

# **AUTOREFERAT**

**dr n. med. Tomasz Jerzy Ślebioda**

**Katedra i Zakład Histologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Gdańsk, 2019 r.**

**1. Imię i nazwisko:** Tomasz Jerzy Ślebioda

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:**

**2004 r.** – licencjat, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

Specjalność: biotechnologia

Tytuł pracy licencjackiej: „*Zastosowanie analogów puryn i pirymidyn w terapii przeciwnowotworowej*”

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej C. Składanowski

**2006 r.** - magister biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku

Specjalność: biologia komórki

Tytuł pracy magisterskiej: „*Optymalizacja transfekcji lentiwirusowej komórek HeLa i U937*”

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Bigda

**2011 r.** – doktor nauk medycznych, University of Southampton (Wielka Brytania)

Specjalność: immunologia

Tytuł pracy doktorskiej: „*Functional analysis of TL1A/DR3 interactions during T cell-mediated responses*”

Promotor: Prof. Aymen Al-Shamkhani

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

**10/2006 – 09/2010** – doktorant, University of Southampton, School of Medicine, Cancer Sciences Division, Wielka Brytania

**10/2010 – 02/2012** – asystent, Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

**Od 03/2012** – adiunkt, Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

**4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311):**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego**

***Udział białek TL1A i VEGI-192 w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit  
i w raka jelita grubego.***

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 5 prac oryginalnych lub przeglądowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* o łącznej punktacji:

**IF = 13,146** (prace oryginalne: 7,846, prace przeglądowe: 5,3)

**Punktacja MNiSW = 115** (prace oryginalne: 70, prace przeglądowe: 45)

**W tym jako pierwszy autor: IF = 11,082** (prace oryginalne: 7,846, prace przeglądowe: 2,27), **punktacja MNiSW = 100** (prace oryginalne: 70, prace przeglądowe: 30)

**b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)**

- 1) **Tomasz Ślebioda**, A. Bojarska-Junak, M. Stanisławowski, M. Cyman, P.M. Wierzbicki, J. Roliński, K. Celiński, Z. Kmiec. TL1A as a potential local inducer of IL17A expression in colon mucosa of inflammatory bowel disease patients. *Scandinavian Journal of Immunology* (2015); 82(4): 352-360

*Swoj udział procentowy szacuję na: 70% (autor korespondencyjny)*

*Punktacja IF: 2,27*

*Punktacja MNiSW: 15*

- 2) **Tomasz Ślebioda**, A. Bojarska-Junak, M. Cyman, P. Landowski, B. Kamińska, K. Celiński, Z. Kmiec. Expression of death receptor 3 on peripheral blood mononuclear cells differs in adult IBD patients and children with newly diagnosed IBD. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* (2017); 92(2): 165-169

*Swoj udział procentowy szacuję na: 70% (autor korespondencyjny)*

*Punktacja IF: 2,757*

*Punktacja MNiSW: 30*

- 3) **Tomasz Ślebioda**, M. Stanisławowski, M. Cyman, P.M. Wierzbicki, D. Żurawa-Janicka, J. Kobiela, W. Makarewicz, M. Guzek, Z. Kmieć. Distinct expression patterns of two tumor necrosis factor superfamily member 15 gene isoforms in human colorectal cancer. *Digestive Diseases and Sciences* (2019); DOI: 10.1007/s10620-019-05507-8  
*Szacunek udział procentowy: 70% (autor korespondencyjny)*  
*Punktacja IF: 2,819*  
*Punktacja MNiSW: 25*
- 4) Z. Kmieć, M. Cyman, **Tomasz Ślebioda**. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in Medical Sciences* (2017); 62(1): 1-16  
*Szacunek udział procentowy: 45%*  
*Punktacja IF: 2,064*  
*Punktacja MNiSW: 15*
- 5) **Tomasz Ślebioda**, Z. Kmieć. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation* (2014); 2014: 325129  
*Szacunek udział procentowy: 60% (autor korespondencyjny)*  
*Punktacja IF: 3,236*  
*Punktacja MNiSW: 30*

**c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**1. WPROWADZENIE**

*1.1. Rak jelita grubego*

Rak jelita grubego jest obecnie trzecim najczęściej diagnozowanym nowotworem na świecie i czwartą z kolei przyczyną śmierci powodowaną przez choroby nowotworowe. Dodatkowo, szacuje się, że ilość nowych przypadków na raka jelita grubego zwiększy się na całym świecie o 60% do 2,2 milionów nowych zachorowań i 1,1 miliona przypadków śmierci w 2030 r. [1]. Pięcioletnia przeżywalność pacjentów z rakiem jelita grubego w stopniu I i II wynosi około 90%, jednak w przypadku pacjentów z bardziej zaawansowanym rakiem oraz

przerzutami (stopień IV) wartość ta spada do zaledwie 13,1% [2]. Oprócz istotnego czynnika, jakim jest stosunkowo wysoka śmiertelność oraz spadek jakości życia pacjentów, rak jelita grubego wiąże się też z wysokimi kosztami ekonomicznymi. W Unii Europejskiej ogólna suma wydatków związana z występowaniem raka jelita grubego wynosi 13,1 miliarda euro. Na sumę tę składają się koszty opieki zdrowotnej oraz straty wynikające ze spadku wydajności pracy. Ogółem, rak jelita grubego odpowiedzialny jest za 10% wszystkich kosztów wynikających z występowania chorób nowotworowych w UE [3].

Stosunkowo wysoka śmiertelność pacjentów z rakiem jelita grubego wynika z kilku czynników, m. in. niedostatecznej diagnostyki, skuteczności leczenia oraz dostępu do opieki medycznej. Rak jelita grubego, zwłaszcza na wczesnych etapach rozwoju, nie daje specyficznych objawów, co znacząco utrudnia rozpoznanie i w konsekwencji leczenie tego schorzenia. Obecnie znanych jest kilka markerów raka jelita grubego (np. Ki67, VEGF lub CEA) [4], lecz wysoka śmiertelność wynikająca m. in. z późnej diagnostyki narzuca konieczność identyfikacji nowych markerów diagnostycznych i/lub prognostycznych tego nowotworu.

Rozwój raka jelita grubego jest złożonym procesem, który trwa średnio około 10 lat i obejmuje rozwój nowotworu od formy niewielkich polipów błony śluzowej jelita grubego, przez postać gruczolaka do formy raka [5]. Czynniki ryzyka raka jelita grubego obejmują dziedziczne zespoły genetyczne (takie jak zespół Lyncha lub rodzinną polipowatość gruczolakowatą), historię występowania przypadków tego schorzenia w rodzinie, występowanie nieswoistych zapaleń jelit, jak również czynniki środowiskowe takie jak palenie papierosów, nadmierne spożywanie alkoholu, brak aktywności fizycznej, czy pewne nawyki żywieniowe [2, 5]. Dobrze poznane są dwie ścieżki molekularne, które prowadzą do rozwoju raka jelita grubego. Pierwsza z nich dotyczy 65 – 75% wszystkich sporadycznych przypadków tego nowotworu i charakteryzuje się stopniową akumulacją mutacji w genomie, które najpierw powstają w genie *APC*, który bierze udział w podziale chromosomów podczas podziału mitotycznego komórek; w dalszej kolejności mutacje pojawiają się w genie *KRAS*, który wpływa na wzrost, przeżywalność i ruchliwość komórek, i ostatecznie kolejne mutacje prowadzą do utraty aktywności białka p53, które jest istotnym białkiem proapoptotycznym i inhibitorem cyklu komórkowego. Druga ścieżka, która dotyczy około 15% wszystkich sporadycznych przypadków raka jelita grubego, rozpoczyna się od powstania mutacji w genie *BRAF*, które mogą zmieniać wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne i pozwalają uniknąć

apoptozy. W tej ścieżce również mogą wystąpić mutacje w genie *KRAS*, lecz są one rzadziej spotykane niż w ścieżce pierwszej [2, 6]. Innym mechanizmem przyczyniającym się do rozwoju raka jelita grubego jest nierówna replikacja niekodujących fragmentów DNA znana jako niestabilność mikrosatelitarna (MSI, ang. *microsatellite instability*), która powodowana jest przez uszkodzenie komórkowego systemu naprawy DNA (tzw. systemu MMR, ang. *mismatch repair system*). Wystąpienie MSI zwiększa szanse na pojawienie się kolejnych mutacji w genomie i w rezultacie zmianę poziomu ekspresji lub aktywności innych genów [2, 7].

Pomimo dość dużej obecnie wiedzy na temat rozwoju raka jelita grubego, jego dokładny molekularny mechanizm wciąż pozostaje nieznan. Dodatkowo, poza najważniejszymi mechanizmami, skrótowo omówionymi powyżej, w rozwoju tego nowotworu mogą brać udział także inne, niescharakteryzowane jeszcze geny i białka. Dokładne poznanie ścieżek molekularnych występujących w tym schorzeniu może przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych terapii raka jelita grubego.

### *1.2. Nieswoiste zapalenia jelit*

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) stanowią grupę autoimmunologicznych schorzeń zapalnych przewodu pokarmowego o niewyjaśnionej do końca etiologii. Główne postaci NZJ to choroba Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (WZJG), przy czym ChL-C dotyka głównie jelita cienkiego i grubego, ale może dotykać także innych części przewodu pokarmowego, natomiast WZJG dotyczy wyłącznie jelita grubego. Objawy NZJ to bóle podbrzusza, rozwolnienie, krwawienie z jelit, jak również utrata wagi i zmęczenie, prowadzące do często znacznego obniżenia jakości życia pacjentów. Poza tym, u pacjentów z ChL-C często powstają przetoki pomiędzy różnymi częściami jelit lub pomiędzy jelitem a innymi organami [8]. Sam przebieg choroby, która trwa latami, charakteryzuje się okresami remisji i nawrotów. Przyczyną NZJ jest nadmierna odpowiedź układu odpornościowego skierowana przeciwko florze bakteryjnej jelit, która może wynikać ze zwiększonej aktywności efektorowych limfocytów T, obniżonej aktywności limfocytów T regulatorowych, zmian w składzie flory jelitowej i/lub uszkodzeń bariery tworzonej przez nabłonek jelit [8, 9]. Około 5 – 16% pacjentów z NZJ wykazuje historię występowania tych schorzeń w rodzinie [10], co sugeruje istnienie również podłoża genetycznego NZJ. W istocie, zidentyfikowano kilka czynników genetycznych przyczyniających się do rozwoju NZJ, obejmujących mutacje przyczyniające się do nadmiernej aktywacji układu

odpornościowego [11-13] lub uszkodzenia bariery nabłonkowej jelit [14]. Istnieją także czynniki środowiskowe zwiększające prawdopodobieństwo wystąpienia NZJ. Obejmują one życie w zurbanizowanym środowisku, stres, przewlekłe terapie antybiotykami, czynniki dietetyczne lub leki uszkadzające błonę śluzową jelit oraz palenie papierosów, które uznawane jest za czynnik ryzyka w ChL-C, lecz prawdopodobnie zmniejsza ryzyko wystąpienia WZJG, chociaż mechanizm tego zjawiska pozostaje na razie nieznanym [9].

