

Autoreferat

1. **Imię i nazwisko:** Barbara Anna Kutryb-Zajac

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

2017	Uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk medycznych nadanego przez Radę Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dyscyplina: biologia medyczna, specjalność: biochemia, Rozprawa doktorska pt. „Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów w stenozie aortalnej i miażdżycy naczyń” promotor: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński;
2013 – 2017	Studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
2013	Uzyskanie tytułu zawodowego magistra analityki medycznej, Praca magisterska pt. „Katabolizm nukleotydów adeninowych na powierzchni zastawek serca” promotor: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński;
2007 – 2013	Studia magisterskie na kierunku analityka medyczna na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

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

2018 – do chwili obecnej	Adiunkt w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
2016 – 2017	Młodszy specjalista w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;
2013 – 2016	Doktorant w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach stypendium programu TEAM FNP pt. „Nukleotydy w patologii, diagnostyce i terapii chorób serca”.

4. **Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy.**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 4 powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji dotyczących znaczenia aktywności naczyniowej deaminazy adenozyiny w stanach przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF=11.125 i MNiSW=205.000.

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

„Deaminaza adenozyiny w patologiach przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego”

b) osiągnięcie naukowe tworzy cykl 4 powiązanych tematycznie publikacji:

Praca 1. Kutryb-Zajac B, Koszalka P, Mierzejewska P, Bulinska A, Zabielska MA, Brodzik K, Skrzypkowska A, Zelazek L, Pelikant-Malecka I, Slominska EM, Smolenski RT. *Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor dependent mechanisms*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2018; 22(12): 5939-5954.

[IF=4.658; KBN/MNiSW 35.000]

Praca 2. Kutryb-Zajac B, Bulinska A, Zabielska MA, Zukowska P, Slominska EM, Smolenski RT. *Vascular extracellular adenosine metabolism in mice correlated with susceptibility to atherosclerosis*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37(11):653-662.

[IF=1.167; KBN/MNiSW 15.000]

Praca 3. Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, Sucajtyś-Szulc E, Bulinska A, Zabielska MA, Jablonska P, Serocki M, Koszalka P, Milczarek R, Jaształ A, Bartoszewski R, Chłopicki S, Słomska EM, Smolenski RT. *Inhibition of LPS-stimulated ecto-adenosine deaminase attenuates endothelial cell activation*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2019; 128: 62-76.

[IF=4.133; KBN/MNiSW 140.000]

Praca 4. Kutryb-Zajac B, Koszalka P, Słomska EM, Smolenski RT. *The effects of pro- and anti-atherosclerotic factors on intracellular nucleotide concentration in murine endothelial cells*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37(11):645-652.

[IF=1.167; KBN/MNiSW 15.000]

Łączna wartość bibliometryczna cyklu powyżej wymienionych publikacji wynosi:

IF: 11.125; punktacja MNiSW: 205.000

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład wybranych autorów w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załącznikach nr 5.1-5.4. Oświadczenia habilitantki dotyczące wykonanych prac oraz procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku nr 4.1.

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

Wykaz skrótów:

5'NT	- 5'nukleotydaza
ABP	- białko wiążące deaminazę adenozyne
ADA	- deaminaza adenozyne
AdK	- kinaza adenozyne
ADP	- adenozyne-5'-difosforan
ADSL	- liaza adenylbursztynianowa
ADSS	- syntetaza adenylbursztynianowa
AK	- kinaza adenylanowa
AMP	- adenozyne-5'-monofosforan
AMPD	- deaminaza adenozyne-5'-monofosforan
AR	- receptory adenozyne
ATP	- adenozyne-5'-trifosforan
cAMP	- cykliczny adenozyne-5'-monofosforan
CD26	- białko CD26, dipeptydylopeptydaza IV
CD39, eNTPD1	- ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1
CD73, e5'NT	- ekto5'-nukleotydaza
CNT	- stężeniowy transporter nukleozydów
dATP	- 2'-deoksyadenozyne-5'-trifosforan
dCF	- 2'-deoksykoformycyna
eADA	- ekto-deaminaza adenozyne
ENT	- równowagowy transporter nukleozydów
Hcy	- homocysteina
HGPRT	- fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
LPS	- lipopolisacharyd <i>E. Coli</i>
OX	- oksydaza ksantynowa
PNP	- fosforylaza nukleozydów purynowych
SAH	- S-adenozylhomocysteina
SAHH	- hydrolaza S-adenozylhomocysteiny
UTP	- urydyno-5'-trifosforan

