*, *TLR3*, *TLR9*, *TNF*, *TNFRSF10B*, *TRIM41*, *VDR*, *XRCC1*. Dobór genów oparto na ich potencjalnym udziale w cyklu życiowym HBV w hepatocytach, w odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie, jak również w pośredniej regulacji tej odpowiedzi oraz ekspresji genów wirusowych, w tym transkrypcji białek HBV. Powyższe badanie wykonywane było na DNA genomowym izolowanym z krwi pacjentów.



**Rycina 2.** Analiza SNPs metodą MALDI-TOF MS.

**PCR:** Namnożenie wybranych fragmentów DNA, w których występują analizowane SNPs. Następnie produkty PCR trawione są enzymem SAP (fosfataza alkaliczna z krewetek), który neutralizuje niewykorzystane dNTPs.

2) **iPLEX PCR:** Do reakcji dodaje się startery różnicujące, zaprojektowane bezpośrednio przy SNP, oraz nukleotydy terminujące (ddNTP). Startery są wydłużane o jeden nukleotyd odpowiadający allelowi obecnemu w miejscu SNP. Powstałe w wyniku tej reakcji produkty, różniące się pojedynczymi nukleotydami, są

następnie oczyszczane na żywicy jonowymiennej, nanoszone na SpectroCHIP<sup>®</sup>, a następnie poddawane impulsowi lasera wzbudzającego jony. Podstawą do identyfikacji wariantu SNP jest stosunek ich masy do ładunku.

Podobnie jak we wcześniejszych etapach projektu, do genotypowania zastosowano platformę MassARRAY<sup>®</sup> Analyzer (Agena Bioscience, USA), opartą na technologii spektrometrii mas. Metoda ta umożliwia jednoczesną analizę wielu SNP-ów w reakcjach multipleksowych, z wysoką czułością i dokładnością, co czyni ją szczególnie przydatną w badaniach asocjacyjnych (Rycina 2). Analiza uzyskanych danych została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania Typer Analyzer Application v4 (Agena Bioscience, USA).

Publikacja nr 3 ("**Host genetic background affects the course of infection and treatment response in patients with chronic hepatitis B**", *Journal of Clinical Virology* 2019) była punktem wyjścia dla badań nad rolą polimorfizmów genetycznych w genach kodujących białka gospodarza i ich znaczeniem w kontekście zakażenia HBV. W niniejszej pracy skoncentrowano się na zmienności genetycznej w genach kodujących białka zaangażowane w cykl replikacyjny wirusa HBV oraz patogenezę przewlekłego WZW typu B. Przedmiotem badań były geny *NTCP (SLC10A1)*, *FXRα (NR1H4)*, *HNF1α*, *HNF4α* oraz *TDP2*, których produkty pełnią kluczowe funkcje na różnych etapach replikacji wirusa. Wybór SNPs w badanych genach oparto na wcześniejszych dowodach sugerujących ich potencjalne znaczenie funkcjonalne. Aby ocenić kliniczne znaczenie analizowanych wariantów genetycznych wykorzystano dobrze scharakteryzowaną kohortę 136 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B zrekrutowaną w Klinice Chorób Zakaźnych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Poradni Hepatologicznej Pomorskiego Centrum Chorób Zakaźnych

i Gruźlicy w Gdańsku. Do kryteriów włączenia pacjentów z WZW typu B należało utrzymywanie się HBsAg oraz przeciwciał anti-HBc klasy IgG przez co najmniej 24 miesiące przed momentem kwalifikacji do badania. Zrekrutowano zróżnicowaną grupę pacjentów objętych leczeniem, odzwierciedlającą rzeczywiste warunki praktyki klinicznej: Peg IFN  $\alpha$ 2a (57%), lamiwudyna (29%), entekawir (12%) oraz tenofowir (2%). Dodatkowo zebrano szczegółowe dane kliniczne i wirusologiczne, w tym ALT (aminotransferaza alaninowa), HBsAg, HBeAg, anti-HBe, ilościowe oznaczenie HBV DNA oraz wyniki biopsji wątroby (aktywność zapalna i stopień zwłóknienia w skali Scheuera) (19). Grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych osób – honorowych dawców krwi ze Stacji Krwiodawstwa w Gdańsku.

Szczególną uwagę w prowadzonych badaniach poświęcono analizie zmienności genu *TDP2*, ze względu na jego udokumentowaną rolę w cyklu replikacyjnym HBV. Produkt tego genu – enzym tyrozylowa fosfodiesteraza DNA 2 – uczestniczy w przekształcaniu genomu wirusa z formy rcDNA do trwałej postaci cccDNA, która stanowi główny rezerwuár HBV w komórkach i warunkuje utrzymywanie się zakażenia przewlekłego (20,21). W obrębie genu *TDP2* przeanalizowano dziewięć polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs), z których trzy (rs17249952, rs17249973, rs3212230) były wysoce konserwatywne w badanej grupie osób. Pozostałe sześć uwzględniono w analizie statystycznej: rs11559067 [T/C], rs1047782 [G/T], rs3087943 [A/G], rs707887 [C/A], rs1129644 [G/A], rs2294689 [G/C]. Zaobserwowano istotnie wyższą częstość występowania allelu głównego u kobiet (T) dla rs11559067. Homozygotyczność dla allelu głównego w rs1047782 [G/T] u pacjentów leczonych analogami NRTI wiązała się z ryzykiem nasilonego zapalenia wątroby, co sugeruje rolę *TDP2* w modulowaniu odpowiedzi zapalnej na przewlekłe zakażenie HBV. W przypadku terapii Peg IFN  $\alpha$ 2a, osoby z allelem głównym w rs3087943 [A/G] miały istotnie większą szansę na osiągnięcie serokonwersji HBsAg, co jest uznawane za główny cel terapii przeciwwirusowej. Obserwacja ta potencjalnie łączy rolę *TDP2* w przetwarzaniu cccDNA ze zdolnością gospodarza do eliminacji wirusa podczas leczenia interferonem. Zmienność w obrębie genu *TDP2*, zwłaszcza w regionach regulatorowych takich jak 3'UTR, może wpływać na poziom ekspresji enzymu, a tym samym na efektywność konwersji rcDNA do cccDNA, co potencjalnie przekłada się na nasilenie replikacji wirusa, stopień uszkodzenia wątroby oraz skuteczność terapii przeciwwirusowej.

Kolejnym analizowanym genem był *NTCP* (*SLC10A1*), który koduje funkcjonalny receptor HBV na powierzchni hepatocytów. Receptor ten umożliwia wirusowi wnikanie do komórek poprzez wiązanie się z domeną pre-S1 białka otoczkowego HBV, co czyni *NTCP* kluczowym czynnikiem determinującym podatność komórek na zakażenie (22). Spośród polimorfizmów wybranych do analizy w obrębie genu *NTCP*, tylko rs7154439 [A/G] wykazywał zmienność w badanej grupie. Pacjenci z genotypem AA mieli istotnie większe szanse na pojawienie się przeciwciał przeciwko antygenowi HBe (anti-HBe) po 48 tygodniach leczenia NRTI. Rs7154439 wiązał się zatem z serokonwersją HBeAg, co potencjalnie implikuje zmienność genetyczną *NTCP* w kontekście zdolności gospodarza do

kontrolowania replikacji HBV podczas terapii analogami. Uzyskane wyniki sugerują, że rs7154439 może być pozytywnym prognostykiem eliminacji wirusa. Co więcej, rs7154439 znajduje się w regionie promotorowym genu *NTCP*, co prawdopodobnie oddziałuje na ekspresję tego białka poprzez zmianę powinowactwa wiązania czynników transkrypcyjnych do sekwencji DNA. Ekspresja *NTCP* podlega regulacji przez *FXRα* (NR1H4), receptor jądrowy aktywowany przez kwasy żółciowe, który kontroluje metabolizm tych kwasów oraz poziom *NTCP*. Dodatkowo, *FXRα* może bezpośrednio zwiększać transkrypcję HBV poprzez wiązanie się z elementami odpowiedzi w regionie promotorowym wirusa, co prowadzi do nasilenia syntezy RNA pregenomowego i replikacji DNA HBV (23,24). W niniejszym badaniu nie stwierdzono jednak związku pomiędzy analizowanymi genotypami *FXRα* a parametrami klinicznymi lub wirusologicznymi.

Wśród analizowanych genów znalazły się również te kodujące czynniki transkrypcyjne (*HNF1A*, *HNF4A*), z których istotną rolę odgrywał *HNF1A* – gen odpowiadający za produkcję białka regulującego ekspresję wielu genów wątrobowych, w tym również genów wirusa HBV. *HNF1α* wykazuje działanie przeciwwirusowe – jego nadekspresja hamuje replikację i ekspresję białek HBV poprzez aktywację szlaku sygnałowego NF-κB, natomiast niedobór tego czynnika może prowadzić do zwiększonej replikacji wirusa oraz wyższych poziomów antygeny HBeAg (25,26). Drugi kluczowy czynnik transkrypcyjny to *HNF4α*, który wspiera replikację HBV i reguluje ekspresję jego genomu. Długotrwała supresja *HNF4α* w przewlekłym zakażeniu HBV sprzyja proliferacji hepatocytów, co może prowadzić do rozwoju raka wątrobowokomórkowego (HCC) (25,27).

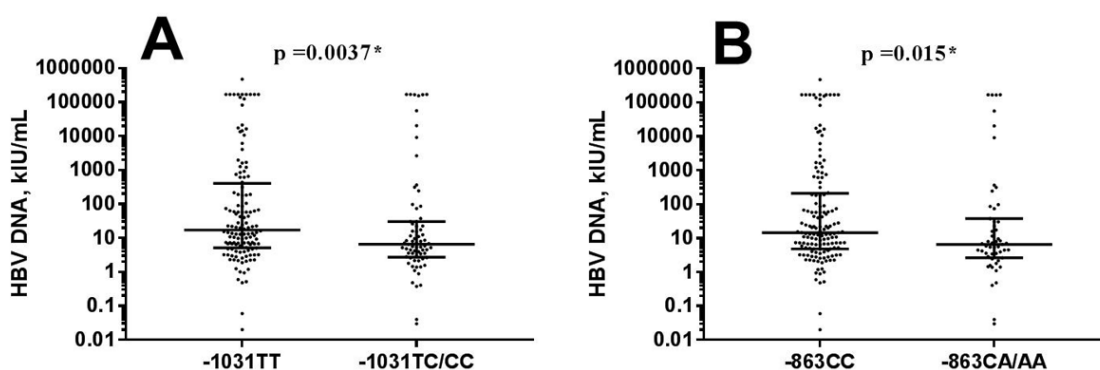
W przeprowadzonych badaniach zmienność w obrębie genu *HNF1A* analizowano na podstawie polimorfizmów: rs1169288 [G/T], rs7310409 [A/G] oraz rs2464196 [G/A]. Wykazano, że genotyp rs1169288 TT był związany zarówno z bardziej zaawansowanym stadium włóknienia wątroby, jak i z większym prawdopodobieństwem serokonwersji HBsAg po 24 tygodniach leczenia Peg IFN α2a. Genotyp rs7310409GG był istotnie związany ze zwiększonym prawdopodobieństwem eliminacji HBsAg po zakończeniu terapii interferonem, natomiast rs2464196AA korelował z obecnością HBV DNA po 48 tygodniach leczenia oraz wyższym nasileniem zmian zapalnych i włóknienia wątroby. Wszystkie polimorfizmy SNPs zlokalizowane w genie *HNF1A* korelowały z obecnością antygeny HBeAg w momencie rozpoczęcia leczenia oraz brakiem przeciwciał anti-HBe u pacjentów leczonych NRTI. Dodatkowo, warianty rs7310409AA i rs2464196AA wykazywały istotny związek ze stopniem nasilenia zapalenia wątroby, natomiast rs2464196AA był również powiązany ze stadiem włóknienia wątroby. Wyniki te wskazują, że polimorfizmy w genie *HNF1A* mogą wpływać na przebieg kliniczny zakażenia HBV (stopień włóknienia wątroby, nasilenie stanu zapalnego) oraz skuteczność terapii przeciwwirusowej (szanse na eliminację HBsAg, utrzymywanie się wiremii), co potwierdza rolę *HNF1A* jako kluczowego regulatora replikacji HBV i ekspresji genów niezbędnych dla funkcji hepatocytów. Zmienność genetyczna w obrębie tego genu może być istotnym biomarkerem prognostycznym

w terapii przeciwwirusowej. W badaniu analizowano też dwa warianty *HNF4A*: rs2144908 [G/A] i rs1800961 [C/T], z których drugi wykazywał związek z indukowanym Peg IFN  $\alpha$ 2a usunięciem HBsAg w długotrwałej obserwacji. Spostrzeżenie to sugeruje, że HNF4 $\alpha$  może odgrywać rolę w modulowaniu trwałości odpowiedzi na terapię przeciwwirusową, prawdopodobnie poprzez wpływ na stabilność ekspresji antygenów wirusowych lub metabolizm hepatocytów.