Rodzaj odpowiedzi immunologicznej w przebiegu NZJ nie jest jednorodny – zapalenie w ChL-C jest pośredniczone głównie przez limfocyty pomocnicze typu Th1 i Th17, natomiast WZJG jest związane przede wszystkim z limfocytami pomocniczymi typu Th2. Jednak tradycyjny model polaryzacji odpowiedzi immunologicznej na rodzaje Th1, Th2 i Th17 nie znajduje pełnego zastosowania w przebiegu NZJ ze względu na złożoność ścieżek regulacyjnych, na które wpływ mają czynniki takie jak faza choroby lub przebieg leczenia pacjentów [15]. Przewlekłe zapalenie jelit prowadzi do rozregulowania cyklu komórkowego i rozwoju niestabilności genomowej, co zwiększa ryzyko wystąpienia transformacji nowotworowej. Ryzyko wystąpienia raka jelita grubego u pacjentów z NZJ zwiększa się do 18% (w porównaniu z osobami zdrowymi) po 30 latach trwania choroby [16]. Mechanizmy molekularne stanowiące podłoże NZJ są bardzo złożone i obecnie w dużej mierze pozostają nieznanymi. Obecnie leczenie NZJ jest głównie objawowe i oparte jest na stosowaniu leków przeciwzapalnych lub chirurgicznym wycięciu fragmentów jelita objętego zapaleniem, chociaż zastosowanie mają też przeciwciała monoklonalne neutralizujące wybrane cytokiny przeciwzapalne, np. czynnik martwicy nowotworu (TNF, ang. *Tumour Necrosis Factor*) biorące udział w rozwoju zapalenia. Dokładna charakterystyka przebiegu odpowiedzi immunologicznej w NZJ może pozwolić na opracowanie skutecznych terapii celujących w podłoże, a nie tylko objawy choroby.

### 1.3. TL1A i VEGI-192

Białka TL1A (ang. *TNF-like Molecule 1A*) i VEGI-192 (ang. *Vascular Endothelial Growth Inhibitor-192*) należą do nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (TNFSF, ang. *Tumour Necrosis Superfamily*). Białka należące do tej nadrodziny są plejotropowymi cząsteczkami sygnalizacyjnymi zdolnymi zarówno do indukcji śmierci komórki docelowej, jak i pobudzających jej proliferację i aktywację, a wiele z nich zaangażowanych jest w aktywację limfocytów T oraz B. Ostateczny efekt działania białek z nadrodziny TNFSF na komórki docelowe zależy od rodzaju receptora, z którym wiąże się dane białko,

wewnątrzkomórkowego poziomu białek pro- i antyapoptotycznych oraz równoległego oddziaływania innych cząsteczek sygnalizacyjnych.

TL1A i VEGI-192 są produktami genu *TNFSF15* (ang. *Tumour Necrosis Factor Superfamily Member 15*) powstającymi w wyniku alternatywnego składania genu. Gen ten, sklonowany po raz pierwszy w 2002 r., posiada długość 17 kbp, zawiera 4 eksony i znajduje się na chromosomie 9q32 [17]. TL1A i VEGI-192 posiadają długość odpowiednio 251 i 192 aminokwasów, dzieląc tę samą domenę C-końcową o długości 151 aminokwasów [18]. U ludzi wykryto także trzeci produkt genu *TNFSF15* – białko VEGI-174 o długości 174 aminokwasów, jednak wielu badaczy uznało je za artefakt nieposiadający aktywności biologicznej [17].

Głównym receptorem dla TL1A jest DR3 (ang. *Death Receptor 3*; TNFRSF25, ang. *Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 25*), receptor zawierający wewnątrzkomórkową tzw. domenę śmierci i zdolny do aktywacji zarówno śmierci apoptotycznej komórek, jak i przyspieszający ich podziały i produkcję innych cytokin [17] w zależności od współdziałania innych cytokin i rodzaju komórek docelowych. Ekspresja DR3 obecna jest głównie na aktywowanych limfocytach [17], chociaż odnaleziono go także na komórkach nabłonka jelit [19]. U ludzi występuje 11 izoform receptora DR3 powstających w wyniku alternatywnego składania genu, z których tylko izoforma 1 koduje receptor o pełnej długości, posiadający domenę śmierci oraz aktywność biologiczną [20]. Ta właśnie izoforma była wykrywana w badaniach przedstawionych w autoreferacie. Podstawowy receptor dla białka VEGI-192 nie jest znany. Wiadomo jednak, że białko to może wykorzystywać receptor lub receptory inne niż DR3, albo inne ścieżki sygnalizacyjne niż TL1A i przynajmniej część efektów działania VEGI-192 z pewnością jest wywoływana niezależnie od DR3 [17, 21].

TL1A jest białkiem błonowym, które może jednak być odcinane przez proteazy i występować także w postaci rozpuszczalnej. Główne działanie TL1A to kostymulacja limfocytów T w obecności stymulacji receptora TCR (ang. *T Cell Receptor*) [20]. W ten sposób TL1A działa jako białko prozapalne, zwiększając proliferację i funkcje efektorowe limfocytów T CD8(+) i T CD4(+), w tym wydzielanie prozapalnych cytokin IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 i/lub IL-17A w zależności od warunków prowadzonego eksperymentu [22-25]. Co ciekawe, TL1A przyspiesza także proliferację limfocytów T regulatorowych, lecz przedłużająca się stymulacja TL1A ogranicza aktywność regulatorową tych komórek [26, 27]. Ekspresja TL1A obecna jest głównie na aktywowanych komórkach układu odpornościowego – komórkach



dendrytycznych, makrofagach i limfocytach T [20]. W momencie rozpoczęcia przedstawionych tutaj badań niewiele było wiadomo o roli TL1A w rozwoju nowotworów, chociaż badania prowadzone na myszach wykazały, że sztuczne zwiększenie ekspresji TL1A na limfocytach CD8(+) prowadzi do zależnej od limfocytów CD8(+) eliminacji komórek nowotworowych [28]. Istnieje jednak jednoznaczny związek pomiędzy podwyższoną ekspresją TL1A a rozwojem niektórych chorób autoimmunologicznych takich jak nieswoiste zapalenia jelit i łuszczyca [20]. Badania prowadzone na myszach wykazały, że stała, podwyższona ekspresja TL1A na limfocytach T lub komórkach dendrytycznych zwiększa ekspresję mRNA IL-13, IL-17A i IFN- $\gamma$  w błonie śluzowej jelit i prowadzi do spontanicznego rozwoju zapalenia jelit [29] [26, 27, 30]. Poza tym, niektóre polimorfizmy genu *TNFSF15* uznawane są za czynniki ryzyka dla nieswoistych zapaleń jelit [31, 32], łuszczycy [33] oraz gruczolaków jelit [34].

Obecność białka VEGI-192 stwierdzono na komórkach śródbłona naczyń, a jego podstawowa funkcja polega na hamowaniu angiogenezy przez aktywację apoptozy lub hamowanie cyklu komórkowego śródbłona [35] lub hamowanie różnicowania ich komórek prekursorowych [36]. Dotychczasowe badania wskazują, że VEGI-192 ogranicza rozwój nowotworów. Wykazano, że zwiększona ekspresja VEGI-192 hamuje angiogenezę nowotworową [37], a we wczesnych stadiach raka jasnokomórkowego nerki oraz nowotworach przysadki mózgowej stwierdzono wyższy poziom ekspresji mRNA VEGI-192 niż w stadiach późniejszych [38, 39]. W momencie rozpoczynania przedstawionych tutaj badań dostępnych było jednak bardzo niewiele danych na temat roli VEGI-192 w rozwoju raka jelita grubego.

### **Cel osiągnięcia naukowego**

Przedstawiony w niniejszym autoreferacie cykl badań stanowi rozwinięcie projektu badawczego, który stanowił podstawę mojej pracy doktorskiej i który realizowałem w University of Southampton w Wielkiej Brytanii pod kierunkiem prof. Aymena Al-Shamkhani. Badania, w których wówczas brałem udział wykazały m. in., że TL1A pełni rolę białka kostymulującego limfocyty T, a transgeniczne myszy posiadające stałą, podwyższoną ekspresję białka TL1A na limfocytach T lub komórkach dendrytycznych wykazują podwyższony poziom transkryptów IL-17A oraz IL-13 w błonie śluzowej jelit i w krezkowych węzłach chłonnych oraz posiadały zmiany zapalne w jelitach.

Celem przedstawionych tutaj badań było określenie, czy białko TL1A może przyczyniać się do rozwoju zapalenia jelit również u ludzi. Dodatkowo, ze względu na dane literaturowe wskazujące na możliwość udziału białek TL1A i VEGI-192 w rozwoju raka jelita grubego, drugim celem badań było określenie ich roli w tym schorzeniu.

### Cele szczegółowe

- 1) Ocena poziomu ekspresji i lokalizacji TL1A oraz receptora DR3 w błonie śluzowej jelit oraz/lub we krwi pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG).
- 2) Ocena poziomu ekspresji transkryptów prozapalnych cytokin IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 i IL-17A w błonie śluzowej jelit pacjentów z ChL-C i WZJG oraz korelacja poziomu ich ekspresji z poziomem ekspresji transkryptu TL1A.
- 3) Porównanie ekspresji wybranych markerów aktywacji limfocytów (CD25, CD44 i CD62L) oraz ekspresji receptora DR3 na limfocytach T CD4(+) i CD8(+) i akumulacji limfocytów T regulatorowych we krwi pacjentów z ChL-C i WZJG z osobami zdrowymi.
- 4) Porównanie poziomu ekspresji receptora DR3 na limfocytach T CD4(+), CD8(+), limfocytach B, makrofagach i komórkach dendrytycznych we krwi poddawanych leczeniu osób dorosłych i nowo zdiagnozowanych dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit.
- 5) Ocena poziomu ekspresji transkryptów TL1A, VEGI-192 i DR3 w różnych stopniach zaawansowania raka jelita grubego i porównanie ich z przeżywalnością pacjentów.
- 6) Zbadanie wpływu niestabilności mikrosatelitarnej i wybranych polimorfizmów genu *TNFSF15* na poziom ekspresji TL1A i VEGI-192 u pacjentów z rakiem jelita grubego.
- 7) Podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat roli białek TL1A i VEGI-192 w nieswoistych zapaleniach jelit i w raku jelita grubego.