Cel naukowy prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Celem przedstawionego osiągnięcia było wykazanie źródeł aktywności deaminazy adenozynej (ADA) w patologiach związanych z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego, identyfikacja mechanizmów wzrostu tej aktywności w komórkach śródbłonna oraz ocena potencjału terapeutycznego hamowania ADA w eksperymentalnych modelach dysfunkcji śródbłonna.

Cele szczegółowe obejmowały:

- Wykazanie głównych źródeł izoenzymów ADA w mikrośrodowisku nowotworowym oraz analizę wpływu hamowania ADA na funkcję śródbłonna naczyniowego w eksperymentalnych modelach raka piersi.
- Wykazanie zmian naczyniowych aktywności enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów i adenozynej, w tym ADA, u szczepów myszy o różnej podatności na rozwój miażdżycy.
- Identyfikację źródeł oraz mechanizmu wzrostu aktywności ADA w ludzkich naczyniach objętych procesem miażdżycowym oraz analizę potencjału terapeutycznego zastosowania jej inhibitorów w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego.
- Analizę wpływu związków modulujących aktywność ADA na status energetyczny komórek śródbłonna.

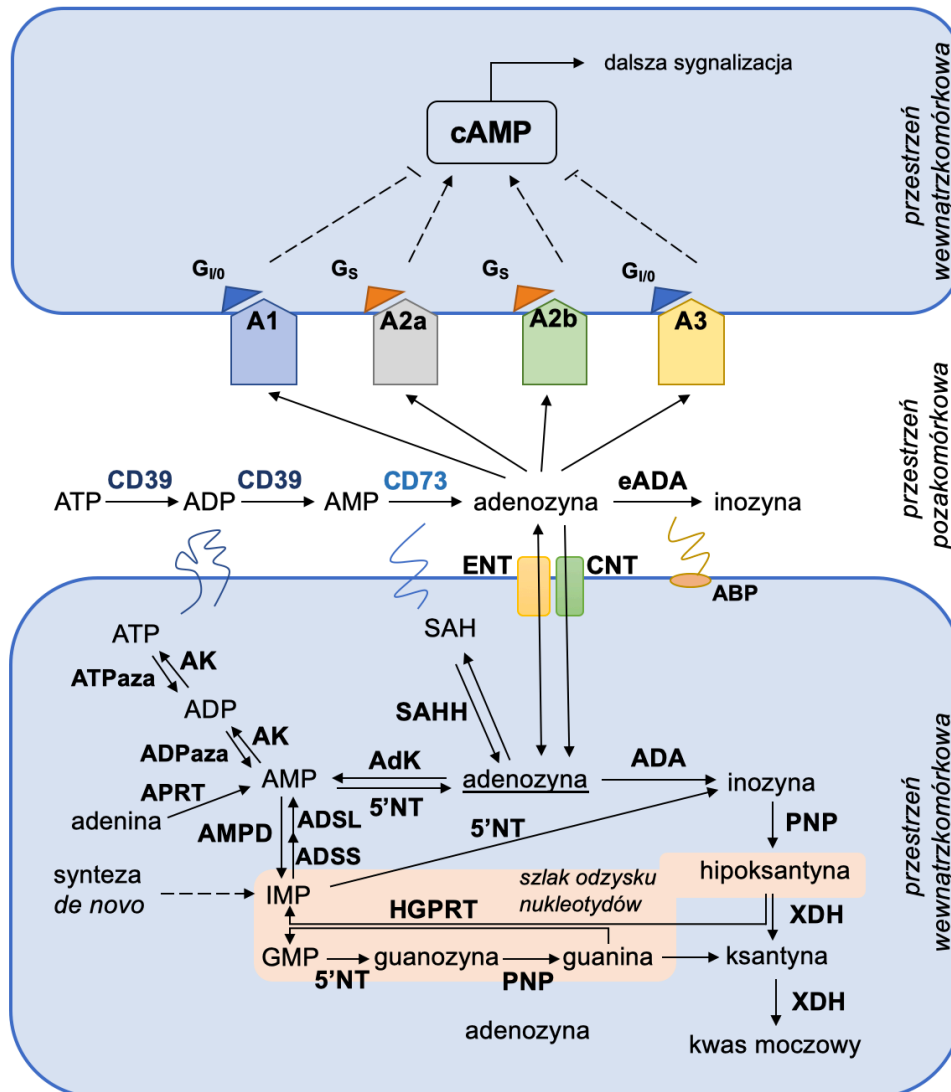
Wprowadzenie

Deaminaza adenozynej (ADA, EC 3.5.4.4) jest kluczowym enzymem metabolizmu puryn, przekształcającym adenozyne i 2'deoksyadenozyne odpowiednio do inozyny i 2'deoksyinozyny oraz amoniaku. (Cortés et al. 2015) W tkankach ludzkich ADA obecna jest w postaci dwóch izoenzymów: ADA1 i ADA2. (Gakis 1996) ADA1 stanowi większość aktywności ADA i jest obecna we wszystkich tkankach. (Moriwaki