Badanie opisane w Publikacji nr 3 jako pierwsze oceniło wpływ polimorfizmów w genach *TDP2*, *NTCP*, *HNF1A*, *HNF4A* oraz *FXR $\alpha$*  na przebieg przewlekłego WZW typu B (pWZW typu B) oraz na skuteczność odpowiedzi na leczenie w populacji europejskiej. Szczególną uwagę poświęcono genom *NTCP* i *TDP2*, kluczowym dla wnikania HBV do komórek i przetwarzania cccDNA, co podkreśla ich znaczącą rolę w patogenezie zakażenia. Wykazano wpływ konkretnych wariantów na przebieg choroby i skuteczność terapii, podkreślając potencjał spersonalizowanych metod leczenia w zarządzaniu pWZW typu B. Uzyskane wyniki uzasadniają dalsze badania w większych, dobrze zdefiniowanych kohortach w celu walidacji zidentyfikowanych korelacji i zbadania podstawowych mechanizmów, dzięki którym te warianty genetyczne wpływają na zakażenie HBV.

Rozszerzając ten nurt badań, w Publikacji nr 4 („***TNF- $\alpha$  polymorphisms affect persistence and progression of HBV infection***”, *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2019) oceniono wpływ polimorfizmów genu *TNF- $\alpha$*  na ryzyko przewlekłego zakażenia HBV, progresję uszkodzenia wątroby oraz skuteczność terapii. TNF- $\alpha$  (czynnik martwicy nowotworów alfa) jest kluczową cytokiną prozapalną, odgrywającą istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko HBV – zarówno poprzez wspieranie eliminacji wirusa, jak i regulację stanu zapalnego w wątrobie (28). W badaniu przeanalizowano pięć polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) z regionu promotora genu *TNF- $\alpha$* , które wcześniej uznawano za istotne w regulacji ekspresji cytokin: -1031T/C (rs1799964), -863C/A (rs1800630), -857C/T (rs1799724), -308G/A (rs1800629) oraz -238G/A (rs361525). W pracy postawiono hipotezę, że warianty genetyczne *TNF- $\alpha$*  mogą modyfikować odpowiedź immunologiczną przeciwko HBV, wpływając tym samym na poziom replikacji wirusa oraz przebieg choroby wątroby. W porównaniu do Publikacji nr 3, w badaniu znacząco zwiększono liczebność grupy uczestników – do 231 osób, co stanowi wzrost o 70% względem wcześniejszej próby (136 pacjentów). Poszerzenie to przyczyniło się do poprawy mocy statystycznej oraz wiarygodności uzyskanych rezultatów. Analiza została również pogłębiona o szerszy zakres parametrów, takich jak obecność określonych haplotypów genu *TNF- $\alpha$*  oraz związek poziomu wirerii z genotypem. Rozpoznanie przewlekłego WZW typu B oparto na obecności HBsAg i anty-HBc IgG przez co najmniej 24 miesiące. Wszyscy pacjenci byli pochodzenia europejskiego i wywodzili się z północnej Polski. Dodatkowo, aż 196 osób poddano biopsji wątroby, co umożliwiło ocenę stopnia zapalenia i włóknienia według skali Scheuera (19). Równolegle zrekrutowano 100 zdrowych dawców krwi jako lokalną grupę kontrolną – byli to również dorośli

Europejczycy, seronegatywni w kierunku HIV (ang. human immunodeficiency virus), HBV oraz HCV (ang. hepatitis C virus). Obie grupy poddano genotypowaniu pięciu polimorfizmów w regionie promotora genu *TNF-α* z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Przeprowadzono analizę haplotypów z wykorzystaniem narzędzia SNPstats ([SNPStats: your web tool for SNP analysis.](#)) wykazując obecność pięciu odrębnych wariantów *TNF-α*. Najczęściej występował haplotyp TGGCC (obejmujący pozycje -1031, -238, -308, -863 i -857), który był obecny u ponad połowy badanych osób. Częstości haplotypów były zbliżone u pacjentów zakażonych HBV i osób zdrowych. Allele -1031C i -863A występowały częściej w grupie pacjentów z WZW typu B niż w grupie kontrolnej, co sugeruje ich związek ze zwiększoną podatnością na przewlekłe zakażenie HBV. Dodatkowo, zmienność w tych pozycjach korelowała z poziomem HBV DNA, co wskazuje na ich potencjalne znaczenie w regulacji replikacji wirusa (Rycina 3).

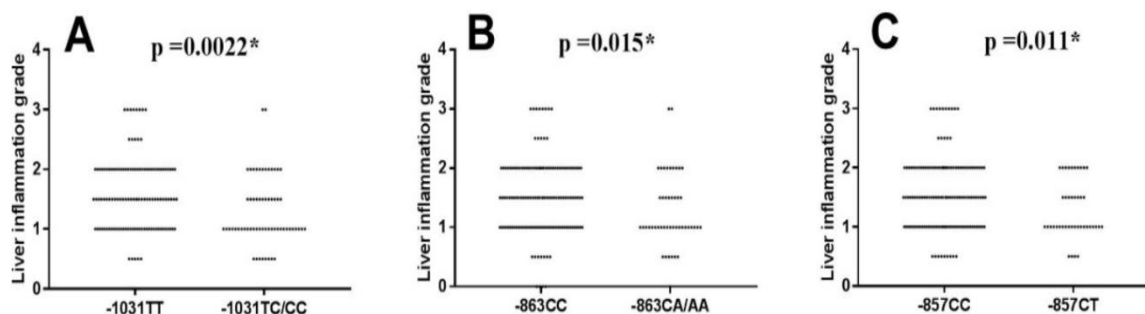


**Rycina 3.** Polimorfizmy promotora *TNF-α*: -1031T/C (rs1799964) (A), -863C/A (rs1800630) (B) oraz wyjściowe poziomy HBV DNA u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Linie przedstawiają wartości mediany oraz rozstęp międzykwartylowy. \*Wartości p pozostały istotne statystycznie po korekcie na wielokrotne porównania.

Osoby z genotypem -1031TT miały istotnie wyższe poziomy HBV DNA w surowicy w porównaniu z nosicielami allelu C. Podobną zależność zaobserwowano dla polimorfizmu -863C/A, gdzie osoby z genotypem CC wykazywały wyższą wiramię niż nosiciele allelu A, również w obu modelach analizy genetycznej. Nosiciele alleli rzadszych w obu tych pozycjach charakteryzowali się zatem niższym stężeniem HBV DNA w surowicy.

Spośród analizowanych polimorfizmów, -1031T/C, -863C/A i -857C/T miały wpływ na aktywność martwiczo-zapalną wątroby (Rycina 4). Genotypy -1031TT (rs1799964TT), -857CC (rs1800630CC) wykrywano częściej u pacjentów z wyraźnie większym nasileniem zapalenia wątroby. Genotyp -857CT predysponował do wyższej aktywności nekrozapalnej w wątrobie. Nie stwierdzono natomiast wpływu żadnego z badanych polimorfizmów *TNF-α* na progresję włóknienia wątroby,

zarówno w analizach niekorygowanych, jak i po uwzględnieniu zmiennych demograficznych, takich jak płeć i wiek pacjentów.



**Rycina 4.** Polimorfizmy promotora *TNF- $\alpha$* : –1031T/C (A), –863C/A (B), –857C/T (C) oraz martwiczo-zapalna aktywność wątroby u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Wartości  $p < 0,05$  zostały pogrubione. \*Wartości  $p$  istotne statystycznie po korekcie na wielokrotne porównania.

Podsumowując, przeprowadzone badanie potwierdziło rolę *TNF- $\alpha$*  w patogenezie przewlekłego WZW typu B, wskazując na związek polimorfizmów tego genu zarówno z ryzykiem przewlekłego zakażenia, jak i z dynamiką oraz nasileniem uszkodzenia wątroby w przebiegu HBV. Wykazano, że istnieją warianty sprzyjające utrwaleniu zakażenia (–1031CC i –863AA), które jednocześnie wiążą się z niższym poziomem wirerii i łagodniejszym przebiegiem zapalenia. Natomiast genotypy potencjalnie korzystne pod względem ryzyka przewlekłego WZW typu B (–1031TT i –857CC) związane były z bardziej agresywną odpowiedzią immunologiczną i nasilonym stanem zapalnym, co może przyspieszać progresję choroby wątroby. *TNF- $\alpha$* , jako główna cytokina prozapalna, odgrywa ważną rolę w zwalczaniu HBV — m.in. poprzez ograniczanie jego replikacji. Jednak nadmierna lub niekontrolowana aktywacja *TNF- $\alpha$*  może prowadzić do uszkodzenia hepatocytów, co tłumaczy związek wariantów –1031TT (rs1799964TT) i –857CC (rs1800630CC) z nasilonym stanem zapalnym i bardziej agresywnym przebiegiem choroby.

Publikacja nr 5 („**Genetic variation in *IL-10* influences the progression of hepatitis B infection**”, *Journal of Infectious Diseases* 2019) dotycząca polimorfizmów genu *IL-10* stanowi istotne uzupełnienie badań nad genetycznymi uwarunkowaniami odpowiedzi immunologicznej gospodarza w zakażeniu HBV. Interleukina 10 jest cytokiną, która działa antagonistycznie wobec cytokin prozapalnych, takich jak *TNF- $\alpha$* . Podczas gdy *TNF- $\alpha$*  nasila reakcję zapalną i bezpośrednio hamuje replikację wirusa, *IL-10* działa immunosupresyjnie. Choć taka rola sprzyja ograniczaniu uszkodzeń wątroby wynikających z nadmiernej odpowiedzi zapalnej, to jednocześnie może osłabiać eliminację wirusa, zwiększając ryzyko jego przewlekłego utrzymywania się w organizmie (29–32).

Do badania polimorfizmów *IL-10* z zebrano obszerną grupę pacjentów. Uwzględniono aż 857 osób z przewlekłym WZW typu B oraz 48 pacjentów z funkcjonalnym wyleczeniem zakażenia (HBsAg

ujemni i anty-HBc dodatni), co pozwoliło na ocenę wpływu wariantów genetycznych zarówno na przebieg przewlekłej infekcji, jak i na możliwość jej samoistnego wygaszenia. Materiał od 648 uczestników badania został pozyskany we współpracy międzynarodowej, od partnera francuskiego – prof. Thomasa Baumerta z INSERM w Strasbourgu – po uprzednim zatwierdzeniu wniosku przez francuską komisję Hepather. Dzięki temu możliwe było istotne poszerzenie bazy danych oraz zwiększenie różnorodności klinicznej i geograficznej analizowanej populacji. Dodatkowo, tak jak w publikacji dotyczącej *TNF- $\alpha$* , do badania włączono lokalną grupę kontrolną – 100 zdrowych dawców krwi, seronegatywnych w kierunku HIV, HBV i HCV.

W badaniu oceniono czy polimorfizmy w genie interleukiny 10 (*IL10*) wpływają na odpowiedź na leczenie przeciwwirusowe (zarówno Peg IFN  $\alpha$ 2a, jak i NRTI), a także na progresję choroby do uszkodzenia wątroby, w tym marskości i raka wątrobowokomórkowego (HCC). Pobrane biopaty wątroby zostały ocenione pod względem aktywności zapalnej oraz stopnia zwłóknienia zgodnie z punktacją Scheuera (19). Osobom, u których nie pobrano biopsji, oceniono stan wątroby za pomocą badania FibroScan – nieinwazyjnej, bezbolesnej metody ultradźwiękowej, która mierzy sztywność i stopień zwłóknienia wątroby, a wyniki przelicza się na skalę METAVIR (33). Ocenę stanu wątroby rozszerzono o zastosowanie nieinwazyjnych wskaźników, takich jak FIB-4 ( $[\text{wiek} \times \text{AST}] / [\text{płytki krwi} \times \sqrt{\text{ALT}}]$ ) – wartości  $>3,25$  wskazują na zaawansowane zwłóknienie) i APRI ( $[\text{AST} / \text{górną granicę normy}] / \text{płytki krwi} \times 100$ ) – wynik  $>2,0$  sugeruje marskość), co umożliwiło uzupełnienie danych uzyskanych z biopsji oraz przeprowadzenie bardziej kompleksowej oceny stopnia zwłóknienia i aktywności zapalnej wątroby (34).

Analizie poddano następujące warianty *IL10*: rs1800872 (–592C/A), rs1800871 (–819C/T), rs1800896 (–1082G/A), rs1800893 (–1353C/T), rs3024490 (+504G/T) oraz rs1518110 (+954G/T). Oceniano związek genotypów i haplotypów *IL10* z danymi klinicznymi i wirusologicznymi, takimi jak wiremia HBV, serokonwersja HBeAg i HBsAg, stężenie HBsAg, aktywność ALT/AST, stopień zwłóknienia wątroby (FIB-4, APRI) oraz odpowiedź na leczenie (Peg IFN  $\alpha$ 2a i NRTI).