### **Omówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

#### **Publikacja 1**

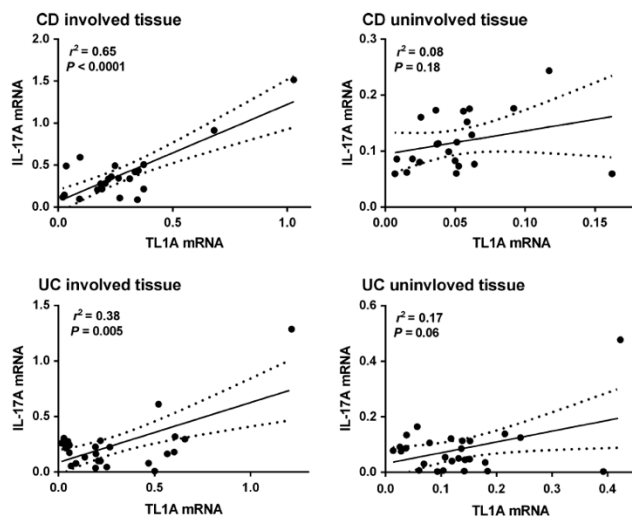
**Tomasz Ślebioda**, A. Bojarska-Junak, M. Stanisławowski, M. Cyman, P.M. Wierzbicki, J. Roliński, K. Celiński, Z. Kmiec. TL1A as a potential local inducer of IL17A expression in colon mucosa of inflammatory bowel disease patients. *Scandinavian Journal of Immunology* (2015); 82(4): 352-360

Głównym celem badań przedstawionych w tej publikacji było stwierdzenie, czy białko TL1A jest zaangażowane w rozwój przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit u ludzi, jak również wstępna charakterystyka tego procesu. Przedstawione badania miały na celu określenie poziomu ekspresji transkryptów TL1A i DR3 i lokalizacji tych białek w błonie śluzowej jelit pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna (ChL-C) oraz wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (WZJG). Kolejnym celem było określenie poziomów ekspresji transkryptów prozapalnych cytokin IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 i IL-17A, o których wiadomo, że ich wydzielanie może być indukowane przez TL1A, w błonie śluzowej jelit pacjentów z ChL-C i WZJG oraz korelacja poziomu ich ekspresji z poziomem ekspresji transkryptu TL1A. Dodatkowo, porównano także ekspresję wybranych markerów aktywacji limfocytów (CD25, CD44 i CD62L) oraz receptora DR3 na limfocytach T CD4(+) i CD8(+) i akumulację limfocytów T regulatorowych we krwi pacjentów z ChL-C i WZJG z osobami zdrowymi. Przeprowadzenie tych badań związane było realizacją punktów 1), 2) i 3) przedstawionych w celach szczegółowych osiągnięcia naukowego przedstawionych wyżej. Badania prowadzone były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki *Analiza udziału białka TL1A oraz jego receptora DR3 w patomechanizmach przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit u dorosłych i dzieci*. nr rej. 2011/01/B/NZ5/01358, którego byłem głównym wykonawcą.

Badaniom poddano wycinki zmienionej i niezmienionej zapalnie błony śluzowej jelita grubego i krew obwodową pobrane od 22 pacjentów z ChL-C, 27 pacjentów z WZJG oraz od 20 osób zdrowych. Stopień zaawansowania choroby określono zgodnie ze skalami CDAI (ang. *Crohn's Disease Activity Index*; dla choroby Leśniowskiego-Crohna) i MTWSI (ang. *Modified Truelove and Witts Severity Index*; dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego). Wynosił on średnio 272 dla choroby Leśniowskiego-Crohna i 17 dla wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Poziom ekspresji transkryptów IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-17A oraz TL1A i DR3 określono ilościową metodą PCR (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*). Lokalizację receptora DR3 i produktu białka TL1A w błonie śluzowej jelita grubego określono metodą immunohistochemiczną, natomiast oznaczanie markerów aktywacji limfocytów T, receptora DR3 i akumulację limfocytów T regulatorowych we krwi sprawdzono metodą cytometryczną. Poziom TL1A i IL-17A w surowicy krwi zmierzono testami ELISA.

Analiza ekspresji genów pozwoliła stwierdzić, że poziomy transkryptu TL1A są podwyższone w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C

i WZJG w porównaniu z błoną śluzową bez zmian zapalnych (odpowiednio 3,19- i 3,22-krotnie). Nie zauważono różnic w poziomie ekspresji transkryptu TL1A pomiędzy niezmienną zapalnie błoną śluzową jelita grubego pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit a próbkami pobranymi od osób zdrowych. Nie stwierdzono także różnic w poziomach ekspresji transkryptu receptora DR3 w żadnych z badanych próbek. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność białka TL1A i DR3 w komórkach nabłonka jelit i w jednojądrzastych komórkach błony śluzowej jelita grubego, przy czym intensywność barwienia była największa w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C i WZJG. Dalsze badania wykazały zwiększoną ekspresję transkryptu IL-17A w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C i WZJG w porównaniu z tkanką niezmienną zapalnie (odpowiednio 4,48- i 2,74-krotnie) oraz 3,23-krotny wzrost ekspresji transkryptu IFN- $\gamma$  w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C, lecz nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji transkryptów pozostałych cytokin (IL-4 i IL-13) w badanych próbkach. Dodatkowo, stwierdzono także, że poziom ekspresji transkryptu IL-17A, lecz nie pozostałych cytokin, był pozytywnie skorelowany z poziomem ekspresji transkryptu TL1A w zmienionej zapalnie błonie jelita śluzowego pacjentów z ChL-C i WZJG (Rys. 1).



**Rysunek 1.** Korelacja poziomów ekspresji transkryptów TL1A i IL-17A w zmienionej (involved) i niezmiennionej (uninvolved) zapalenie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z ChL-C (CD) i WZJG (UC). Przerwane linie przedstawiają 95% przedziały ufności. Wartości  $p$  i  $r$  obliczono z zastosowaniem współczynnika korelacji Spearmana [19].

Zauważono również zwiększony poziom białka TL1A w surowicy krwi pacjentów z ChL-C i WZJG w porównaniu z surowicą pobraną od osób zdrowych (odpowiednio 6,87- i 9,87-krotnie), lecz nie był on skorelowany z poziomem białka IL-17A, który zresztą nie był

podniesiony w surowicy pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit w porównaniu z poziomem tego białka w surowicy osób zdrowych. Analiza fenotypowa limfocytów we krwi obwodowej wykazała, że jedynymi markerami aktywacji, których ekspresja była podwyższona w porównaniu z osobami zdrowymi były CD25 na limfocytach T CD4(+) (tylko u pacjentów z WZJG) i CD8(+) (u pacjentów z ChL-C i WZJG) oraz CD62L na limfocytach CD4(+) (tylko u pacjentów z WZJG) i CD8(+) (u pacjentów z ChL-C i WZJG). Pacjenci z nieswoistymi zapaleniami jelit posiadali także podwyższony poziom limfocytów T CD8(+) wykazujących ekspresję receptora DR3 w porównaniu z osobami zdrowymi. Nie stwierdzono podwyższonego poziomu limfocytów T regulatorowych we krwi pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit. Zmiany zauważone we krwi badanych pacjentów nie były skorelowane z poziomem białka TL1A w surowicy.

Podsumowanie:

Opisane wyniki pozwalają stwierdzić, że rozwój nieswoistych zapaleń jelit u ludzi jest związany z podwyższoną ekspresją TL1A w błonie śluzowej jelit i we krwi obwodowej oraz z podwyższoną ekspresją receptora DR3 w błonie śluzowej jelit. W tej publikacji po raz pierwszy wykazano ekspresję TL1A i DR3 w komórkach nabłonka jelit. Uzyskane dane wskazują, że TL1A przyczynia się do rozwoju nieswoistych zapaleń jelit przez lokalne zwiększanie produkcji prozapalnej cytokiny IL-17A, lecz nie IL-4, IL-13 lub IFN- $\gamma$ .

## **Publikacja 2**

**Tomasz Ślebioda**, A. Bojarska-Junak, M. Cyman, P. Landowski, B. Kamińska, K. Celiński, Z. Kmiec. Expression of death receptor 3 on peripheral blood mononuclear cells differs in adult IBD patients and children with newly diagnosed IBD. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* (2017); 92(2): 165-169

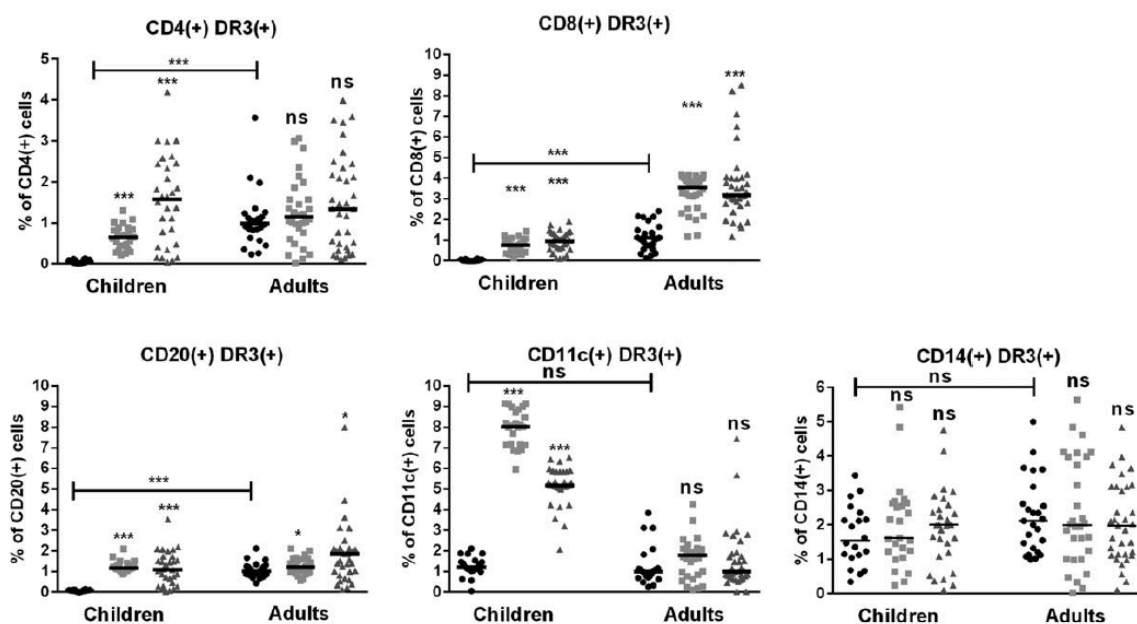
Podczas realizacji badań opisanych w publikacji nr 1 wykazano podwyższony poziom limfocytów T CD8(+) z ekspresją receptora DR3 we krwi pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit w porównaniu z osobami zdrowymi. Celem badań przedstawionych w tej publikacji było porównanie poziomu ekspresji receptora DR3 na limfocytach T CD4(+), CD8(+), limfocytach B, makrofagach i komórkach dendrytycznych we krwi poddawanych leczeniu osób dorosłych i nowo zdiagnozowanych dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. Pozwoliło to rozszerzyć badania na inne leukocyty krwi oraz stwierdzić, czy zmiany odsetek wybranych populacji leukocytów wykazujących ekspresję receptora DR3 zależą od wieku

oraz stosowanego leczenia. Przeprowadzenie tych badań związane było z realizacją punktu 4 przedstawionego w celach szczegółowych osiągnięcia naukowego powyżej. Badania prowadzone były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki *Analiza udziału białka TL1A oraz jego receptora DR3 w patomechanizmach przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit u dorosłych i dzieci*. nr rej. 2011/01/B/NZ5/01358, którego byłem wykonawcą.