et al. 2004) Oprócz postaci cytozolowej, ADA1 może występować zewnątrzkomórkowo, jako ekto-enzym związany z błoną komórkową lub w formie wolnej (tzw. rozpuszczalnej). Ekto-deaminaza adenozynej 1 (eADA 1) jest kotwiczona na powierzchni komórki przez białka błonowe takie jak: receptory adenozynowe lub CD26. Drugi izoenzym ADA, ADA2 należy do grupy czynników wzrostu wykazujących aktywność deaminazy adenozynej i uważa się, że wraz z ADA1 obecna jest tylko w monocytach i makrofagach. ADA2 występuje wewnątrzkomórkowo, ale może być też uwalniana z komórki i występować w postaci rozpuszczalnej, będąc głównym izoenzymem ADA występującym w ludzkim osoczu. (Conlon and Law 2004b; Zavialov and Engström 2005) ADA2, podobnie jak ADA1 może funkcjonować jako ekto-enzym wiążąc się do proteoglikanów błon komórkowych lub receptorów adenozynowych. Różnicowanie izoenzymów ADA1 i ADA2 stało się możliwe, dzięki podatności ADA1 na hamowanie przez (+)-erythro-9-(2-hydroksy-3-nonylo)adeninę (EHNA), która nie wpływa na aktywność ADA2. (Andreasyan et al. 2005) Dzięki temu wykazano, że osocze szczura i myszy jest całkowicie pozbawione ADA2, a cała aktywność ADA u tych gryzoni pochodzi z ADA1. (Dong et al. 1997) Powinowactwo ADA1 do adenozynej i 2'deoksyadenozynej jest podobne (K_m dla tych substratów wynosi ok. 50 μM) a optymalne pH to 7-7,5. ADA2 charakteryzuje się znacznie niższym powinowactwem do naturalnych substratów (K_m wynosi ok. 2 mM dla adenozynej, podczas gdy dla 2'deoksyadenozynej jest czterokrotnie wyższe). (Gakis 1996) Optymalne pH dla ADA2 wynosi natomiast 6,5. (Gakis 1996)