W niniejszym badaniu wykazano, że genotypy rs1800896AA oraz rs1800893CC w genie *IL-10* występują częściej u pacjentów z niższym poziomem HBV DNA w surowicy ( $<2000$  IU/ml). Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że osoby z genotypem AA (rs1800896) miały prawie dwukrotnie większe szanse na niższą wiremię w porównaniu do nosicieli genotypu GG lub GA. Podobną tendencję odnotowano dla rs1800893CC. Obserwowana zależność wynika z tego, że polimorfizmy w regionie promotorowym *IL10* (rs1800896, rs1800893) wpływają na ekspresję interleukiny 10, która jako cytokinę immunosupresyjną hamuje odpowiedź zapalną. Niższa produkcja IL-10 może więc sprzyjać skuteczniejszej kontroli replikacji HBV.

Ponadto analizowane polimorfizmy *IL-10* związane były z odpowiedzią terapeutyczną w przewlekłym WZW typu B, co jest niezwykle istotne ze względu na immunomodulacyjną rolę tej

cytokiny. Efekt leczenia oceniano na podstawie utraty HBsAg, który jest kluczowym wskaźnikiem funkcjonalnego wyleczenia, związanym z eliminacją rezerwuaru wirusowego (cccDNA) i redukcją ryzyka marskości i rozwoju HCC. Trzy z analizowanych polimorfizmów w obrębie *IL10* były istotnie związane z osiągnięciem seroklirensu HBsAg po 24 tygodniach od zakończenia terapii Peg IFN  $\alpha$ 2a. Wyższe częstości alleli mniejszościowych u pacjentów, u których doszło do utraty HBsAg odnotowano w pozycjach: rs1800871 (-819T), rs1800872 (-592A) i rs3024490 (+504T). W grupie pacjentów leczonych NRTI, tylko polimorfizm rs1800896 wykazał związek z utratą HBsAg, jednak istotność statystyczna zniknęła po korekcie metodą Bonferroniego. Natomiast haplotyp *IL10* ATAC (1082A / 819T / 592A / 1353C) zwiększał szansę osiągnięcia fazy HBsAg-ujemnej niezależnie od rodzaju stosowanej terapii, co podkreśla jego kluczową rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Co istotne, wszystkie sześć badanych polimorfizmów *IL10* wykazało istotne statystycznie różnice w rozkładzie genotypów i/lub alleli pomiędzy pacjentami, u których doszło do utraty HBsAg, a osobami, u których nie wystąpił seroklirens (Tabela 2).

**Tabela 2.** Rozkład genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów genu *IL10* u pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B (HBsAg dodatni) oraz u osób, u których w wyniku leczenia przeciwwirusowego doszło do utraty HBsAg (HBsAg ujemni) w 48-tygodniowej obserwacji.

SNP	Genotyp	Rozkład genotypów (%)		P	Allel	Rozkład alleli (%)		P
		HBsAg (+) (n=320)	HBsAg (-) (n=24)			HBsAg (+) (n=640)	HBsAg (-) (n=48)	
<b>-592C/A</b> (rs1800872)	CC	185 (58)	6 (25)	<b>0.0007</b>	C	471 (74)	22 (46)	<b>0.000039</b>
	CA	101 (31)	10 (42)		A	169 (26)	26 (54)	
	AA	34 (11)	8 (33)					
<b>-819C/T</b> (rs1800871)	CC	182 (57)	6 (25)	<b>0.0005</b>	C	470 (73.5)	22 (46)	<b>0.000044</b>
	CT	106 (33)	10 (42)		T	170 (26.5)	26 (54)	
	TT	32 (10)	8 (33)					
<b>-1082G/A</b> (rs1800896)	GG	61 (19)	1 (4)	<b>0.03</b>	G	263 (41)	10 (21)	<b>0.005653</b>
	GA	141 (44)	8 (33)		A	377 (59)	38 (79)	
	AA	118 (37)	15 (63)					
<b>-1353C/T</b> (rs1800893)	CC	122 (38)	14 (58)	<b>0.041</b>	C	363 (57)	37 (77)	<b>0.005809</b>
	CT	119 (37)	9 (38)		T	277 (43)	11 (23)	
	TT	79 (25)	1 (4)					
<b>+504G/T</b> (rs3024490)	GG	173 (54)	7 (29)	<b>0.005</b>	G	462 (72)	24 (50)	<b>0.001132</b>
	GT	116 (36.5)	10 (42)		T	178 (28)	24 (50)	
	TT	31 (9.5)	7 (29)					
<b>+954 G/T</b> (rs1518110)	GG	188 (59)	12 (50)	<b>0.0021</b>	G	476 (74.5)	28 (58)	<b>0.015446</b>
	GT	100 (31)	4 (17)		T	164 (25.5)	20 (42)	
	TT	32 (10)	8 (33)					

HBsAg (+) – pacjenci z dodatnim wynikiem HbsAg; HBsAg (-) – pacjenci z ujemnym wynikiem HbsAg; wartości P poniżej 0,05 zaznaczono pogrubioną czcionką. Wszystkie wartości P pozostały istotne statystycznie po korekcie Bonferroniego.

Do oceny stopnia uszkodzenia wątroby w badanej populacji, na podstawie wskaźników FIB-4 oraz APRI, przeprowadzono analizę regresji logistycznej z uwzględnieniem zmiennych takich jak genotypy *IL10*, płeć i wiek. W analizie wieloczynnikowej genotypy rs1800871TT, rs1518110TT, rs1800872AA oraz rs3024490TT zostały zidentyfikowane jako predyktory niższego wyniku FIB-4 ( $p < 0,05$ ), co wskazuje na włóknienie wątroby o mniejszym nasileniu (Tabela 3).

Podobne obserwacje odnotowano dla wskaźnika APRI, którego wartości były istotnie niższe u pacjentów homozygotycznych względem allelu mniejszościowego w przypadku tych czterech polimorfizmów genu *IL10*. Również istotną rolę w analizie odgrywał haplotyp ATAC genu *IL10* (1082A / 819T / 592A / 1353C), który występował znacznie częściej u pacjentów z mniejszym uszkodzeniem wątroby. Z kolei haplotyp GCCT (1082G / 819C / 592C / 1353T) zwiększał ryzyko rozwoju marskości wątroby.

**Tabela 3.** Związek między polimorfizmami genu *IL10* a nasileniem choroby wątroby u pacjentów zakażonych wirusem HBV.

Genotyp <i>IL10</i>	MAF	OR	95% CI	P
<b>rs1800871 [C/T]</b>				
CC,CT vs. TT	T=0,43	8,94	1,78-44,80	0,007*
<b>rs1800872 [C/A]</b>				
CC,CA vs. AA	A=0,39	9,15	1,82-45,89	0,006*
<b>rs3024490 [G/T]</b>				
GG,GT vs. TT	T=0,43	9,02	1,79-45	0,007*
<b>Rs1518110 [G/T]</b>				
GG,GT vs. TT	T= 0,42	8,84	1,76-44,29	0,008*

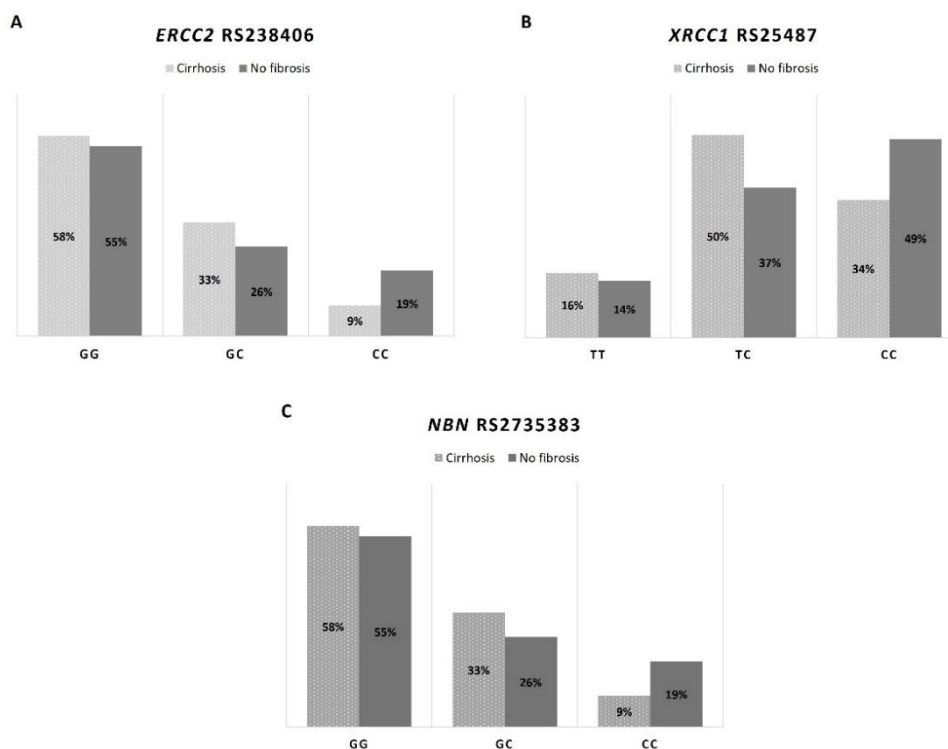
Zwłóknienie wątroby oceniano za pomocą wskaźnika FIB-4. MAF – częstość występowania allelu mniejszościowego; OR – iloraz szans; CI – przedział ufności; Wartości p oznaczone gwiazdką pozostały istotne statystycznie po korekcie metodą Bonferroniego.

Uzyskane wyniki pokazują, że różnice w sekwencji promotora genu *IL10* mogą wpływać na tempo progresji włóknienia wątroby oraz odpowiedź na leczenie przeciwwirusowe. Osoby z wariantami sprzyjającymi niższej ekspresji IL-10 częściej osiągają eliminację HBsAg po leczeniu interferonem lub analogami, a jednocześnie rzadziej rozwijają zaawansowane włóknienie czy marskość wątroby. Z kolei warianty związane z wyższą produkcją IL-10 zwiększają ryzyko przewlekłości zakażenia i progresji uszkodzenia wątroby, co wynika z immunosupresyjnego działania tej cytokiny – hamuje ona odpowiedź zapalną, ale jednocześnie może osłabiać skuteczność eliminacji wirusa przez układ odpornościowy. W praktyce oznacza to, że analiza polimorfizmów *IL-10* może pomóc w identyfikacji pacjentów szczególnie narażonych na przewlekły przebieg choroby i powikłania wątrobowe oraz tych, którzy mają większą szansę na skuteczną odpowiedź na terapię. Polimorfizmy *IL-10* mogą więc pełnić rolę markerów prognostycznych, wspierających personalizację leczenia oraz monitorowanie ryzyka progresji włóknienia i marskości wątroby u osób z przewlekłym WZW typu B.

W ramach dalszych poszukiwań czynników wpływających na progresję chorób wątroby indukowanych przez HBV, przeanalizowano zmienność genów odpowiedzialnych za naprawę DNA pod

kątem ich wpływu na ryzyko rozwoju marskości u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Publikacja nr 7 („**Liver Cirrhosis in Chronic Hepatitis B Patients Is Associated with Genetic Variations in DNA Repair Pathway Genes**”, *Cancers* 2020) koncentruje się na marskości jako końcowym etapie przewlekłych chorób wątroby, stanowiącej istotny problem zdrowotny na świecie i główny czynnik ryzyka rozwoju raka wątrobowokomórkowego. W badaniu oceniono częstość występowania i znaczenie genetycznych wariantów w kluczowych genach naprawy DNA, takich jak *XRCC1*, *XRCC4*, *ERCC2*, *ERCC5*, *RAD52*, *Mre11* oraz *NBN*. Wybór genów do analizy oparto na ich kluczowej roli w głównych szlakach naprawy DNA oraz udokumentowanych związkach z replikacją wirusa HBV i patogenezą marskości wątroby. Grupa badana obejmowała 752 osoby pochodzenia kaukaskiego, w tym 652 pacjentów z przewlekłym WZW typu B oraz 100 zdrowych dawców krwi jako grupę kontrolną. Pacjenci byli rekrutowani zarówno w Polsce (Gdańsk, Gdynia), jak i we Francji (Strasburg), co odzwierciedla współpracę międzynarodową w realizacji badania. Do badania włączano wyłącznie osoby wcześniej nieleczone lub leczone przeciwwirusowo przez krótki okres (<6 miesięcy). Oceny stopnia zwłóknienia wątroby dokonano w momencie włączenia pacjentów do kohorty. U 132 pacjentów wykonano biopsję wątroby i oceniono nasilenie zwłóknienia oraz aktywność zapalną według skali Scheuera (19). U pozostałych 520 pacjentów, u których nie przeprowadzono biopsji, do oceny zwłóknienia zastosowano nieinwazyjną elastografię przejściową (FibroScan). Zwłóknienie i marskość klasyfikowano według skali METAVIR (33).