Przebadano próbki krwi pochodzące od pacjentów z ChL-C (30 dorosłych, średni wiek 38,3 lat; 25 dzieci, średni wiek 9,4 lat), WZJG (35 dorosłych, średni wiek 46,8 lat; 30 dzieci, średni wiek 10,8 lat) oraz od osób zdrowych (25 dorosłych, średni wiek 45,3; 20 dzieci, średni wiek 9,8 lat). Pacjenci dorośli znajdowali się w trakcie leczenia aminosalicylanami, sterydami i/lub azatiopryną, a w przypadku dzieci krew została pobrana tuż po zdiagnozowaniu choroby, przed rozpoczęciem leczenia. Stopień zaawansowania choroby określono zgodnie ze skalami CDAI (ang. *Crohn's Disease Activity Index*; dla dorosłych z chorobą Leśniowskiego-Crohna; średni wynik 380), PDAI (ang. *Paediatric Crohn's Disease Activity Index*; dla dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna; średni wynik 47), MTWSI (ang. *Modified Truelove and Witts Severity Index*; dla dorosłych z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego; średni wynik 12) lub PUCAI (ang. *Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index*; dla dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego; średni wynik 48). Oznaczenia ekspresji receptora DR3 na limfocytach T CD4(+), CD8(+), limfocytach B (CD20(+)), komórkach dendrytycznych (CD11c(+)) i makrofagach (CD14(+)) przeprowadzono metodą cytometryczną. U dorosłych, podwyższony odsetek komórek z ekspresją DR3(+) wykazano jedynie w populacjach komórek CD8(+) i CD20(+). W porównaniu w odpowiednimi kontrolami, u pacjentów dorosłych odsetek komórek CD8(+)DR3(+) był podwyższony 3,55-krotnie (w przypadku pacjentów z ChL-C) i 2,85-krotnie (w przypadku pacjentów z WZJG); poza tym, odsetek komórek CD20(+)DR3(+) podwyższony był 1,19-krotnie w przypadku pacjentów z ChL-C i 1,82-krotnie w przypadku pacjentów z WZJG. U dzieci chorych, w porównaniu z dziećmi zdrowymi, odsetek komórek CD8(+)DR3(+) podwyższony był 25-krotnie (w przypadku dzieci z ChL-C) i 31,33-krotnie w przypadku dzieci z WZJG), odsetek komórek CD20(+)DR3(+) podwyższony był 14,62-krotnie u dzieci z ChL-C i 13,68-krotnie u dzieci z WZJG, kolei odsetek komórek CD11c(+)DR3(+) podwyższony był 8-krotnie u dzieci z ChL-C i 5-krotnie u dzieci z WZJG. Zauważono również, że zdrowi dorośli posiadali znacząco podwyższony odsetek komórek CD4(+)DR3(+), CD8(+)DR3(+) oraz CD20(+)DR3(+) w porównaniu ze zdrowymi dziećmi. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono istotnych zmian odsetka komórek



CD14(+)DR3(+) (Rys. 2). Co istotne, stwierdzono korelację poziomu białka CRP z poziomem limfocytów CD4(+), CD8(+) i limfocytów B wykazujących ekspresję receptora DR3 u dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit. U dorosłych pacjentów podobną korelację stwierdzono tylko w przypadku komórek CD8(+)DR3(+), lecz również poziom białka CRP u dorosłych był znaczenie niższy niż u dzieci – pacjenci z ChL-C: średnio 65,08 mg/ml dla dzieci i 25,12 mg/ml dla dorosłych; pacjenci z WZJG: średnio 51,17 mg/ml dla dzieci i 37,21 mg/ml dla dorosłych.



**Rysunek 2.** Ekspresja receptora DR3 na wybranych populacjach jednojądrzastych komórek krwi obwodowej dzieci (children) i dorosłych (adults) z chorobą Leśniowskiego-Crohna (jasnoszare symbole) i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (ciemnoszare symbole) oraz u pacjentów kontrolnych (czarne symbole). Wartości p obliczono testem U Manna-Whitneya; ns:  $p > 0,005$ , \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ . Czarne kreski oznaczają mediany [40]

Podsumowanie:

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że rozwój nieswoistych zapaleń jelit związany jest ze zwiększoną ekspresją receptora DR3 na wybranych subpopulacjach leukocytów krwi obwodowej, a poziomy ekspresji tego receptora różnią się u dzieci i dorosłych. Poza tym, leczenie pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, opierające się na terapii przeciwzapalnej, prowadzące do spadku poziomu białka CRP, prowadzi także do spadku odsetka badanych populacji leukocytów wykazujących ekspresję receptora DR3.

**Publikacja 3**

**Tomasz Ślebioda**, M. Stanisławowski, M. Cyman, P.M. Wierzbicki, D. Żurawa-Janicka, J. Kobiela, W. Makarewicz, M. Guzek, Z. Kmieć. Distinct expression patterns of two tumor necrosis factor superfamily member 15 gene isoforms in human colorectal cancer. *Digestive Diseases and Sciences* (2019); DOI: 10.1007/s10620-019-05507-8

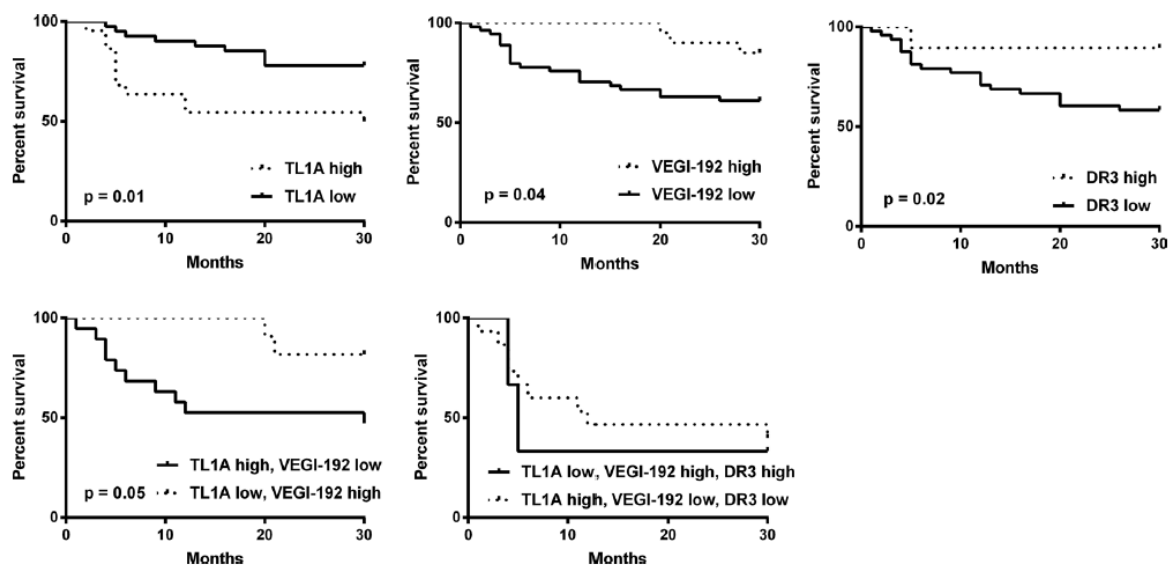
Celem badań przedstawionych w tej publikacji było określenie poziomów ekspresji transkryptów TL1A, VEGI-192 i DR3 w różnych stadiach zaawansowania raka jelita grubego i porównanie ich z przeżywalnością pacjentów. Celami dodatkowymi było określenie, czy niestabilność mikrosatelitarna i wybrane polimorfizmy genu *TNFSF15* (rs6478109 i rs6478108) mają wpływ na poziom ekspresji TL1A i VEGI-192. Przeprowadzenie tych badań związane było punktami 5) i 6) przedstawionymi w celach szczegółowych osiągnięcia naukowego powyżej. Badania prowadzone były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki *Analiza udziału dwóch izoform białka TNFSF15 (VEGI i TL1A) w patomechanizmach raka jelita grubego*, nr rej. 2013/09/D/NZ5/0265, którego byłem kierownikiem.

Badania prowadzono na biopsjach błony śluzowej jelita grubego pobranej od 45 zdrowych ochotników oraz na zmienionej nowotworowo tkance jelita grubego pobranej od 95 pacjentów z rakiem jelita grubego (35 w stopniu I, 21 w stopniu II, 20 w stopniu III i 19 w stopniu IV). Ekspresję transkryptów TL1A, VEGI-192 i DR3 zmierzono ilościową łańcuchową reakcją polimerazy DNA (qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*), polimorfizmy genu *TNFS15* oraz niestabilność mikrosatelitarną sprawdzono metodami łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) na DNA wyizolowanym z badanych próbek zmienionych nowotworowo lub z tkanek kontrolnych.

W badanych tkankach zmienionych nowotworowych stwierdzono podwyższoną ekspresję transkryptów TL1A (średnio 6,54-krotnie) i VEGI-192 (średnio 54,99-krotnie) w porównaniu z prawidłową błoną śluzową jelita. Co ciekawe, zauważono także niewielki (1,42-krotny), ale istotny statystycznie spadek ekspresji transkryptu receptora DR3. Dalsza analiza danych wykazała, że ekspresja transkryptu TL1A zwiększała się wraz z progresją raka jelita grubego – w porównaniu z tkanką prawidłową była ona 3,54-krotnie wyższa w stopniu I, 3,97-krotnie



wyższa w stopniu II, 5,85-krotnie wyższa w stopniu III i 11,21-krotnie wyższa w stopniu IV. Poza tym, ekspresja transkryptu TL1A była wyraźnie podwyższona w nowotworach tworzących przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (średnio 2,22-krotnie w porównaniu z nowotworami nietworzącymi takich przerzutów) oraz przerzuty odległe (średnio 2,79-krotnie w porównaniu z nowotworami bez przerzutów odległych). Schemat ekspresji transkryptu VEGI-192 był odwrotny. Pomimo że ogólna ekspresja VEGI-192 była podwyższona w tkance nowotworowej, malała wraz ze wzrostem zaawansowania nowotworu i w porównaniu z tkanką prawidłową jej poziom był podwyższony średnio 88,26-krotnie w stopniu I, 33,36-krotnie w stopniu II, 16,79-krotnie w stopniu III i 14,17-krotnie w stopniu IV. Ekspresja transkryptu VEGI-192 była także znacząco niższa w nowotworach tworzących przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych (średnio 4,54-krotnie) i tworzących przerzuty odległe (średnio 4,16-krotnie) w porównaniu z nowotworami nietworzącymi takich przerzutów. Ekspresja transkryptu receptora DR3 nie wykazywała istotnych zmian związanych z progresją nowotworu. Badania wykazały także, że pacjenci z genotypami C/T i T/T polimorfizmu rs6478108 genu *TNFSF15* posiadają wyższą (odpowiednio 2,65-krotnie i 3,20-krotnie) ekspresję transkryptu TL1A niż pacjenci z genotypem C/C tego samego polimorfizmu. Ekspresja transkryptu VEGI-192 była 1,83-krotnie wyższa w tkance nowotworowej z genotypem T/T polimorfizmu rs6478108 w porównaniu z genotypem C/C, nie stwierdzono jednak różnic w ekspresji tego transkryptu w porównaniu z innymi genotypami. Poza tym, nowotwory z genotypami A/G i G/G polimorfizmu rs64781409 genu *TNFSF15* posiadały wyższą ekspresję TL1A (odpowiednio 2,72-krotnie i 3,01-krotnie) niż nowotwory z genotypem A/A tego samego polimorfizmu. Nowotwory z genotypem G/G polimorfizmu rs6478109 posiadały 1,96-krotnie wyższą ekspresję VEGI-192 w porównaniu z genotypem A/G tego samego polimorfizmu; nie stwierdzono jednak istotnych różnic w ekspresji VEGI-192 pomiędzy innymi genotypami tego polimorfizmu. Nie zauważono także związku pomiędzy poziomami ekspresji transkryptów TL1A i VEGI-192 w tkance nowotworowej a niestabilnością mikrosatelitarną. Analiza przeżywalności pacjentów wykazała, że pacjenci z niską (niższą niż średni poziom ekspresji w tkance nowotworowej) ekspresją TL1A w tkance nowotworowej żyli dłużej niż pacjenci z wysoką (wyższą niż średni poziom ekspresji w tkance nowotworowej) ekspresją TL1A w tkance nowotworowej (Rys. 3).



**Rysunek 3.** Przeżywalność pacjentów z rakiem jelita grubego z wysoką (high) lub niską (low) ekspresją transkryptów TL1A, VEGI-192 i DR3 w tkance nowotworowej. Jeżeli na wykresie nie przedstawiono wartości p, jest ona większa niż 0,05. Wartości p obliczono testem log-rank (Mantela-Coxa) [41].

Analogicznie, pacjenci z niską ekspresją transkryptu DR3 lub VEGI-192 żyli krócej niż pacjenci z wysoką ekspresją odpowiednich transkryptów w tkance nowotworowej. Przeprowadzono także analizę wielowymiarową, która obejmowała pacjentów otrzymujących i nieotrzymujących radio- lub chemioterapii po chirurgicznym wycięciu guza nowotworowego. Wykazała ona, że wysoka ekspresja TL1A i niska ekspresja VEGI-192, lecz nie poziom ekspresji DR3, stanowiły niezależne czynniki ryzyka raka jelita grubego w badanej grupie pacjentów (Tab. 1).

**Tabela 1.** Identyfikacja niezależnych czynników prognostycznych za pomocą analizy wielu zmiennych Coxa [41].

| Zmienna                                  | HR (95% CI)            | P     |
|--|------------------------|-------|
| Wiek                                     | 1,060 (1,020 – 1,102)  | 0,003 |
| Stopień zaawansowania                    | 2,037 (0,640 – 6,487)  | 0,229 |
| Stopień N* (N1 + N2 vs. N0)              | 0,549 (0,123 – 2,451)  | 0,432 |
| Stopień M* (M1 vs. M0)                   | 4,159 (0,901 – 19,201) | 0,068 |
| Ekspresja TL1A (niska vs. wysoka)        | 0,420 (0,000 – 0,966)  | 0,041 |
| Ekspresja VEGI-192 (niska vs. wysoka)    | 2,374 (1,081 – 5,215)  | 0,031 |
| Ekspresja DR3 (niska vs. wysoka)         | 0,647 (0,279 – 1,498)  | 0,309 |
| Radio- i chemioterapia (obecna vs. brak) | 0,472 (0,171 – 1,301)  | 0,148 |

HR – współczynnik ryzyka; CI – przedział ufności; \*: zgodnie ze skalą TNM

**Podsumowanie:**

Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja transkryptów TL1A i VEGI-192 wzrasta i zmienia się wraz z rozwojem raka jelita grubego, a poziomy ich ekspresji mogą stanowić niezależne czynniki prognostyczne dla tego schorzenia. Poza tym, poziom ekspresji genu *TNFSF15* nie jest zależny od niestabilności mikrosatelitarnej, a allele T polimorfizmu rs6478108 i G polimorfizmu rs6478109 związane są z podwyższoną ekspresją tego genu.

**Publikacja 4**

Z. Kmieć, M. Cyman, **Tomasz Ślebioda**. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in Medical Sciences* (2017); 62(1): 1-16

Celem tej pracy było podsumowanie istniejącego stanu wiedzy na temat mechanizmów działania układu odpornościowego w nieswoistych zapaleniach jelit. Pozwoliło to zaplanować dalsze badania w tej dziedzinie i usystematyzować uzyskane wyniki i związane było z punktem 7 szczegółowych celów badań. Jest to praca poglądowa, w której opisano oddziaływania pomiędzy komórkami układu odpornościowego w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit. Opisano także niedawno odkryte subpopulacje limfocytów ILC, jak również komórek dendrytycznych, makrofagów i limfocytów T zaangażowane w rozwój NZJ.

**Publikacja 5**

**Tomasz Ślebioda**, Z. Kmieć. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators of Inflammation* (2014); 2014: 325129

Celem tej pracy przedstawionej w zestawieniu było przedstawienie istniejącego stanu wiedzy na temat udziału białek z nadrodziny czynnika martwicy nowotworu, w tym TL1A i VEGI-192, w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit, co pozwoliło zaplanować dalsze badania w tym zakresie. Jest to praca poglądowa, w której opisano mechanizmy molekularne zaangażowane w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit ze szczególnym uwzględnieniem białek z nadrodziny czynnika martwicy nowotworu i ich receptorów. Omówiono także zastosowanie inhibitorów wybranych białek z nadrodziny TNFSF w terapii nieswoistych zapaleń jelit. Praca powstała częściowo w oparciu o własne wyniki badań oraz została rozszerzona o zebrane dane literaturowe.

### Wnioski:

Badania przeprowadzone w ramach realizacji przedstawionego wyżej celu naukowego pozwoliły wysnuć następujące wnioski:

1. Poziom transkryptu TL1A jest podniesiony w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita grubego pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit i jest pozytywnie skorelowany z poziomem prozapalnej interleukiny 17A (IL-17A). Obecność białka TL1A oraz jego receptora DR3 stwierdzono w napływowych mononuklearnych komórkach błony śluzowej jelita grubego oraz w komórkach nabłonka jelita grubego. W ten sposób TL1A może lokalnie przyczyniać się do zwiększenia stanu zapalnego.
2. Poziom białka TL1A wzrasta w surowicy krwi osób z nieswoistymi zapaleniami jelit. Poza tym, u pacjentów dorosłych stwierdzono zwiększony odsetek limfocytów CD8(+) oraz limfocytów B wykazujących ekspresję receptora DR3. We krwi dzieci z nieswoistymi zapaleniami jelit zwiększony odsetek komórek z ekspresją DR3 występuje wśród limfocytów CD8(+), limfocytów B oraz komórek dendrytycznych. Sugeruje to istnienie mechanizmu, w którym TL1A może zwiększać stan zapalny systemowo.
3. W raku jelita grubego stwierdzono podniesiony poziom ekspresji transkryptów TL1A i VEGI-192, który zmieniał się wraz z progresją nowotworu. Wysoki poziom TL1A związany był z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu, natomiast wyższy poziom VEGI-192 związany był z niższym stopniem zaawansowania nowotworu. Zidentyfikowano także allele T polimorfizmu rs6478108 oraz G polimorfizmu rs6478109 jako związane z podwyższoną ekspresją genu *TNFSF15*.
4. Poziomy transkryptów TL1A i VEGI-192 w tkance raka jelita grubego stanowią niezależne czynniki prognostyczne tego dla schorzenia.

W pracach 1 – 3 przedstawiono wyniki pierwszych badań dotyczących udziału TL1A i VEGI-192 w rozwoju nieswoistych zapaleń jelit i/lub raka jelita grubego przeprowadzonych na taką skalę na ludziach. Stanowią one podstawę do opracowania skuteczniejszych metod diagnostycznych oraz terapeutycznych tych schorzeń, opierających się na neutralizacji lub detekcji TL1A i/lub VEGI-192 w zmienionej chorobowo tkance.

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

Szczegółowy wykaz pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych znajduje się w załączniku „Informacje o osiągnięciach dydaktycznych, odbytych stażach, współpracy z instytucjami i o działalności popularyzującej naukę”.

Analiza bibliometryczna dorobku naukowego przedstawiona jest w załącznikach „Analiza bibliometryczna publikacji dr. Tomasza Ślebioda w postępowaniu o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego” oraz „Wskaźniki bibliometryczne publikacji autorstwa dr. Tomasza Ślebioda stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 12 ust. 2 ustawy” (szczegółowa analiza bibliometryczna wykonana przez Pracownię Bibliograficzną Biblioteki Głównej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego).