Zaobserwowano istotne różnice w rozkładzie genotypów sześciu analizowanych polimorfizmów (*ERCC2*: rs13181, rs238406; *RAD52*: rs7963551; *XRCC1*: rs25487; *ERCC5*: rs2018836; *NBN*: rs2735383) pomiędzy pacjentami z przewlekłym WZW typu B a zdrowymi osobami z grupy kontrolnej, co sugeruje ich związek z podatnością na przewlekłe zakażenie HBV. Dodatkowo genotypy *ERCC2* rs238406GG, *XRCC1* rs25487TT oraz *NBN* rs2735383GG identyfikowano częściej u chorych z marskością wątroby niż pacjentów bez cech zwłóknienia (Rycina 5). Taka obserwacja podkreśla rolę analizowanych wariantów w modulacji ryzyka marskości u pacjentów z przewlekłym WZW typu B, niezależnie od klasycznych czynników klinicznych.



**Rycina 5.** Rozkład genotypów *ERCC2* rs238406 (A), *XRCC1* rs25487 (B) oraz *NBN* rs2735383 (C) u chorych z marskością wątroby i u pacjentów bez cech włóknienia wątroby.

W badanej grupie genotypy rs13181TT (*ERCC2*) oraz rs2018836GG (*ERCC5*) częściej występowały u pacjentów z niższym poziomem HBV DNA, a genotyp rs25487TT (*XRCC1*) wiązał się z niższym poziomem enzymów wątrobowych (ALT i AST). Dodatkowo nosiciele rs2735383CC (*NBN*) mieli istotnie niższy poziom ALT.

Do badania związku polimorfizmów genów naprawy DNA z marskością wątroby u pacjentów z przewlekłym WZW typu B wykorzystano trzy modele genetyczne: addytywny (analiza liniowego wpływu każdej kopii allelu na fenotyp), dominujący (porównanie obecności przynajmniej jednego allelu ryzyka, np. GT+TT vs. GG) oraz recesywny (ocena wpływu homozygot, np. TT vs. GT+GG). W badaniu zastosowano dwuetapową analizę statystyczną. W pierwszym etapie przeprowadzono analizy jednoczynnikowe, które pozwoliły zidentyfikować czynniki kliniczne i genetyczne związane z ryzykiem rozwoju marskości wątroby. Następnie wyniki te zostały zweryfikowane w modelu wieloczynnikowym, uwzględniającym zmienne zakłócające, takie jak wiek, płeć oraz parametry laboratoryjne. Stwierdzono, że genotyp rs238406TT w genie *ERCC2* i rs25487CC w genie *XRCC1* istotnie obniża ryzyko rozwoju marskości. Podobną analizę przeprowadzono w celu zbadania związku pomiędzy ocenianymi wariantami genetycznymi a stopniem zaawansowania włóknienia wątroby. Genotypy rs238406TT (*ERCC2*) oraz rs25487CC (*XRCC1*) zostały zidentyfikowane jako niezależne predyktory niższego stopnia włóknienia.

Uzyskane wyniki podkreślają, że indywidualne różnice w efektywności naprawy DNA modulują progresję włóknienia u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. ERCC2 uczestniczy w szlaku naprawy przez wycinanie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair, NER), a jego sprawność ma znaczenie w ochronie genomu przed mutacjami prowadzącymi m.in. do nowotworów. Warianty ERCC2 (np. allel G rs238406) mogą wiązać się z zaburzeniem naprawy, co może sprzyjać integracji DNA z HBV z genomem gospodarza, aktywując szlaki prozapalne i włóknienie. Z kolei XRCC1 koordynuje naprawę pojedynczych nici DNA, uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), których produkcja wzrasta w przewlekłym zapaleniu wątroby. Nosiciele allelu T (rs25487) mają obniżoną zdolność naprawy poprzez wycinanie zasad (ang. base excision repair, BER), co prowadzi do kumulacji mutacji w hepatocytach i przyspieszonej progresji włóknienia. Dodatkowo, ponieważ HBV wykorzystuje białka szlaku naprawy DNA m.in. do konwersji rcDNA w cccDNA, polimorfizmy w genach naprawy DNA (np. ERCC2, XRCC1) mogą modulować efektywność tego procesu, wpływając na poziom replikacji wirusa i stopień uszkodzenia wątroby. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania profilu genetycznego w genach naprawy DNA do identyfikacji pacjentów z WZW typu B z podwyższonym ryzykiem rozwoju marskości, co pozwalałoby na wczesne wdrożenie odpowiednich strategii terapeutycznych. Pacjenci z allelami ryzyka (np. ERCC2 rs238406G, XRCC1 rs25487T) powinni być objęci częstszą kontrolą parametrów włóknienia (elastografia, FibroTest). Wykrycie tych wariantów może wspierać decyzje o wcześniejszym włączeniu terapii przeciwwirusowej lub zastosowaniu leków o działaniu antyfibrotycznym.

W publikacji nr 8 („**Polymorphisms within DIO2 and GADD45A genes increase the risk of liver disease progression in chronic hepatitis B carriers**”, *Scientific Reports* 2023) poszerzono spektrum badań nad przewlekłym WZW typu B, obejmując pełen zakres progresji chorób wątroby – od braku zwłóknienia, przez łagodne i umiarkowane jego postacie, aż po marskość i HCC. Badano geny związane z regulacją odpowiedzi na stres komórkowy (GADD45A, ATF3), kontrolą metabolizmu i adaptacją metaboliczną (DIO2, PPARG) oraz modulacją odpowiedzi immunologicznej (TBX21, AKT3). Do badania włączono 284 pacjentów z potwierdzonym przewlekłym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu B, definiowanym jako obecność antygenu HBsAg przez ponad sześć miesięcy, pochodzących z kohorty ANRS CO22 HEPATHER (ClinicalTrials.gov: NCT01953458). Wszyscy uczestnicy pochodzili z Europy i nie mieli innych współistniejących przyczyn chorób wątroby, takich jak współzakażenia wirusowe, choroby autoimmunologiczne czy metaboliczne. Wykluczono pacjentów, którzy byli w trakcie leczenia przeciwwirusowego lub zakończyli je w ciągu sześciu miesięcy przed rozpoczęciem badania. Próbkę krwi do badań laboratoryjnych pobierano przed oceną włóknienia wątroby, analizując m.in. markery serologiczne związane z HBV (HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, poziomy HBV DNA). Stopień włóknienia oceniano nieinwazyjnie metodą elastografii przejściowej FibroScan, a do klasyfikacji

pacjentów zastosowano system METAVIR (33). Uczestników podzielono na grupy: bez włóknienia (stadium F0), z łagodnym włóknieniem (stadium F1), z umiarkowanym do ciężkiego włóknieniem (stadia F2–F3) oraz z marskością wątroby (stadium F4, potwierdzoną przez dwóch doświadczonych patologów).

Genotypowanie polimorfizmów SNP w genach *DIO2*, *PPARG*, *ATF3*, *AKT3*, *GADD45A* i *TBX21* przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometrii mas typu MALDI-TOF. Do identyfikacji niezależnych czynników ryzyka progresji włóknienia, rozwoju marskości oraz raka wątrobowokomórkowego zastosowano modele dominujące i alleliczne. W celu oceny funkcjonalnej analizowanych polimorfizmów wykorzystano narzędzia bioinformatyczne, które pozwalały przewidzieć ich potencjalny wpływ na strukturę, stabilność oraz funkcję białek, a także na regulację ekspresji genów (Tabela 4). Dzięki zastosowaniu tych narzędzi możliwa była wielowymiarowa analiza konsekwencji genetycznych wariantów, zarówno na poziomie białkowym, jak i regulatorowym, co pozwoliło lepiej zrozumieć ich rolę w progresji chorób wątroby u pacjentów z przewlekłym WZW typu B.

Nazwa	Zastosowanie	Uwagi
<b>SIFT</b>	Przewidywanie wpływu polimorfizmów SNP na funkcję białek na podstawie homologii sekwencji oraz właściwości fizykochemicznych aminokwasów	Skala 0-1, gdzie wynik $\leq 0,05$ wskazuje na szkodliwy wpływ; bierze pod uwagę homologii sekwencji i właściwości fizykochemiczne aminokwasów
<b>MUpro</b>	Ocena wpływu mutacji na stabilność strukturalną białka ( $\Delta\Delta G$ )	Wartość $\Delta\Delta G < 0$ sugeruje destabilizację białka; narzędzie wykorzystuje algorytmy uczenia maszynowego
<b>I-Mutant 3.0</b>	Analiza zmian stabilności białka po mutacji ( $\Delta\Delta G$ )	Pozwala oszacować, czy mutacja prowadzi do destabilizacji lub stabilizacji białka
<b>HOPE</b>	Analiza strukturalnych i funkcjonalnych skutków mutacji	Wizualizuje zmiany w strukturze białka, takie jak rozmiar, hydrofobowość, potencjalne zaburzenia domen funkcjonalnych
<b>MetaRNN</b>	Predykcja patogeniczności SNP	Skala 0-1, gdzie wyższa wartość oznacza większe prawdopodobieństwo efektu patogenicznego; uwzględnia wiele cech genomowych
<b>RegulomeDB</b>	Ocena potencjału regulatorowego SNP w regionach niekodujących	Skala 0–1; 1 oznacza najwyższe prawdopodobieństwo funkcji regulatorowej; uwzględnia wiązanie TF, stany chromatyny
<b>miRNASNP</b>	Przewidywanie wpływu SNP na utratę lub zyskanie miejsca wiązania miRNA	Pozwala ocenić wpływ wariantów na posttranskrypcyjną regulację ekspresji genów przez mikroRNA

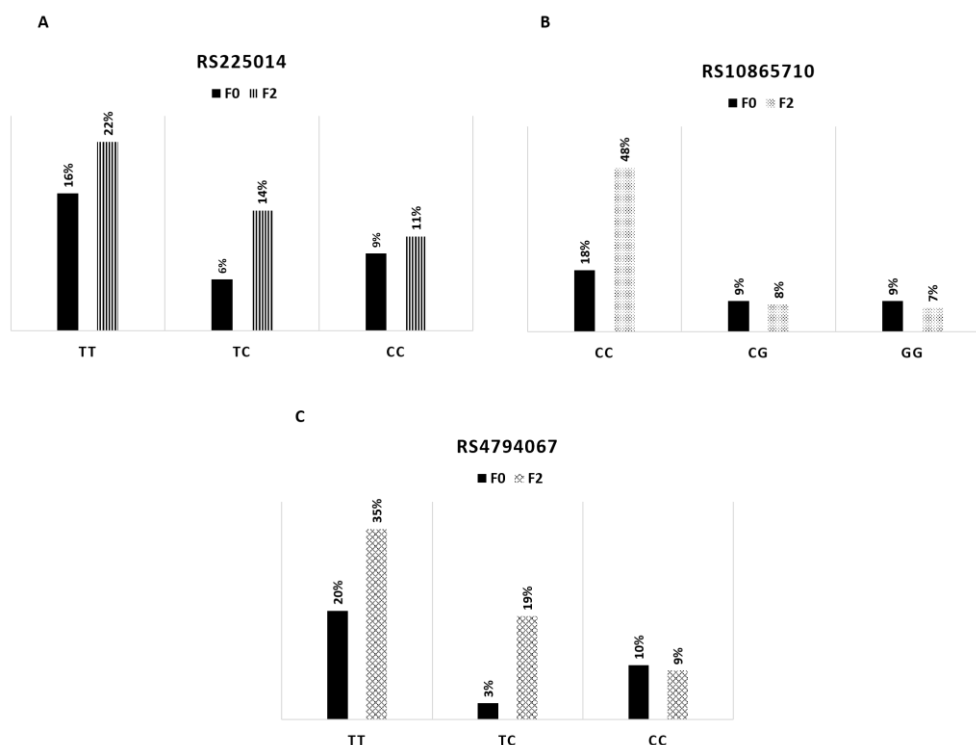
SIFT ([https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html)); MUpro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>); HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>); I-Mutant 3.0 (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>); miRNASNP (<https://guolab.wchscu.cn/miRNASNP/#/!/>); MetaRNN ([www.liulab.science/metarnn.html](http://www.liulab.science/metarnn.html)); RegulomeDB (<https://beta.regulome.org/regulome-search/>); HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>).

**Tabela 4.** Narzędzia bioinformatyczne zastosowane do oceny funkcjonalnej analizowanych polimorfizmów.

Polimorfizmy genów *DIO2*, *AKT3* i *GADD45A* wykazywały istotne powiązania z cechami klinicznymi i wirusologicznymi u pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Genotypy *DIO2* (rs225014CC i rs225017TT) częściej występowały u mężczyzn, a obecność HBeAg była częstsza u nosicieli rs225014CC. Genotyp *AKT3* rs1203194TT wiązał się z wyższym poziomem HBsAg, natomiast rs1203194CC – z wyższym poziomem AST. W analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami

wyższego ALT były: trombocytopenia (małopłytkowość), *DIO2* rs225014TT, *AKT* rs12031994TT i *GADD45A* rs532446CC.