### Pozostałe prace dotyczyły następujących zagadnień:

1. Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej po stereotaktycznym napromienianiu raka płuca.
2. Mechanizmy procesu starzenia w limfocytach NK.
3. Identyfikacja optymalnych genów referencyjnych dla reakcji qPCR.
4. Analiza udziału białka RASSF1A w rozwoju jasnokomórkowego raka nerki.
5. Analiza wpływu wybranych związków chemicznych na proliferację i przeżywalność komórek.

#### 5.1. Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej po stereotaktycznym napromienianiu raka płuca.

Prowadzone badania realizowane były w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki *Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej po stereotaktycznym napromienianiu raka płuca*, nr rej. 2012/07/B/NZ5/00587, którego byłem głównym wykonawcą. Ich celem było określenie zmian zachodzących w populacjach limfocytów pomocniczych Th1, Th2 i Th17 oraz limfocytów T regulatorowych (Treg) we krwi obwodowej pacjentów z rakiem płuca poddawanych stereotaktycznej radioterapii, które mogą mieć przełożenie na skuteczność stosowanej terapii.

1. Rutkowski J, Cyman M, **Tomasz Ślebioda**, Bemben K, Rutkowska A, Gruchała M, Kmieć Z, Pliszka A, Zaucha R. Evaluation of peripheral blood T lymphocyte Surface activation

markers and transcription factors in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Cellular Immunology* (2017); 322: 26-33

W badaniach przedstawionych w **pierwszej** publikacji z tego cyklu scharakteryzowano populacje limfocytów T we krwi obwodowej pacjentów z wczesnym stadium raka płuca. W badaniu wzięło udział 80 pacjentów z rakiem płuca w stopniu T1/2aN0M0 przed rozpoczęciem leczenia oraz 40 pacjentów kontrolnych bez chorób nowotworowych i przewlekłych chorób zapalnych. We krwi pacjentów z rakiem płuca stwierdzono znacznie większy odsetek limfocytów T CD8(+) i CD4(+) wykazujących ekspresję CTLA-4, niższy odsetek limfocytów T CD8(+) i CD4(+) wykazujących ekspresję PD-1 oraz wyższy odsetek limfocytów T regulatorowych w porównaniu z pacjentami kontrolnymi. Poza tym, u pacjentów z rakiem płuca ilość limfocytów T CD4(+)PD-1(+) związana była z gorszym rokowaniem, natomiast niski stosunek limfocytów CD4(+) do CD8(+) związany był z lepszym rokowaniem. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że rak płuca już na początkowym etapie rozwoju wywołuje zmiany w aktywności układu odpornościowego, które mogą mieć wpływ na przeżywalność pacjentów.

2. Rutkowski J, **Tomasz Ślebioda**, Zaucha R. Changes in systemic immune response after stereotactic ablative radiotherapy. Preliminary results of a prospective study in patients with early lung cancer. *Polish Archives of Internal Medicine* (2017); 127(4): 245-253

Celem badań przedstawionych w **drugiej** publikacji z tej grupy było sprawdzenie, czy nagła śmierć dużej liczby komórek nowotworowych w wyniku napromieniania stereotaktycznego prowadzi do zmian w profilu odpowiedzi immunologicznej. W badaniu wzięło udział 89 pacjentów z rakiem płuca poddawanych radioterapii. Od pacjentów trzykrotnie pobierano krew – przed rozpoczęciem radioterapii oraz 2 i 12 tygodni po naświetlaniu. Następnie zmierzono we krwi poziom białka C-reaktywnego (CRP), liczbę neutrofilii, limfocytów oraz leukocytów. Za pomocą cytometrii przepływowej oceniono także odsetek limfocytów Th1, Th2, Th17 oraz limfocytów T regulatorowych (Treg). W trakcie badania poziom CRP, ilość neutrofilii oraz leukocytów pozostawały bez większych zmian. Zaobserwowano niewielką leukopenię związaną z napromienianą objętością płuca. Badania cytometryczne wykazały, że po radioterapii u badanych pacjentów wzrósł odsetek limfocytów T CD8(+) i CD4(+), jak również limfocytów Th1, Th2 i Th17. Nie zmienił się natomiast odsetek limfocytów Treg. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że stereotaktyczna radioterapia raka płuca zwiększa ilość prozapalnych komórek układu odpornościowego we

krwi, przyczyniając się w ten sposób do zwiększenia intensywności odpowiedzi immunologicznej.

## 5.2. Mechanizmy procesu starzenia w limfocytach NK.

Celem badań przedstawionych w tym punkcie była ocena ekspresji białek ochronnych biorących udział w odpowiedzi komórki na stres – SIRT1, SOD2 i HSP70 w limfocytach NK krwi obwodowej trzech grup wiekowych (osoby młode, seniorzy poniżej 85. roku życia i seniorzy powyżej 85. roku życia) w odniesieniu do różnych warunków stymulacji.

1. Kaszubowska L, Foerster J, Kaczor JJ, Schetz D, **Tomasz Ślebioda**, Kmieć Z. Expression of cellular protective proteins SIRT1, HSP70 and SOD2 correlates with age and is significantly higher in NK cells of the oldest seniors. *Immunity and Ageing* (2017); 14:3 DOI: 10.1186/s12979-017-0085-4

W **pierwszej** publikacji z tego cyklu przedstawiono badania przeprowadzone na niestymulowanych limfocytach NK uzyskanych od osób młodych (średnia wieku 21 lat), seniorów poniżej 85. roku życia (średnia wieku 76 lat) i seniorów powyżej 85. roku życia (średnia wieku 88 lat). Limfocyty NK osób najstarszych wykazywały najwyższą ekspresję białek SIRT1, SOD2 i HSP70, a odsetek limfocytów NK wykazujących ekspresję badanych białek był dodatnio skorelowany z wiekiem badanych osób.

2. Kaszubowska L, Foerster J, Kaczor JJ, Schetz D, **Tomasz Ślebioda**, Kmieć Z. NK cells of the oldest seniors represent constant and resistant to stimulation high expression of cellular protective proteins SIRT1 and HSP70. *Immunity and Ageing* (2018); 15:12 DOI 10.1186/s12979-018-0115-x

Badania przedstawione w **drugiej** publikacji z tego cyklu prowadzone były na limfocytach izolowanych z krwi osób młodych (średni wiek 20,9 lat), seniorów poniżej 85. roku życia (średni wiek 75,6 lat) i seniorzy powyżej 85. roku życia (średni wiek 88,5 lat) i stymulowanych IL-2, LPS lub PMA z jonomycyną. W najstarszej grupie wiekowej stwierdzono najwyższą ekspresję SIRT1 i HSP70 zarówno w niestymulowanych, jak i stymulowanych limfocytach NK. Komórki te były także najbardziej odporne na stymulację IL-2, LPS i PMS z jonomycyną. Ekspresja SOD2 była niska w komórkach niestymulowanych, jednak wzrastała po stymulacji, przy czym wzrost ten był silniejszy w starszych grupach wiekowych. W badanych komórkach nie zauważono zmian ekspresji



markerów stresu oksydacyjnego. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że osoby starsze posiadają dobrze rozwiniętą odpowiedź komórek NK na stres, co wynika ze stałej, podwyższonej ekspresji SIRT1 i HSP70.

3. Kaszubowska L, **Tomasz Ślebioda**, Foerster J, Kmieć Z. Znaczenie komórek NK w procesie starzenia fizjologicznego. *Postępy Biologii Komórki* (2012); 39(1): 1223-137

**Trzecia** publikacja w tym zestawieniu jest pracą przeglądową dotyczącą roli limfocytów NK w procesie starzenia. W publikacji omówiono wpływ starzenia na ekspresję receptorów hamujących i aktywujących na powierzchni limfocytów NK oraz na zmiany odpowiedzi tych komórek na działanie cytokin. Poruszono także wynikające ze starzenia zagadnienia dotyczące zmian długości telomerów i aktywności telomerazy w limfocytach NK.

4. Tomasz Ślebioda, Kaszubowska L, Kmieć Z. Nowe mechanizmy aktywacji komórek NK w przebiegu infekcji wirusowych. *Postępy Biologii Komórki* (2012); 39(1): 49-62

**Czwarta** publikacja jest pracą przeglądową dotyczącą mechanizmów aktywacji limfocytów NK w przebiegu infekcji wirusowych. W pracy opisano interakcje limfocytów NK z komórkami dendrytycznymi i limfocytami T, regulujące ich aktywność. Przedstawiono także wirusowe strategie ochronne skierowane przeciwko limfocytom NK.

### **5.3. Identyfikacja optymalnych genów referencyjnych dla reakcji qPCR**

Badania te przeprowadzono w celu zoptymalizowania doświadczeń z zastosowaniem techniki qPCR, które są szeroko stosowane w Katedrze i Zakładzie Histologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Stosowanie optymalnych genów referencyjnych, których ekspresja nie ulega zmianie w badanych tkankach lub komórkach, jest kluczowe do uzyskania wiarygodnych wyników metodą qPCR.

1. Wierzbicki PM, Kłęcz J, Rybarczyk A, **Tomasz Ślebioda**, Stanisławowski M, Wrońska A, Kowalczyk A, Matuszewski M, Kmieć Z. Identification of a suitable qPCR reference gene in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Tumor Biology* (2014); 35(12): 12473-12487

Celem **pierwszej** pracy w tym zestawieniu było zidentyfikowanie genu referencyjnego dla reakcji qPCR przeprowadzanych na materiale genetycznym uzyskiwanej z tkanki jasnokomórkowego raka nerki. W trakcie badań sprawdzono stabilność ekspresji genów



*GADPH*, *ACTB*, *GUSB*, *RPL13* i *RPL10*, z których największą stabilność uzyskała para genów *GUSB* i *RPL13*.

2. Kaszubowska L, Wierzbicki PM, Karsznia S, Damska M, **Tomasz Ślebioda**, Foerster J, Kmieć Z. Optimal reference genes for qPCR in resting and activated human NK cells – Flow cytometric data correspond to qPCR gene expression analysis. *Journal of Immunological Methods* (2015); 422: 125-129

Celem **drugiej** pracy z tego zestawienia było zidentyfikowanie genu referencyjnego, który mógłby być stosowany w badaniach genetycznych na stymulowanych i niestymulowanych limfocytach NK. Badania przeprowadzono na komórkach NK-92 stymulowanych IL-2 lub TNF przez 2, 24 lub 72 godziny oraz na niestymulowanych komórkach kontrolnych. Największą stabilnością ekspresji charakteryzował się gen *B2M*, następnie *IPO-8* i *GAPDH*, a w ostatniej kolejności *HPRT1*, *PPIA* i *RPL32*. Dane uzyskane w badaniach genetycznych były zgodne z danymi uzyskanymi w badaniach cytometrycznych dotyczących ekspresji określonych białek.