Oceniono także związek pomiędzy polimorfizmami a postępowaniem włóknienia wątroby. Genotyp *DIO2* rs225014TT występował istotnie rzadziej w grupie F0 niż w grupach F1–F4. Różnice odnotowano również dla rs10865710 (*PPARG*) i rs4794067 (*TBX21*) (Rycina 6). W dalszej wieloczynnikowej analizie genotypy rs225014TT (*DIO2*), rs10865710CC (*PPARG*) i obecność nadciśnienia wrotnego pozostały niezależnymi predyktorami zaawansowanego włóknienia.



**Rycina 6.** Wykresy przedstawiające rozkład genotypów dla *DIO2* rs225014 (A), *PPARG* rs10865710 (B) oraz *TBX21* rs4794067 (C) u pacjentów z oceną zwłóknienia F0 i F2.

Analogiczną analizę przeprowadzono w celu określenia zależności między badanymi wariantami genetycznymi a marskością wątroby. W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu zmiennych zakłócających, jako niezależne czynniki ryzyka marskości wątroby zidentyfikowano: trombocytopenię, podwyższony poziom ALT, rs532446TT (*GADD45A*) i rs11119982TT (*ATF3*).

Rak wątrobowokomórkowy (HCC) został wykryty u 13 z 284 (4,6%) pacjentów z przewlekłym WZW typu B. Nie stwierdzono bezpośredniego związku między analizowanymi SNPs a obecnością HCC w grupie badanej. Zaobserwowano natomiast odmienny rozkład genotypów *DIO2* rs225014 między pacjentami z marskością, którzy rozwinęli HCC, a tymi bez nowotworu. Wariant rs225014CC zidentyfikowano u 38% pacjentów z HCC w porównaniu do 12% pacjentów z marskością bez HCC.

Na podstawie analizy *in silico* stwierdzono, że polimorfizmy rs225014 (*DIO2*), rs10865710 (*PPARG*), rs532446 (*GADD45A*) oraz rs4794067 (*TBX21*) wykazują najsilniejsze cechy sugerujące ich

potencjalną funkcję regulatorową. Polimorfizm rs10865710 został powiązany z regulacją ekspresji genów *PPARG* i *TIMP4*, jak również ze zdolnością modulacji wiązania białka JUN i czynników transkrypcyjnych z rodziny NFATC. Wykazano, że rs532446 jest zlokalizowany w motywach wiązania ATF4 i PRDM oraz oddziałuje z wieloma białkami regulacyjnymi, podczas gdy rs225014 moduluje ekspresję genów docelowych i wiązanie czynników transkrypcyjnych. Rs4794067 związany był z ekspresją licznych genów i oddziaływaniem z białkami EZH2 oraz CTCF. Analiza modyfikacji histonowych ujawniła, że rs10865710, rs532446 i rs4794067 znajdują się w regionach DNA oznaczonych jako wzmacniacze transkrypcji (enhancery) w tkankach wątroby, gruczołach endokrynych i egzokrynych, co sugeruje ich rolę w regulacji ekspresji genów kluczowych dla funkcji metabolicznych i immunologicznych. Dodatkowo, narzędzie miRNASNP wykazało, że wszystkie wymienione SNPs mogą modyfikować miejsca wiązania mikroRNA (np. miR-3143, miR-4488), wpływając na posttranskrypcyjną kontrolę ekspresji genów.

Badanie dostarcza przełomowych danych nt. genetycznych uwarunkowań progresji przewlekłego WZW typu B, identyfikując konkretne polimorfizmy typu SNP (rs225014 w *DIO2*, rs532446 w *GADD45A*, rs10865710 w *PPARG*), które istotnie korelują z ryzykiem zaawansowanego włóknienia, marskości i HCC. Na przykład genotyp rs532446TT (*GADD45A*) zwiększa ryzyko marskości 4,8-krotnie, co potwierdza kluczową rolę szlaków odpowiedzi na stres komórkowy w patogenezie choroby. Analiza mechanizmów molekularnych wykazała, że destabilizacja białka DIO2 zaburza metabolizm hormonów tarczycy, prowadząc do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia hepatocytów, podczas gdy polimorfizmy w genach *PPARG* i *TBX21* modyfikują szlaki metaboliczne i immunologiczne. Wyniki te mają bezpośrednie implikacje dla medycyny personalizowanej: genotypowanie wymienionych SNPs umożliwia identyfikację pacjentów wysokiego ryzyka, którzy wymagają intensywniejszego nadzoru (np. częstszych badań obrazowych w kierunku HCC). Jednocześnie praca wskazuje nowe cele terapeutyczne, takie jak hamowanie szlaku *GADD45A/ATF3* czy modulacja aktywności *PPARG*, które mogą stać się podstawą dla rozwoju innowacyjnych leków spowalniających postęp choroby. Integracja danych genetycznych z klasycznymi parametrami klinicznymi otwiera drogę do precyzyjniejszych algorytmów diagnostyczno-terapeutycznych, co znacząco poprawia rokowania u chorych z przewlekłym WZW typu B.

Publikacja nr 6 („**Recent Advances in Understanding, Diagnosing, and Treating Hepatitis B Virus Infection**”, *Microorganisms* 2020) stanowi syntetyczne podsumowanie tematyki badawczej w zakresie badań nad zakażeniem wirusem HBV, jego diagnostyką, patogenezą oraz nowoczesnymi strategiami terapeutycznymi. Artykuł ma charakter przeglądowy i obejmuje aktualny stan wiedzy dotyczący epidemiologii, biologii molekularnej oraz cyklu życiowego wirusa HBV. Omawia on najnowsze osiągnięcia w dziedzinie diagnostyki, ze szczególnym uwzględnieniem nowych biomarkerów

wirusowych (HBV RNA, HBcrAg, przeciwciała anty-HBs i anty-HBc). W artykule poruszana jest także kwestia ryzyka progresji do zaawansowanego uszkodzenia wątroby (włóknienie, marskość, HCC) oraz efektywność odpowiedzi na terapię przeciwwirusową, zarówno w kontekście tradycyjnych leków (interferon, NRTI), jak i obiecujących nowych strategii terapeutycznych celowanych w różne etapy cyklu replikacyjnego HBV, w tym tworzenie cccDNA. Publikacja integruje i podsumowuje wyniki badań dotyczących czynników gospodarza, ich wpływu na przebieg zakażenia oraz odpowiedź na leczenie, co odpowiada zakresowi badań przedstawionych we wniosku habilitacyjnym. Artykuł prezentuje interdyscyplinarne ujęcie problematyki HBV, łącząc aspekty molekularne, genetyczne, kliniczne i translacyjne, osadzając własne obserwacje w szerokim kontekście literatury międzynarodowej.

Cykl publikacji przedstawiony we wniosku habilitacyjnym koncentruje się na molekularnych i genetycznych aspektach przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV), z wyraźnym podkreśleniem biotechnologicznego wymiaru badań. Artykuły te, opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny, potwierdzając samodzielność badawczą i kompetencje niezbędne do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Kluczowym elementem cyklu jest integracja zaawansowanych technik biotechnologicznych z analizą kliniczną i molekularną zarówno wirusa, jak i gospodarza. Ważnym osiągnięciem jest opracowanie innowacyjnej metody detekcji kowalencyjnie zamkniętego kolistego DNA (cccDNA) poprzez selektywne trawienie rcDNA egzonukleazą T5, co umożliwiło precyzyjną analizę tej formy wirusa w próbkach klinicznych eliminując formy interferujące. Dzięki temu wykazano, że formy cccDNA stanowią rezerwuuar mutacji oporności na leczenie, często niewidocznych w osoczu, co ma istotne znaczenie dla monitorowania skuteczności terapii i projektowania strategii eliminacji HBV. Równolegle przeprowadzono szerokie analizy zmienności genetycznej gospodarza, identyfikując polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach zaangażowanych w cykl replikacyjny wirusa, odpowiedź immunologiczną na zakażenie, metabolizm hepatocytów oraz szlaki naprawy DNA. Zarówno do analizy genomu wirusa, jak i zmienności genetycznej gospodarza zastosowano wysokoprzepustową metodę spektrometrii mas typu MALDI-TOF, co dodatkowo spaja cały cykl publikacji i podkreśla jego spójność metodologiczną oraz translacyjny charakter. Następnie wykorzystując bioinformatyczne narzędzia analityczne i statystyczne, zidentyfikowano biomarkery predykcyjne i prognostyczne (Tabela 5), które mogą wspierać: personalizację terapii oraz ocenę ryzyka progresji do marskości i HCC. Dzięki temu możliwe było stworzenie zintegrowanego podejścia diagnostycznego, łączącego wirusologię molekularną z nowoczesną genomiką człowieka w kontekście przewlekłego zakażenia HBV.

**Tabela 5.** Podsumowanie markerów zidentyfikowanych w ramach przedstawionego cyklu publikacji według kluczowych aspektów klinicznych.

Marker/gen (wariant)	Efekt kliniczny	Publikacja
<b>Markery progresji chorób wątroby</b>		
<i>HNF1A</i> (rs2464196)	Genotyp AA: zaawansowane włóknienie i aktywność zapalna	3
<i>HNF1A</i> (rs7310409)	Genotyp AA: nasilona aktywność zapalna	3
<i>TDP2</i> (rs1047782)	Genotyp GG: nasilona aktywność zapalna	3
<i>XRCC1</i> (rs25487)	Genotyp TT: marskość	7
<i>ERCC2</i> (rs238406)	Genotyp GG: marskość	7
<i>NBN</i> (rs2735383)	Genotyp GG: marskość	7
<i>DIO2</i> (rs225014)	Genotyp TT: zaawansowane włóknienie	8
<i>GADD45A</i> (rs532446)	Genotyp TT: marskość	8
<i>PPARG</i> (rs10865710)	Genotyp CC: zaawansowane włóknienie	8
<i>ATF3</i> (rs11119982)	Genotyp TT: marskość	8
<i>TNF-α</i> (rs1799964)	Genotyp TT: nasilona aktywność zapalna	4
<i>TNF-α</i> (rs1800630)	Genotyp CC: nasilona aktywność zapalna	4
<i>TNF-α</i> (rs1799724)	Genotyp CT: nasilona aktywność zapalna	4
<i>IL-10</i> (rs1800871)	Genotyp TT: włóknienie wątroby o mniejszym nasileniu	5
<i>IL-10</i> (rs1800872)	Genotyp AA: włóknienie wątroby o mniejszym nasileniu	5
<i>IL-10</i> (rs3024490)	Genotyp TT: włóknienie wątroby o mniejszym nasileniu	5
<i>IL-10</i> (rs1518110)	Genotyp TT: włóknienie wątroby o mniejszym nasileniu	5
<b>cccDNA HBV</b>	Mutacja G1764A: nasilona aktywność zapalna	2
<b>Markery odpowiedzi na leczenie</b>		
<i>NTCP</i> (rs7154439)	Genotyp AA: częstsza serokonwersja HBeAg (NRTI)	3
<i>TDP2</i> (rs3087943)	Genotyp AA: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	3
<i>HNF1A</i> (rs1169288)	Genotyp TT: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	3
<i>HNF1A</i> (rs7310409)	Genotyp GG: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	3
<i>IL-10</i> (rs1800871)	Allel T: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	5
<i>IL-10</i> (rs1800872)	Allel A: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	5
<i>IL-10</i> (rs3024490)	Allel T: częstsza eliminacja HBsAg (Peg IFN α2a)	5
<i>HNF4A</i> (rs1800961)	Allel T: trwała odpowiedź na leczenie	3
<b>Markery wiremii i replikacji wirusa</b>		
<i>TNF-α</i> (rs1799964)	Genotyp TT: wyższy poziom HBV DNA	4
<i>TNF-α</i> (rs1800630)	Genotyp CC: wyższy poziom HBV DNA	4
<i>IL-10</i> (rs1800896)	Genotyp AA: niższy poziom HBV DNA	5
<i>IL-10</i> (rs1800893)	Genotyp CC: niższy poziom HBV DNA	5
<b>cccDNA HBV</b>	Mutacja G1764A: podwyższony poziom enzymów wątrobowych	2
<i>AKT3</i> (rs12031994)	Genotyp TT: wyższy poziom HBsAg	8

Kluczowe osiągnięcia przedstawionego wniosku habilitacyjnego:

- Opracowanie czulej metody analizy formy cccDNA genomu HBV.
- Wykrycie i porównanie różnic sekwencyjnych między formami rcDNA i cccDNA HBV oraz ich znaczenia w przebiegu choroby i terapii.
- Identyfikacja genetycznych uwarunkowań gospodarza wpływających na przebieg zakażenia, progresję choroby oraz odpowiedź na leczenie.
- Zdefiniowanie znaczenia polimorfizmów SNP (*TDP2*, *NTCP*, *HNF1A*, *HNF4A*) dla przebiegu klinicznego HBV.
- Określenie wpływu polimorfizmów *TNF-α* na przewlekłość zakażenia i odpowiedź na leczenie.
- Analiza polimorfizmów *IL-10* w kontekście przebiegu zakażenia i skuteczności terapii przeciwwirusowej.
- Zbadanie roli polimorfizmów genów naprawy DNA (*ERCC2*, *XRCC1*, *NBN*) w ryzyku marskości i progresji zwłóknienia.
- Identyfikacja nowych biomarkerów ryzyka progresji choroby, umożliwiających personalizację leczenia i monitorowanie pacjentów.

#### 4.4 Opis pozostałego dorobku i osiągnięć naukowych

Po uzyskaniu stopnia doktora moja działalność naukowa znacząco się rozszerzyła i objęła udział w licznych projektach badawczych oraz publikacjach, co przyczyniło się do pogłębienia mojego doświadczenia i rozwoju umiejętności badawczych. Po zakończeniu realizacji międzynarodowego projektu INFECT-ERA, w którym uczestniczyłam najpierw jako asystent (w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora), a następnie jako adiunkt, kontynuowałam pracę jako pracownik naukowo-techniczny w Zespole Laboratoriów Specjalistycznych, w Laboratorium Analiz Genetycznych. W ramach tej roli brałam udział w różnych projektach badawczych, wspierając zespoły naukowe w realizacji badań genetycznych, opracowywaniu wyników oraz przygotowywaniu publikacji naukowych. Moje zaangażowanie obejmowało zarówno aspekty praktyczne prowadzenia badań laboratoryjnych, jak i wsparcie merytoryczne w planowaniu eksperymentów oraz analizie danych. Pozostałą część mojego dorobku stanowi 7 oryginalnych prac doświadczalnych, które nie zostały uwzględnione w cyklu publikacyjnym przedstawionym w punkcie 4.2 niniejszego dokumentu. Artykuły opublikowane zostały w latach 2021-2025, a ich sumaryczny współczynnik IF wynosi **32,618**.

Na szczególną uwagę wśród prac spoza cyklu zasługują trzy prace związane z tematyką **nowoczesnych metod diagnostycznych i prognostycznych w chorobach zakaźnych**, w szczególności wirusowych. Prace te dotyczą innowacyjnych podejść diagnostycznych, w tym wykorzystania technik molekularnych oraz identyfikacji markerów prognostycznych w przewlekłych infekcjach wirusowych, takich jak zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) czy SARS-CoV-2.

##### Wykaz prac oraz ich opis:

1. **Rybicka M**, Miłosz E, Bielawski KP. Superiority of MALDI-TOF Mass Spectrometry over Real-Time PCR for SARS-CoV-2 RNA Detection. *Viruses*. 2021 Apr 22;13(5):730. doi: 10.3390/v13050730. PMID: 33922195; PMCID: PMC8145549. IF<sub>2021</sub>=5,818 MEiN<sub>2021</sub>=100

**Mój wkład w publikację:** Pełniłam wiodącą rolę w całym procesie badawczym: od zaprojektowania koncepcji badania, poprzez opracowanie metodologii i oprogramowania, aż po nadzór nad realizacją projektu. Byłam odpowiedzialna za analizę danych, walidację wyników, przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie danych oraz przygotowanie oryginalnego manuskryptu. Uczestniczyłam również w przeglądzie i redakcji tekstu, wizualizacji wyników, administracji projektem oraz pozyskaniu finansowania. Pełniłam także funkcję autora korespondencyjnego.

2. Wróblewska A, Woziwodzka A, **Rybicka M**, Bielawski KP, Sikorska K. Polymorphisms Related to Iron Homeostasis Associate with Liver Disease in Chronic Hepatitis C. *Viruses*. 2023 Aug 9;15(8):1710. doi: 10.3390/v15081710. PMID: 37632052; PMCID: PMC10457817. IF<sub>2023</sub>=3,8 MEiN<sub>2023</sub>=100

**Mój wkład w publikację:** W ramach pracy zespołowej brałam udział w opracowaniu metodologii badania, przeprowadzeniu eksperymentów oraz walidacji wyników. Uczestniczyłam również w redakcji i korekcie manuskryptu.

3. Wróblewska A, Gliwiński M, **Rybicka M**, Cheba M, Lorenc B, Trzonkowski P, Bielawski KP, Sikorska K. Residual HCV-RNA and Elevated Platelet-to-Lymphocyte Ratio Predict Poor Long-Term Outcomes in Patients with Chronic Hepatitis C After Treatment. *Infect Dis Ther.* 2025 Jan;14(1):305-315. doi:10.1007/s40121-024-01101-2. Epub 2024 Dec 26. PMID: 39725828; PMCID: PMC11782785. IF<sub>2024</sub>=5,3 MEiN<sub>2024</sub>=140

**Mój wkład w publikację:** W ramach pracy zespołowej brałam udział w opracowaniu koncepcji i metodologii badania, przygotowaniu próbek do badania, zbieraniu i analizie danych. Uczestniczyłam również w redakcji i korekcie manuskryptu.

Sumaryczny IF publikacji: 14,918

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 300

Pierwszy artykuł, "**Superiority of MALDI-TOF Mass Spectrometry over Real-Time PCR for SARS-CoV-2 RNA Detection**" (*Viruses*, 2021), przedstawia porównanie skuteczności diagnostycznej techniki spektrometrii mas typu MALDI-TOF z zatwierdzoną klinicznie metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym w wykrywaniu SARS-CoV-2. Grupa badana obejmowała 168 pacjentów z podejrzeniem zakażenia i objawami infekcji dróg oddechowych. Przy równoczesnej analizie tych samych próbek obiema metodami uzyskano rozbieżne wyniki w 17 przypadkach, co stanowiło 10,12% wszystkich analizowanych próbek. Spośród 15 próbek oficjalnie zgłoszonych jako wstępnie dodatnie, 13 uzyskało wynik dodatni w teście opartym o spektrometrię mas. Ponadto dwie próbki uznane za ujemne w zatwierdzonym teście RT-PCR były pozytywne w teście spektrometrii mas. Badanie jednoznacznie wykazało wyższą czułość testu opartego na spektrometrii mas w wykrywaniu SARS-CoV-2, wskazując, że technologia MALDI-TOF MS może być idealnym narzędziem nie tylko do detekcji wirusa, ale także do identyfikacji mutacji w jego genomie. Ta sama technologia (MALDI-TOF MS) wykorzystana została w pracy pt. "**Polymorphisms Related to Iron Homeostasis Associate with Liver Disease in Chronic Hepatitis C**" (*Viruses*, 2023). Jej zastosowanie dotyczyło analizy polimorfizmów genetycznych związanych z metabolizmem żelaza jako potencjalnych czynników ryzyka uszkodzenia wątroby w przebiegu zakażenia HCV. Uzyskane wyniki pokazały zależność określonych wariantów genetycznych (np. w genach *HDAC3* i *CYBRD1*) z nasileniem zmian histopatologicznych, podwyższonym ryzykiem rozwoju HCC oraz zmianami w ekspresji receptorów immunologicznych w wątrobie. Wyniki te sugerują, że indywidualna podatność genetyczna może istotnie wpływać na przebieg przewlekłego zakażenia HCV i powinna być brana pod uwagę przy ocenie ryzyka progresji choroby. Trzecia publikacja, "**Residual HCV-RNA and elevated platelet-to-lymphocyte ratio predict poor long-term outcomes in patients with chronic hepatitis C after treatment**" (*Infectious Diseases and Therapy*, 2025),

koncentruje się na określeniu roli obecności resztkowego RNA wirusa HCV w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC), czyli tzw. utajonego zapalenia wątroby typu C (ang. occult hepatitis C virus infection, OCI), oraz wskaźników prognostycznych u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV po zakończeniu leczenia bezpośrednio działającymi lekami przeciwwirusowymi (ang. direct acting antiviral, DAA). Obserwacji poddano 42 pacjentów, u których po terapii oceniano status OCI, przez medianę 6,3 roku. Wykazano, że obecność resztkowego HCV RNA (>12 tygodni po terapii) wiąże się z pięciokrotnie wyższym ryzykiem progresji włóknienia wątroby oraz podwyższonym wskaźnikiem płytkowo-limfocytowy (ang. platelet-to-lymphocyte ratio, PLR), który był silnie związany z niekorzystnymi wynikami klinicznymi, w tym progresją choroby wątroby i zwiększoną śmiertelnością. Praca ta podkreśla konieczność długoterminowego monitorowania pacjentów po leczeniu HCV oraz poszukiwania nowych, nieinwazyjnych markerów ryzyka.

Przedstawione publikacje tworzą logiczny ciąg badań – od zastosowania nowoczesnych narzędzi diagnostycznych (MALDI-TOF MS do detekcji SARS-CoV-2), przez identyfikację markerów prognostycznych (resztkowe HCV RNA, PLR) po analizę czynników genetycznych wpływających na ryzyko powikłań w przewlekłych infekcjach wirusowych (HCV). Cykl ten odzwierciedla aktualne trendy w medycynie laboratoryjnej i klinicznej, gdzie kluczowe znaczenie mają: precyzyjna diagnostyka molekularna, personalizacja oceny ryzyka oraz integracja danych genetycznych i immunologicznych w codziennej praktyce klinicznej.

Obecnie poszerzam swoje zainteresowania badawcze o **innowacyjne metody leczenia, obejmujące rozwój nowych leków przeciwnowotworowych, terapii biologicznych oraz substancji o potencjale przeciwdrobnoustrojowym**. W ramach nawiązanej współpracy naukowej z prof. dr hab. Martą Fiołką (Katedra Immunobiologii Instytutu Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie ) brałam udział w badaniach nad nowatorskim lekiem przeciwnowotworowym – Venetin-1, który jest nanocząsteczkowym kompleksem białkowo-polisacharydowym wyizolowanym z płynu celomatycznego dżdżownicy. W ramach przeprowadzonych badań wykazano, że Venetin-1 ma silne działanie przeciwnowotworowe wobec niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo* (***Scientific Reports* 2022**). Pogłębiona analiza molekularnych mechanizmów działania Venetin-1 na komórki raka płuca linii A549 pozwoliła zidentyfikować szlaki sygnałowe i białka, których ekspresja ulega istotnym zmianom pod wpływem leczenia Venetin-1 (***Frontiers in Molecular Biosciences* 2023**). Kolejnym analizowanym przeze mnie związkiem był kwas oleanolowy – naturalny związek o właściwościach neuroprotektoryjnych. Uzyskane w badaniach wyniki potwierdziły, że kwas oleanolowy chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem oksydacyjnym i apoptozą, a jego skuteczność potwierdzono w modelu zwierzęcym chorób neurodegeneracyjnych (***Pharmaceuticals* 2023**). Ostatnia z publikacji

(*International Journal of Molecular Sciences* 2025) dotyczy zastosowania przeciwciał IgY pozyskiwanych z żółtka jaja kurzego w zwalczaniu patogenów odzwierzęcych, takich jak *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*. W badaniach *in vitro* wykazano, że przeciwciała te skutecznie hamują wzrost bakterii, co potwierdza ich potencjał jako alternatywy dla antybiotyków w profilaktyce i terapii zakażeń. Pierwszym autorem tej publikacji jest pani Paulina Czoska, której pracy doktorskiej jestem promotorem pomocniczym. Poniżej przedstawiam najważniejsze publikacje z tego obszaru badań oraz szczegółowy opis mojego wkładu w ich powstanie.

1. **Rybicka M**, Czaplewska P, Rzymowska J, Sofińska-Chmiel W, Wójcik-Mieszawska S, Lewtak K, Węgrzyn K, Jurczak P, Szpiech A, Nowak J, Musiał N, Fiołka MJ. Novel Venetin-1 nanoparticle from earthworm coelomic fluid as a promising agent for the treatment of non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2022 Nov 2;12(1):18497. doi: 10.1038/s41598-022-21665-8. PMID: 36323731; PMCID: PMC9630273. IF<sub>2022</sub>=4,6 MEiN<sub>2022</sub>=140

**Mój wkład w publikację:** Brałam udział w opracowaniu metodologii badawczej oraz weryfikacji i walidacji wyników *in vitro*. Uczestniczyłam w realizacji badań eksperymentalnych, współpracując w ramach zespołu badawczego. Mój udział obejmował także wsparcie w procesie analizy oraz interpretacji danych. Brałam czynny udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu, przygotowałam Figury: 1,2,3,5 oraz Tabelę 1. Uczestniczyłam także w korekcie manuskryptu po otrzymanych recenzjach.

2. Czaplewska P, Bogucka A, Macur K, **Rybicka M**, Rychłowski M, Fiołka MJ. Proteomic response of A549 lung cancer cell line to protein-polysaccharide complex Venetin-1 isolated from earthworm coelomic fluid. *Front Mol Biosci.* 2023 Jun 8;10:1128320. doi: 10.3389/fmolb.2023.1128320. PMID: 37377864; PMCID: PMC10292018. IF<sub>2023</sub>=3,9 MEiN<sub>2023</sub>=140

**Mój wkład w publikację:** : Opracowałam metodologię badawczą oraz weryfikację i walidację wyników *in vitro*. Uczestniczyłam w realizacji badań eksperymentalnych, współpracując w ramach zespołu badawczego. Mój udział obejmował także wsparcie analizy oraz interpretacji danych. Brałam czynny udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu, przygotowałam Figury: 1, 2, 3. Uczestniczyłam także w korekcie manuskryptu po otrzymanych recenzjach.