#### **5.4. Analiza udziału białka RASSF1A w rozwoju jasnokomórkowego raka nerki**

1. Kłącz J, Wierzbicki PM, Wrońska A, Rybarczyk A, Stanisławowski M, **Tomasz Ślebioda**, Olejniczak A, Matuszewski M, Kmieć Z. Decreased expression of RASSF1A tumor suppressor gene is associated with worse prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *International Journal of Oncology* (2016); 48(1): 55-66

Gen *RASSF1*, którego izoformami są *RASSF1A* i *RASSF1C*, jest genem supresorowym, jednak do tej pory jego udział w rozwoju jasnokomórkowego raka nerki nie był badany. Celem badań przedstawionych w tej publikacji było określenie związku zaawansowania nowotworu z poziomem ekspresji transkryptów i białek *RASSF1A* i *RASSF1C*. Badania przeprowadzono z zastosowaniem technik qPCR oraz western blotting na próbkach tkanki uzyskanej od 86 pacjentów z jasnokomórkowym rakiem nerki w różnych stadiach zaawansowania oraz na prawidłowej tkance nerki (marginesie operacyjnym) uzyskanej podczas chirurgicznego wycięcia nowotworu. Poziom *RASSF1C* był podniesiony w tkance zmienionej nowotworowo w porównaniu z tkanką prawidłową, lecz nie zauważono związku pomiędzy poziomem ekspresji a wynikami klinicznymi pacjentów. Z kolei obniżony poziom ekspresji *RASSF1A* związany był krótszą przeżywalnością pacjentów.

### 5.5. Analiza wpływu wybranych związków chemicznych na proliferację i przeżywalność komórek.

1. Siedlecka-Kroplewska K, Szczerba A, Lipińska A, **Tomasz Ślebioda**, Kmiec Z. 3-Fluoromethcathinone, a structural analog of mephedrone, inhibits growth and induces cell cycle arrest in HT22 mouse hippocampal cells. *Journal of Physiology and Pharmacology* (2014); 65(2): 241-246

3-fluorometkatynon jest analogiem mefedronu, narkotyku często stosowanego jako stymulant lub empatogen. Celem badań przedstawionych w **pierwszej** publikacji w tym zestawieniu było określenie wpływu tego związku na komórki HT-22, wywodzące się z mysiego hipokampu. Uzyskane wyniki wykazały, że 3-fluorometkatynon zatrzymuje cykl komórkowy w fazie G0/G1. W momencie ukazania się, była to pierwsza publikacja wykazująca cytotoksyczne działanie 3-fluorometkatynonu.

2. Piotrowska A, Wierzbicka J, **Tomasz Ślebioda**, Woźniak M, Tuckey RC, Słomiński AT, Żmijewski A. Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or cisplatin on human keratinocytes. *Steroids* (2016); 110: 49-61

W **drugiej** publikacji z tego zestawienia przedstawiono wpływ witaminy D na odpowiedź komórkową na stymulację nadtlenkiem wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) lub lekiem przeciwnowotworowym, cisplatyną. Rola witaminy D, której synteza jest aktywowana w keratynocytach przez promieniowanie UVB, w stresie oksydacyjnym w momencie ukazania się tej publikacji pozostawała w dużej mierze nieznaną. Badania prowadzono na komórkach HaCaT, unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytach. Inkubacja komórek z witaminą D lub jej analogami uwrażliwiała je na działanie wolnych rodników, prowadząc do zwiększenia cytotoksycznego działania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz cisplatyny. Poza tym, w keratynocytach HaCaT stymulowanych witaminą D i jej pochodnymi zauważono wzrost ekspresji genów *SOD1* i *CAT*, co sugeruje udział mitochondriów w śmierci komórkowej powodowanej przez stres oksydacyjny. Uzyskane wyniki sugerują, że witamina D lub jej analogi mogą być stosowane jako adjuwant w chemioterapii czerniaka z zastosowaniem cisplatyny.

#### Piśmiennictwo

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91.
2. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging*. 2016;11:967-76.

3. Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *The Lancet. Oncology*. 2013;14(12):1165-74.
4. Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur)*. 2012;107(5):555-63.
5. Hadjipetrou A, Anyfantakis D, Galanakis CG, Kastanakis M, Kastanakis S. Colorectal cancer, screening and primary care: A mini literature review. *World J Gastroenterol*. 2017;23(33):6049-58.
6. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-502.
7. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073-87 e3.
8. Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):514-21.
9. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010;6(5):339-46.
10. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(23):3668-72.
11. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2033-45.
12. Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*. 2005;307(5710):734-8.
13. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14(22):3499-506.
14. Lin Z, Poritz L, Franke A, et al. Genetic association of DLG5 R30Q with familial and sporadic inflammatory bowel disease in men. *Dis Markers*. 2009;27(5):193-201.
15. Bamias G, Kaltsa G, Ladas SD. Cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Discov Med*. 2011;11(60):459-67.
16. Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis*. 2010;28(4-5):619-24.
17. Migone TS, Zhang J, Luo X, et al. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity*. 2002;16(3):479-92.
18. Chew LJ, Pan H, Yu J, et al. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor. *FASEB J*. 2002;16(7):742-4.
19. Ślebioda TJ, Bojarska-Junak A, Stanislawowski M, et al. TL1A as a Potential Local Inducer of IL17A Expression in Colon Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Scand J Immunol*. 2015;82(4):352-60.
20. Richard AC, Ferdinand JR, Meylan F, et al. The TNF-family cytokine TL1A: from lymphocyte costimulator to disease co-conspirator. *J Leukoc Biol*. 2015;98(3):333-45.
21. Metheny-Barlow LJ, Li LY. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), an endogenous negative regulator of angiogenesis. *Semin Ophthalmol*. 2006;21(1):49-58.
22. Kamada N, Hisamatsu T, Honda H, et al. TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 and Th17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(4):568-75.
23. Meylan F, Davidson TS, Kahle E, et al. The TNF-family receptor DR3 is essential for diverse T cell-mediated inflammatory diseases. *Immunity*. 2008;29(1):79-89.
24. Fang L, Adkins B, Deyev V, Podack ER. Essential role of TNF receptor superfamily 25 (TNFRSF25) in the development of allergic lung inflammation. *J Exp Med*. 2008;205(5):1037-48.
25. Zhou M, Liu R, Su D, Feng X, Li X. TL1A increased the differentiation of peripheral Th17 in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2014;69(1):125-30.
26. Meylan F, Song YJ, Fuss I, et al. The TNF-family cytokine TL1A drives IL-13-dependent small intestinal inflammation. *Mucosal Immunol*. 2011;4(2):172-85.
27. Taraban VY, Ślebioda TJ, Willoughby JE, et al. Sustained TL1A expression modulates effector and regulatory T-cell responses and drives intestinal goblet cell hyperplasia. *Mucosal Immunol*. 2011;4(2):186-96.
28. Ślebioda TJ, Rowley TF, Ferdinand JR, et al. Triggering of TNFRSF25 promotes CD8(+) T-cell responses and anti-tumor immunity. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2606-11.
29. Shih DQ, Barrett R, Zhang X, et al. Constitutive TL1A (TNFSF15) expression on lymphoid or myeloid cells leads to mild intestinal inflammation and fibrosis. *PLoS One*. 2011;6(1):e16090.
30. Zheng L, Zhang X, Chen J, et al. Sustained T11a (Tnfsf15) Expression on Both Lymphoid and Myeloid Cells Leads to Mild Spontaneous Intestinal Inflammation and Fibrosis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2013;3(1):11-20.

31. Sun Y, Irwanto A, Toyo-Oka L, et al. Fine-mapping analysis revealed complex pleiotropic effect and tissue-specific regulatory mechanism of TNFSF15 in primary biliary cholangitis, Crohn's disease and leprosy. *Sci Rep*. 2016;6:31429.
32. Ye BD, Choi H, Hong M, et al. Identification of Ten Additional Susceptibility Loci for Ulcerative Colitis Through Immuchip Analysis in Koreans. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(1):13-9.
33. Kepiro L, Szell M, Kovacs L, et al. Genetic risk and protective factors of TNFSF15 gene variants detected using single nucleotide polymorphisms in Hungarians with psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol*. 2014;75(2):159-62.
34. Zhang Z, Yu D, Lu J, et al. Functional genetic variants of TNFSF15 and their association with gastric adenocarcinoma: a case-control study. *PLoS One*. 2014;9(9):e108321.
35. Zhang N, Sanders AJ, Ye L, Kynaston HG, Jiang WG. Vascular endothelial growth inhibitor, expression in human prostate cancer tissue and the impact on adhesion and migration of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol*. 2009;35(6):1473-80.
36. Tian F, Liang PH, Li LY. Inhibition of endothelial progenitor cell differentiation by VEGI. *Blood*. 2009;113(21):5352-60.
37. Hou W, Medynski D, Wu S, Lin X, Li LY. VEGI-192, a new isoform of TNFSF15, specifically eliminates tumor vascular endothelial cells and suppresses tumor growth. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5595-602.
38. Zhang N, Wu P, Wu L, et al. The differential expression of vascular endothelial growth inhibitor isoforms, VEGI251, VEGI174 and VEGI192 in human clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013;10(1):47-53.
39. Jia W, Sander AJ, Jia G, et al. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) is an independent indicator for invasion in human pituitary adenomas. *Anticancer Res*. 2013;33(9):3815-22.
40. Ślebioda TJ, Bojarska-Junak A, Cyman M, et al. Expression of death receptor 3 on peripheral blood mononuclear cells differs in adult IBD patients and children with newly diagnosed IBD. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(2):165-9.
41. Ślebioda TJ, Stanislawowski M, Cyman M, et al. Distinct Expression Patterns of Two Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 15 Gene Isoforms in Human Colon Cancer. *Dig Dis Sci*. 2019.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć

### Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach

- 1) *Analiza udziału dwóch izoform białka TNFSF15 (VEGI i TL1A) w patomechanizmach raka jelita grubego*. Grant Narodowego Centrum Nauki (SONATA), nr rej. 2013/09/D/NZ5/0265, lata 2014 – 2018; kierownik projektu
- 2) *Ocena profilu odpowiedzi immunologicznej po stereotaktycznym napromienianiu raka płuca*. Grant Narodowego Centrum Nauki (OPUS), nr rej. 2012/07/B/NZ5/00587, lata 2013 - 2016; wykonawca
- 3) *Analiza udziału białka TL1A oraz jego receptora DR3 w patomechanizmach przewlekłych nieswoistych zapaleń jelit u dorosłych i dzieci*. Grant Narodowego Centrum Nauki (OPUS), nr rej. 2011/01/B/NZ5/01358, lata 2011 – 2014; wykonawca

### Członkostwo w towarzystwach naukowych

- 1) Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików (PTHiC); od 2010 r.