3. Stępnik K, Kukula-Koch W, Plazinski W, **Rybicka M**, Gawel K. Neuroprotective Properties of Oleanolic Acid-Computational-Driven Molecular Research Combined with In Vitro and In Vivo Experiments. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Aug 31;16(9):1234. doi: 10.3390/ph16091234. PMID: 37765042; PMCID: PMC10536188. . IF<sub>2023</sub>=4,3; MEiN<sub>2023</sub>=140

**Mój wkład w publikację:** Opracowałam metodologię badawczą oraz weryfikację i walidację wyników *in vitro*. Uczestniczyłam w realizacji badań eksperymentalnych, współpracując w ramach zespołu badawczego. Mój udział obejmował także wsparcie analizy oraz interpretacji danych. Brałam czynny udział w pisaniu pierwotnej wersji manuskryptu, przygotowałam Figury: 5 i 6. Uczestniczyłam także w korekcie manuskryptu po otrzymanych recenzjach.

4. Czoska P, Tarsalewska K, Ponichtera M, **Rybicka M\***, Sowa-Rogozinska N, Sominka-Pierzchlewicz H, Stodolna A, Ogonowska P, Kosciuk A, Glosnicka R, Bielawski KP. Growth-Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Polyclonal Antibodies (IgY) on Zoonotic Pathogens *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*, In Vitro. Int J Mol Sci. 2025 Jan 25;26(3):1040. doi: 10.3390/ijms26031040. PMID: 39940808; PMCID: PMC11816624. IF<sub>2025</sub>= 4,9; MEiN<sub>2025</sub>=140

**Mój wkład w publikację:** Uczestniczyłam w analizie i interpretacji danych badawczych we współpracy z całym zespołem autorów. Współtworzyłam pierwszą wersję manuskryptu, opracowując jego strukturę, argumentację oraz treść merytoryczną w oparciu o wyniki eksperymentalne. Moja rola obejmowała również integrację wyników z aktualnym stanem wiedzy oraz przygotowanie tekstu do dalszej redakcji i recenzji wewnętrznej. Pełniłam także funkcję autora korespondencyjnego. Pierwszym autorem pracy jest doktorantka, której jestem kopromotorem w ramach realizowanego przewodu doktorskiego – w związku z tym aktywnie wspierałam jej rozwój naukowy, merytorycznie nadzorując opracowanie publikacji.

Sumaryczny IF publikacji: 17,7

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 560

#### **4.5 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.**

W roku 2015, krótko przed obroną doktoratu, odbyłam 3-miesięczny staż w grupie prof. Michaela Nassala w Laboratorium Biologii Molekularnej II Katedry Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Centrum Medycznego we Fryburgu Bryzgowijskim. Środki na sfinansowanie wyjazdu pozyskałam z Narodowego Centrum Nauki, będąc laureatką stypendium ETIUDA2 (UMO-2014/12/T/NZ7/00335). Podczas stażu byłam zaangażowana w projekt, którego celem była identyfikacja nowych genów człowieka zaangażowanych w proces powstawania formy cccDNA wirusa HBV. Mój udział polegał na modyfikacji genomu HBV w taki sposób, aby przy zachowaniu wysokiego potencjału replikacyjnego wirusa umożliwiające tworzenie formy cccDNA *in vitro*, umożliwiał on jednocześnie łatwe monitorowanie procesu infekcji w komórkach hepatocytów. Każdy ze zmodyfikowanych przeze mnie plazmidów HBV analizowałam pod kątem jego zdolności do replikacji, tworzenia wszystkich pośrednich form replikacyjnych oraz syntezy białek wirusowych. **Wyniki wykonanych przeze mnie w trakcie stażu badań stanowiły podstawę do stworzenia wydajnego systemu infekcji wirusem HBV, co jest niezbędne do lepszego zrozumienia mechanizmów związanych z replikacją wirusa.** Praca nad tym systemem pozwoliła mi pogłębić wiedzę na temat mechanizmów tworzenia formy cccDNA, która jest kluczową strukturą w przebiegu zakażeń. Doświadczenie zdobyte podczas stażu umożliwiło mi rozszerzenie badań o szczegółową analizę sekwencji cccDNA wirusa HBV. Zebrane dane wskazują, że to właśnie sekwencja cccDNA, a nie krążąca

zrelaksowana forma HBV DNA (rcDNA), odgrywa kluczową rolę w przebiegu terapii przeciwwirusowej. Staż ten był niezwykle cennym doświadczeniem – nie tylko ugruntował moje zainteresowania badawcze i pozwolił mi opanować nowe metody analityczne, ale także umożliwił nawiązanie wartościowych relacji zawodowych, które zaowocowały w kolejnych latach. Kluczowe okazały się liczne rozmowy z prof. Nassalem, które znacząco wpłynęły na dalszy kierunek moich badań nad sekwencją cccDNA. Jego wsparcie i mentorskie podejście odegrały istotną rolę w kształtowaniu moich naukowych zainteresowań i pomysłów badawczych. W trakcie pobytu brałam udział w wielu seminariach dotyczących prowadzonych badań, gdzie kilkakrotnie prezentowałam swoje wyniki i prowadziłam dyskusje na temat uzyskanych rezultatów. Uzyskane w trakcie stażu wyniki badawcze miały kluczowe znaczenie dla opisanego po raz pierwszy w literaturze naukowej różnic sekwencyjnych między kowalencyjnie zamkniętą kolistą formą DNA (cccDNA) a formą zrelaksowaną (rcDNA) wirusa HBV oraz ich znaczenia dla patogenezы i terapii zakażenia (Publikacja nr 2 z cyklu). Metoda selektywnego trawienia rcDNA egzonukleazą T5 umożliwiła precyzyjną izolację cccDNA, co pozwoliło na identyfikację mutacji obecnych wyłącznie w tej formie wirusowego DNA. Te mutacje, często niewykrywalne w osoczu, pełnią rolę rezerwuaru oporności na leczenie i wpływają na przebieg kliniczny chronicznego zakażenia HBV. Praca ta nie powstałaby bez wiedzy i umiejętności, które zdobyłam dzięki stażowi. Choć prof. Nassal nie jest jej współautorem, jego wsparcie merytoryczne, konstruktywne uwagi oraz inspirujące rozmowy odegrały istotną rolę w jej powstaniu.

W latach 2014–2018 byłam jednym z głównych wykonawców polskiego zespołu w międzynarodowym projekcie badawczym INFECT-ERA (nr Infect-Era/01/2014). W ramach projektu nawiązałam ścisłą współpracę z profesorem Thomasem Baumertem z INSERM w Strasburgu, dzięki czemu uzyskałam dostęp do próbek klinicznych zebranych w ramach francuskiego projektu HEPATHER (Therapeutic Option for Hepatitis B and C: a French Cohort, NCT01953458). Pozyskanie tych próbek znacząco poszerzyło oraz zróżnicowało analizowaną w ramach projektu grupę pacjentów. Dysponując tak liczną grupą badaną oraz wynikami badań wstępnych, kontynuowaliśmy rozpoczętą współpracę w ramach projektu HIPShot (Hbv genetic and Proteomic Screen, nr projektu 7. Projekt był koordynowany przez prof. Baumerta. Wymiernym rezultatem nawiązanej współpracy są trzy publikacje zawarte w cyklu stanowiącym podstawę osiągnięcia naukowego (Publikacje nr 5, 7, 8).

Od 2023 roku jestem ekspertem w zakresie diagnostyki genetycznej nowotworów w Pracowni Badań w Medycynie Narządowej (Core Facility Organ Specific Medicine Laboratory), Katedry i Kliniki Chirurgii Onkologicznej, Transplantacyjnej i Ogólnej na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Laboratorium to powstało w ramach programu Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza i specjalizuje się w badaniach translacyjnych, łącząc wiedzę kliniczną z dostępem do próbek biologicznych oraz danych pacjentów. W tym laboratorium odbyłam też trzymiesięczny staż, który umożliwił mi zdobycie kluczowego doświadczenia i praktycznych umiejętności. W ramach współpracy

z doświadczonymi chirurgami — prof. Jarosławem Kobiela oraz dr. n. med. Piotrem Spychalskim, specjalistami w leczeniu raka jelita grubego — realizuję wspólne projekty badawcze ukierunkowane na tworzenie i wdrażanie nowoczesnych metod diagnostycznych oraz monitorowania pacjentów z tym nowotworem. Opracowałam dotychczas metodę ilościowego oznaczania ctDNA opartą na powtórzeniach ALU, która umożliwia precyzyjne określenie poziomu ctDNA w okołoperacyjnych próbkach biopsji płynnej. Dzięki tej metodzie możliwa jest identyfikacja trendów w stężeniu ctDNA, które korelują z zaawansowaniem choroby. Aktualnie porównuję skuteczność tej autorskiej metody z komercyjnym zestawem ddPCR KRAS G12/G13 Screening Kit firmy Bio-Rad w celu dalszej analizy i walidacji obu rozwiązań. Celem współpracy z zespołem chirurgów jest zwiększenie dokładności i skuteczności okołoperacyjnego monitorowania, co może znacząco wpłynąć na jakość diagnostyki i terapii pacjentów z rakiem jelita grubego. Dotychczas nie opublikowano wyników tej współpracy, ponieważ czekamy na wyraźny, mierzalny efekt leczenia pacjentów.

## **5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### **5.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

#### **Przedmioty nauczane w ramach pensum dydaktycznego**

Od czasu zatrudnienia na stanowisku adiunkta (2021) w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej jestem koordynatorem obowiązkowego przedmiotu Diagnostyka molekularna, który jest skierowany do studentów pierwszego roku uzupełniających studiów magisterskich na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, MWB UG i GUMed. W ramach przedmiotu prowadzę wykłady w języku angielskim, jak również prowadzę grupy ćwiczeniowe (w języku polskim i języku angielskim). Jako koordynator przedmiotu, jestem odpowiedzialna za przygotowanie materiałów dydaktycznych oraz ciągłe doskonalenie treści przedstawianych studentom. Ponadto prowadzę również wykłady z Podstaw diagnostyki laboratoryjnej dla III roku studiów pierwszego stopnia na kierunku Biotechnologia (MWB UG i GUMed). Uczestniczyłam także w tworzeniu dwóch przedmiotów na nowym kierunku Marine Biotechnology (studia drugiego stopnia, od 2023 roku) prowadzonym przez Wydział Oceanografii i Geografii oraz MWB UG i GUMed. Studia te prowadzone są całkowicie w języku angielskim. W ramach kierunku prowadzę część wykładów oraz grupy ćwiczeniowe z przedmiotu Pathology and molecular diagnostics of aquatic organisms.

**Opieka nad dyplomantami oraz kształcenie kadr**

**Promotor pomocniczy przewodu doktorskiego** pt: „Zakażenia bakteriami *Campylobacter jejuni* – badania oddziaływań bakterii, przeciwciał i układu odpornościowego” – praca w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia – w trakcie (planowana obrona pod koniec 2025 r.) – mgr Paulina Czoska.

**Promotor 7 prac magisterskich na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed:**

- 2020: Maria Marimon Castelltort
- 2022: Zuzanna Szafranek
- 2023: Patrycja Markiewicz, Ainhoa Gomez Garcia
- 2024: Julia Sadowska
- 2025: Rozalia Richert, Stefania Jackowska

**Promotor 9 prac licencjackich na kierunku Biotechnologia MWB UG-GUMed:**

- 2022: Julia Sadowska, Ewelina Chodowiec
- 2023: Weronika Dukat, Rozalia Richert, Ewa Nowak
- 2024: Marta Rolbecka, Natalia Buć
- 2025: Szymon Niemczuk, Aleksandra Bondyra

**Recenzent pracy magisterskiej** mgr Martyny Muszyńskiej (2023)

**5.2. Osiągnięcie organizacyjne**

- Udział w organizacji warsztatów dla osób z Uniwersytetu Gdańskiego oraz osób z zewnątrz: 29-31.10.2013 i 14-16.01.2014.
- Organizacja oraz prowadzenie warsztatów ze spektrometrii mas dla osób z Uniwersytetu Gdańskiego oraz osób z zewnątrz: 27.03.2014
- Organizacja oraz prowadzenie szkolenia dla studentów MWB UG i GUMed w dniach 22-23.04.2023 - Zastosowania spektrometrii mas do analizy DNA

**5.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę**

- Udział w organizacji zajęć naukowych dla uczniów klasy 6B z II Społecznej Szkoły Podstawowej STO w Gdańsku. Odbyły się one 8 lutego 2023 roku na terenie Instytutu Biotechnologii.