## **Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych**

- 1) *Digestive Diseases and Sciences*
- 2) *Folia Histochemica et Cytobiologica*

## **Współpraca z innymi jednostkami naukowymi**

### Jednostki z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej GUMed: 1 publikacja (2019 r.)
- Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej GUMed: 1 publikacja (2019 r.)
- Katedra i Klinika Gastroenterologii i Hepatologii GUMed: 1 publikacja (2019 r.)
- Zakład Gerontologii Społecznej i Klinicznej GUMed: 3 publikacje (lata 2018, 2017 i 2012)
- Zakład Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego GUMed: 2 publikacje (lata 2018 i 2017)
- Katedra i Zakład Farmakologii GUMed: 2 publikacje (lata 2018 i 2017)
- Katedra i Klinika Onkologii i Radioterapii GUMed: 2 publikacje (2017 r.)
- Zakład Medycyny Laboratoryjnej GUMed: 1 publikacja (2017 r.)
- I Katedra i Klinika Kardiologii: 1 publikacja (2017 r.)
- Katedra i Klinika Urologii GUMed: 1 publikacja (2016 r.)

### Jednostki spoza Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

- Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej, Uniwersytet Gdański: 2 publikacje (lata 2019 i 2014)
- School of Chemistry and Biochemistry, The University of Western Australia, Crawley, Australia: 1 publikacja (2016 r.)
- Departments of Dermatology and Pathology, University of Alabama, Birmingham, VA, USA: 1 publikacja (2016 r.)
- Katedra Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie: 2 publikacje (lata 2017 i 2015)
- Katedra Gastroenterologii z Oddziałem Endoskopii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie: 2 publikacje (lata 2017 i 2015)

**Doniesienia konferencyjne**

- 1) *Altered expression of RASSF1A and YAP1 genes is associated with progression of renal cell carcinoma.* Wierzbicki PM, Rybarczyk A, Wrońska A, Stanisławowski M, Kłacz J, **Tomasz Ślebioda**, Matuszewski M, Kmieć Z. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry „From molecules to diseases”, ICHC 2017; Turcja, Antalya, 18 – 21 maja 2017 r.
- 2) *Ekspresja genów HTRA w onkogenezie jelita grubego.* Kobiela J, Żurawa-Janicka D, **Tomasz Ślebioda**, Stanisławowski M, Pęksa R, Wenta T, Wierzbicki PM, Łachiński A, Kmieć Z, Biernat W, Lipińska B. 68. Kongres Towarzystwa Chirurgów Polskich; Polska, Kraków, 27 – 30 września 2017 r.
- 3) *Mechanism of TRAIL-dependent apoptosis in aspirin and ibuprofen-induced colorectal cancer cells.* Cyman M, **Tomasz Ślebioda**, Olejniczak A, Kmieć Z. XI Copernican International Young Scientists Conference; Polska, Toruń, 28 – 30 czerwca 2017 r.
- 4) *The elements of the Hippo pathway are deregulated in clear-cell renal cell carcinoma.* Wierzbicki PM, Kłacz J, Rybarczyk A, Stanisławowski M, **Tomasz Ślebioda**, Wrońska A, Olejniczak A, Matuszewski M, Kmieć Z. 50. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; Polska, Wojanów, 5 – 8 września 2016 r.
- 5) *Udział TRAIL i jego receptorów DR4 i DR5 w rozwoju raka jelita grubego.* Cyman M, **Tomasz Ślebioda**, Kmieć Z. 50. Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; Polska, Wojanów, 5 – 8 września 2016 r.
- 6) *Expression of TL1A and VEGI changes with the progression of colon cancer.* **Tomasz Ślebioda**, Cyman M, Stanisławowski M, Kobiela J, Kmieć Z. BSI / NVVI Congress 2016; Wielka Brytania, Liverpool, 6 – 9 grudnia 2016 r.
- 7) *Differential expression of death receptor 3 on peripheral blood mononuclear cells of adults and newly diagnosed children with IBD.* **Tomasz Ślebioda**, Cyman M, Bojarska-Junak A, Landowski P, Kamińska B, Celiński K, Kmieć Z. 20th Leipziger Workshop Translational Cytomics; Niemcy, Lipsk, 04 – 06 marca 2015 r.
- 8) *Analysis of alternative signaling pathway in clear-cell renal cell carcinoma: first announcement.* Kłacz J, Wierzbicki PM, Rybarczyk A, Stanisławowski M, **Tomasz Ślebioda**, Wrońska A, Kmieć Z, Matuszewski M. 35th Congress of the Societe Internationale d’Urologie; Australia, Melbourne, 15 – 18 października 2015 r.



- 9) *Immune response profile assessment after stereotactic radiotherapy for lung cancer.* Rutkowski J, **Tomasz Ślebioda**, Zaucha R. European Society for Radiotherapy and Oncology, 3rd ESTRO Forum; Hiszpania, Barcelona, 24 – 28 kwietnia 2015 r.
- 10) *Vitamin D enhances toxic effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on human HaCaT keratinocytes: model for the interaction of vitamin D with common anticancer drugs.* Piotrowska A, Wierzbicka J, **Tomasz Ślebioda**, Woźniak M, Żmijewski MA. XLIX Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; Polska, Międzyzdroje, 9 – 12 września 2015 r.
- 11) *Identification of reference genes for gene expression analysis by qPCR in inflammatory bowel diseases.* Cyman M, **Tomasz Ślebioda**. 22nd International Student Scientific Conference for Students and Young Doctors; Polska, Gdańsk, 24 – 26 kwietnia 2014 r.
- 12) *Analiza szlaku Hippo u chorych na raka jasnokomórkowego nerki.* Kłęcz J, Matuszewski M, Wierzbicki PM, Rybarczyk A, Stanisławowski M, **Tomasz Ślebioda**, Wrońska A, Kmieć Z. 44th Scientific Congress of the Polish Urological Association; Polska, Warszawa, 4 – 6 września 2014 r.
- 13) *Ekspresja receptora śmierci (DR3) na limfocytach we krwi obwodowej dorosłych i dzieci z przewlekłymi nieswoistymi zapaleniami jelit.* **Tomasz Ślebioda**, Cyman M, Bojarska-Junak A, Roliński J, Landowski P, Celiński K, Kamińska B, Kmieć Z. III Zjazd Polskiego Towarzystwa Cytometrii; Polska, Kazimierz Dolny, 17 – 19 września 2014 r.
- 14) *Udział prozapalnej cytokiny TL1A w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit u dzieci.* Landowski P, **Tomasz Ślebioda**, Wierzbicki PM, Stanisławowski M, Kmieć Z, Szatewicz-Sieczkowska A, Kosek M, Kamińska B. VIII Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci; Polska, Warszawa, 22 – 24 maja 2014 r.
- 15) *Zmiany profilu odpowiedzi immunologicznej po stereotaktycznej radioterapii raka płuca.* **Tomasz Ślebioda**, Rutkowski J, Zaucha R. XLVIII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; Polska, Wisła, 3 – 6 września 2014 r.
- 16) *TL1A/DR3 interaction is associated with pathogenesis of inflammatory bowel disease in adults and children.* **Tomasz Ślebioda**, Wierzbicki PM, Stanisławowski M, Celiński K, Landowski P, Kamińska B, Bojarska-Junak A, Roliński J, Adrych K, Kmieć Z. 15th International Congress of Immunology; Włochy, Mediolan, 22 – 27 sierpnia 2013 r.
- 17) *3-fluoromethcathinone, a structural analog of mephedrone, inhibits growth and induces cell death in HT22 hippocampal cells.* Siedlecka-Kroplewska K, Szczerba A, **Tomasz**

**Ślebioda**, Kmiec Z. XLVII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików; Polska, Olsztyn, 4 – września 2013 r.

- 18) *Analysis of Fas > Raf > MST2 > RASSF1A > LATS1 > YAP1 > p73 > PUMA > BAX p53-independent apoptotic pathway in colorectal cancer*. Wierzbicki PM, Adrych K, Stanisławowski M, Kartanowicz D, **Tomasz Ślebioda**, Godlewski J, Celiński K, Gach T, Kulig J, Kmiec Z. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry; Japonia, Kyoto, 26 – 29 sierpnia 2012 r.

### **Działalność dydaktyczna**

Udział w przygotowaniu seminariów i ćwiczeń z następujących przedmiotów oraz prowadzenie następujących zajęć:

- Histologia z cytofizjologią – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Histology with Cell Physiology – seminaria i ćwiczenia dla studentów I roku English Division Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Histologia z cytofizjologią – ćwiczenia dla studentów I roku kierunku Analityka Medyczna Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Histologia narządu zębowego – ćwiczenia dla studentów I roku kierunku Techniki Dentystyczne Gdańskiego Uniwersytetu medycznego
- Wprowadzenie do biologii komórki nowotworowej – seminaria dla studentów I, II i III roku Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
- Introduction to Cancer Cell Biology - seminaria dla studentów I, II i III roku English Division Kierunku Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Pełniłem także funkcję opiekuna naukowego dla 3 magistrantów z Kierunku Analityka Medyczna Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Obecnie pełnię także funkcję promotora pomocniczego 1 doktorantki w Katedrze Histologii GUMed; tytuł pracy doktorskiej: „Udział białek TRAIL i receptorów DR4 i DR5 w rozwoju raka jelita grubego”.

### **Dorobek naukowy**



Wykaz dorobku naukowego przedstawiono szczegółowo w załącznikach „Analiza bibliometryczna publikacji dr. Tomasza Ślebioda w postępowaniu o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego” oraz „Wskaźniki bibliometryczne publikacji autorstwa dr. Tomasza Ślebioda stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 12 ust. 2 ustawy”.

*Łączna ilość punktów IF: 72,552*

*Łączna ilość punktów MNiSW: 467*

*Według bazy Scopus (11/03/2019):*

*h-index: 10*


*Całkowita ilość cytowań: 329*

*Według bazy Web of Science (11/03/2019):*

*h-index: 9*

*Ilość cytowań: 309; w tym bez autocytowań: 288*

*29/03/2019*



Tomasz Ślebioda