- 6. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.**

### 6.1 Udział w projektach i grantach badawczych

#### Udział w krajowych projektach badawczych:

- **2014-2017 PRELUDIUM 6 (kierownik i wykonawca)** – źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki (2013/11/N/NZ7/00377). W ramach projektu byłam odpowiedzialna za gromadzenie materiału do badań, opracowanie i przeprowadzanie eksperymentów, analizę oraz interpretację uzyskanych wyników. Sporządzałam raporty dla Narodowego Centrum Nauki, przygotowywałam manuskrypty oraz prezentowałam wyniki badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych.
- **2018-2020 OPUS (wykonawca)** – źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki National (2016/22/E/HS6/00237). W tym projekcie byłam odpowiedzialna za wszystkie analizy genetyczne. Planowałam wszystkie eksperymenty, rozwijałam i optymalizowałam procedury badawcze, analizowałam dane i pisałam manuskrypty.

#### Udział w projektach międzynarodowych:

- **2013-2016 MOBI4HEALTH (wykonawca projektu)** – źródło finansowania: Komisja Europejska, 7. Program Ramowy UE w ramach konkursu REGPOT (FP7-REGPOT-2012-2013-1). W ramach MOBI4Health aktywnie uczestniczyłam w organizacji i realizacji wydarzeń naukowych, takich jak konferencje i warsztaty, które sprzyjały integracji Wydziału z Europejską Przestrzenią Badawczą. Ukończyłam liczne kursy specjalistyczne z zakresu technik spektrometrii mas, co umożliwiło mi realizację wyspecjalizowanych projektów badawczych. Zdobytym doświadczeniem dzieliłam się, prowadząc warsztaty zarówno dla pracowników uczelni, jak i osób spoza Uniwersytetu Gdańskiego. Ponadto, aktywnie rozpowszechniałam informacje o nowoczesnej infrastrukturze badawczej Wydziału Biotechnologii podczas licznych konferencji krajowych i międzynarodowych.
- **2014-2018 INFECT-ERA (wykonawca projektu)** – źródło finansowania: Komisja Europejska, 7. Program Ramowy UE w ramach konkursu Infect-ERA (Infect-Era/01/2014). Moja rola obejmowała planowanie, optymalizację i realizację eksperymentów, nadzór nad zbieraniem materiału do badań w Polsce, stworzenie i prowadzenie bazy danych oraz przeprowadzanie analiz statystycznych. Byłam odpowiedzialna za przygotowanie i składanie wniosków do francuskiej komisji bioetycznej oraz koordynację transferu próbek z Francji do Polski. Regularnie reprezentowałam polski zespół na spotkaniach projektowych – zarówno podczas wideokonferencji, jak i stacjonarnych spotkań w Strasbourgu – gdzie prezentowałam wyniki uzyskane przez naszą grupę badawczą na forum międzynarodowym. Udział w tych spotkaniach

umożliwił mi aktywną wymianę doświadczeń i pomysłów z partnerami zagranicznymi, co znacząco wzbogaciło naszą współpracę naukową i przyczyniło się do osiągnięcia celów projektu. Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu INFECT-ERA stały się podstawą do przygotowania kilku publikacji oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej, a także stanowią fundament do dalszej współpracy naukowej w ramach kolejnych międzynarodowych projektów, m.in. HIPShot, koordynowanego przez prof. Baumerta.

### 3.1. Nagrody i wyróżnienia

#### Nagrody i stypendia:

- Stypendium z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych dla najlepszych doktorantów w roku akademickim 2011/2012, 2013/2014 i 2014/2015 – Uniwersytet Gdański
- Stypendium naukowe na rok akademicki 2011/2012, 2013/2014 i 2014/2015 – Uniwersytet Gdański
- Stypendium dla doktorantów w ramach Projektu „Kształcimy najlepszych – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego, 2010/2011
- Stypendium Marszałka Województwa Pomorskiego „Innodoktorant V”, 2012/2013
- Stypendium naukowe ETIUDA 2 przyznane przez Narodowe Centrum Nauki (2014/12/T/NZ7/00335), 2014/2015
- Zagraniczne stypendium *EASL Award for Young Investigators* – bursary przyznane przez European Association for the Study of the Liver na udział w EASL Basic School of Hepatology: Molecular Biology and Pathogenesis of Hepatitis Viruses, Szwajcaria, 5–7.02.2015
- Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Gdańskiego I stopnia, 2021, 2023, 2024
- Zespołowa Nagroda Rektora Uniwersytetu Gdańskiego II stopnia, 2022, 2025

#### Nagrody konferencyjne:

- Wyróżnienie za plakat naukowy, Falk Symposium 195: *Challenges and Management of Liver Cirrhosis*, Freiburg, Niemcy, 10–11.10.2014.
- Wyróżnienie za plakat naukowy, Falk Symposium *New Treatment Targets in Gut and Liver Disease*, Lucerna, Szwajcaria, 21–22 października 2016

#### 6.4 Recenzowanie manuskryptów naukowych:

Recenzowałam do tej pory 30 manuskryptów naukowych złożonych do druku w czasopismach międzynarodowych takich jak Scientific Reports, International Journal of Biological Sciences, Clinical and Experimental Gastroenterology, Journal of Hepatocellular Carcinoma, OncoTargets and Therapy, Discover Oncology, BMC Infectious Diseases oraz innych.

#### 7. Analiza bibliometryczna publikacji przedstawionych we wniosku

Prace stanowiące podstawę osiągnięcia habilitacyjnego IF: 34,433

Prace stanowiące pozostały dorobek naukowy IF: 32,618

Całkowity dorobek IF: 67,051

Punktacja ministerialna: 1552

Indeks Hirscha: 8

.....  
(podpis wnioskodawcy)

#### 8. Bibliografia

1. Hsu YC, Huang DQ, Nguyen MH. Global burden of hepatitis B virus: current status, missed opportunities and a call for action. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Apr 4];20(8):524–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37024566/>
2. Al-Busafi SA, Alwassief A. Global Perspectives on the Hepatitis B Vaccination: Challenges, Achievements, and the Road to Elimination by 2030. *Vaccines (Basel)* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 Apr 4];12(3):288. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10975970/>
3. Rizzo GEM, Cabibbo G, Craxì A. Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. *Viruses* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 Apr 4];14(5):986. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9146458/>
4. Ecdc. Evidence brief - prevention of hepatitis B and C in Europe and the UK. 2024;
5. Kumar M, Pahuja S, Khare P, Kumar A. Current Challenges and Future Perspectives of Diagnosis of Hepatitis B Virus. *Diagnostics* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 Apr 10];13(3):368. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9914745/>
6. Hudu SA, Shinkafi SH, Jimoh AO. A critical review of diagnostic and prognostic markers of chronic hepatitis B infection. *Medical Review* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2025 Apr 10];4(3):225–34. Available from: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/mr-2024-0022/html>
7. Shi W, Li K, Zhang Y. Current tests for diagnosis of hepatitis B virus infection and immune responses of HBV-related HCC. *Front Oncol* [Internet]. 2023 [cited 2025 Apr 10];13:1185142. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10715814/>
8. Li J, Liu S, Zang Q, Yang R, Zhao Y, He Y. Current trends and advances in antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Chin Med J (Engl)* [Internet]. 2024 Dec 5 [cited 2025 Apr 11];137(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38945693/>
9. Wong GLH, Lemoine M. The 2024 updated WHO guidelines for the prevention and management of chronic hepatitis B: Main changes and potential implications for the next major liver society clinical practice guidelines. *J Hepatol* [Internet]. 2024 [cited 2025 Apr 11]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39647534/>
10. Pan Y, Xia H, He Y, Zeng S, Shen Z, Huang W. The progress of molecules and strategies for the treatment of HBV infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 Mar 15;13:1128807.

11. Saeed U, Piracha ZZ, Khan M, Tariq MN, Gilani SS, Raza M, et al. Cracking the code of HBV persistence: cutting-edge approaches to targeting cccDNA in chronic hepatitis B with or without pyogenic liver Abscesses. *Front Med (Lausanne)*. 2025 Mar 17;12:1504736.
12. You H, Wang F, Li T, Xu X, Sun Y, Nan Y, et al. Guidelines for the Prevention and Treatment of Chronic Hepatitis B (version 2022). *J Clin Transl Hepatol [Internet]*. 2023 Nov 1 [cited 2025 Apr 11];11(6):1425. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10500285/>
13. Easterbrook PJ, Luhmann N, Bajis S, Min MS, Newman M, Lesi O, et al. WHO 2024 hepatitis B guidelines: an opportunity to transform care. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2024 Jun 1;9(6):493–5.
14. Verrier ER, Ligat G, Heydmann L, Doernbrack K, Miller J, Maglott-Roth A, et al. Cell-based cccDNA reporter assay combined with functional genomics identifies YBX1 as HBV cccDNA host factor and antiviral candidate target. *Gut [Internet]*. 2022 Sep 1 [cited 2025 Apr 11];72(9):1745. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10423543/>
15. Wang YX, Niklasch M, Liu T, Wang Y, Shi B, Yuan W, et al. Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication. *J Hepatol [Internet]*. 2020 May 1 [cited 2025 Apr 11];72(5):865–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31863794/>
16. Wei L, Ploss A. Core components of DNA lagging strand synthesis machinery are essential for hepatitis B virus cccDNA formation. *Nat Microbiol [Internet]*. 2020 May 1 [cited 2025 Apr 11];5(5):715–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32152586/>
17. Margeridon S, Carrouée-Durantel S, Chemin I, Barraud L, Zoulim F, Trépo C, et al. Rolling Circle Amplification, a Powerful Tool for Genetic and Functional Studies of Complete Hepatitis B Virus Genomes from Low-Level Infections and for Directly Probing Covalently Closed Circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother [Internet]*. 2008 Sep [cited 2025 Apr 18];52(9):3068. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2533481/>
18. Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, Goedert JJ, Whitby D, Ortiz-Conde BA. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Hepatitis B Virus Genotypes A to G. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2006 Sep [cited 2025 Apr 22];44(9):3325. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1594718/>
19. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol [Internet]*. 1991 [cited 2025 Jun 4];13(3):372–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1808228/>
20. Wei L, Ploss A. Mechanism of Hepatitis B Virus cccDNA Formation. *Viruses [Internet]*. 2021 Aug 1 [cited 2025 May 15];13(8):1463. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8402782/>
21. Königer C, Wingert I, Marsmann M, Rösler C, Beck J, Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct;111(40):E4244–53.
22. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife [Internet]*. 2012 Nov 13 [cited 2025 Apr 11];3(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409679>
23. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *Journal of Biological Chemistry [Internet]*. 2001 Aug 3 [cited 2025 May 22];276(31):28857–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11387316/>
24. Ramière C, Scholtès C, Diaz O, Icard V, Perrin-Cocon L, Trabaud MA, et al. Transactivation of the Hepatitis B Virus Core Promoter by the Nuclear Receptor FXR $\alpha$ . *J Virol [Internet]*. 2008 Nov [cited 2025 May 23];82(21):10832. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2573182/>
25. Kim DH, Kang HS, Kim KH. Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol [Internet]*. 2016 Aug 21 [cited 2025 May 23];22(31):7017. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4988315/>
26. Lin J, Gu C, Shen Z, Liu Y, Wang W, Tao S, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  downregulates HBV gene expression and replication by activating the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PLoS One [Internet]*. 2017 Mar 1 [cited 2025 May 23];12(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28319127/>

27. He F, Chen EQ, Liu L, Zhou TY, Liu C, Cheng X, et al. Inhibition of hepatitis B Virus replication by hepatocyte nuclear factor 4-alpha specific short hairpin RNA. *Liver International* [Internet]. 2012 May [cited 2025 May 23];32(5):742–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22340507/>
28. Valaydon Z, Pellegrini M, Thompson A, Desmond P, Reville P, Ebert G. The role of tumour necrosis factor in hepatitis B infection: Jekyll and Hyde. *Clin Transl Immunology* [Internet]. 2016 Dec [cited 2025 Jun 17];5(12):e115. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5192060/>
29. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2020 Jan 6 [cited 2025 May 29];217(1). Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
30. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E, Goletti D, Sansone C, Calabrone L, et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol*. 2023 Jun 8;14:1161067.
31. Evans HG, Roostalu U, Walter GJ, Gullick NJ, Frederiksen KS, Roberts CA, et al. TNF- $\alpha$  blockade induces IL-10 expression in human CD4+ T cells. *Nature Communications* 2014 5:1 [Internet]. 2014 Feb 4 [cited 2025 May 29];5(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4199>
32. Wilson EB, Brooks DG. The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2025 May 29];350:39. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3492216/>
33. Carrat F, Fontaine H, Dorival C, Simony M, Diallo A, Hezode C, et al. Clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C after direct-acting antiviral treatment: a prospective cohort study. *The Lancet* [Internet]. 2019 Apr 6 [cited 2025 Jun 4];393(10179):1453–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30765123/>
34. Kaur N, Goyal G, Chawla S, Kaur R, Garg R, Tapasvi C. Potential role of noninvasive biomarkers during liver fibrosis. *World J Hepatol* [Internet]. 2021 [cited 2025 May 29];13(12):1919. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8727215/>