Wewnątrzkomórkowa ADA odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie kwasów nukleinowych rozkładając 2'deoksyadenozyne, której akumulacja prowadzi do zatrzymania syntezy DNA. Ma to miejsce w przypadku genetycznego niedoboru deaminazy adenozynej prowadzącego do ciężkiego złożonego niedoboru odporności immunologicznej (SCID). Akumulująca się w komórce 2'deoksyadenozyne zostaje wówczas przekształcona do 2'-deoksyadenozyne-5'-trifosforanu (dATP), który hamuje aktywność reduktazy rybonukleotydowej, zaburza syntezę DNA i proliferację limfocytów, będącymi jednymi z najbardziej aktywnych mitotycznie komórek. (Flinn and Gennery 2018)

Stężenie wewnątrzkomórkowej adenozynej, drugiego substratu dla ADA, utrzymywane jest w warunkach fizjologicznych na niskim poziomie dzięki aktywności kinazy adenozynej (AK), która posiada

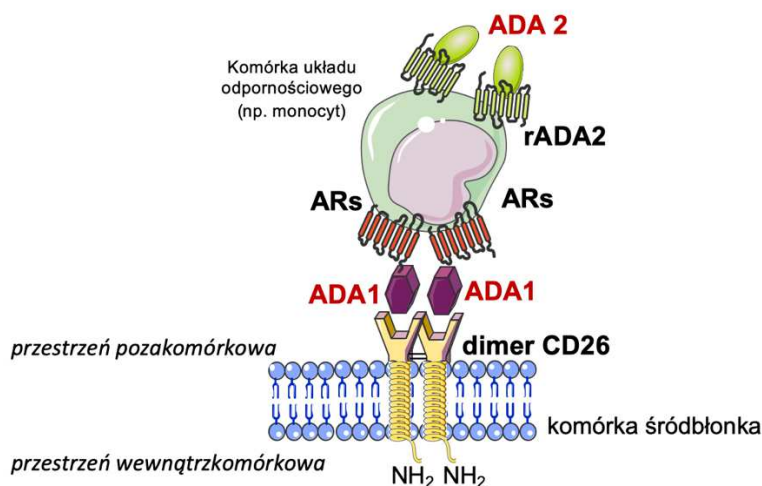
znacznie wyższe powinowactwo do adenozyiny niż ADA (K_m AK dla adenozyiny wynosi $0,8 \mu M$). W warunkach patologicznych, wywołanych np. niedotlenieniem, dochodzi do zmian w metabolizmie komórki prowadzących do spadku stężenia wewnątrzkomórkowego adenozyino-5'-trifosforanu (ATP), czego efektem jest wzrost stężenia adenozyino-5'-difosforanu (ADP), adenozyino-5'-monofosforanu (AMP) i adenozyiny. Dochodzi wówczas do zwiększenia roli ADA, pełniącej funkcję wspomagającą wewnątrzkomórkowy metabolizm adenozyiny. Innym enzymem zaangażowanym w wewnątrzkomórkowy metabolizm adenozyiny jest hydrolaza S-adenozylhomocysteiny (SAHH), która uwalnia adenozyinę w wyniku przemiany S-adenozylhomocysteiny (SAH) do homocysteiny (HCy). Reakcja ta jest odwracalna, stąd adenozyina może być wykorzystywana do ponownej syntezy SAH z HCy. Z uwagi na niskie stężenie SAH w komórce, wydaje się jednak, że znaczenie SAHH w metabolizmie adenozyiny ma raczej niewielkie znaczenie (Rycina 1).



Rycina 1. Rola deaminazy adenozyiny w metabolizmie adenozyiny i jej sygnalizacji receptorowej. ATP – adenozyino-5'-trifosforan, ADP - adenozyino-5'-difosforan, AMP - adenozyino-5'-monofosforan, AK – kinaza adenylanowa, AMPD – deaminaza AMP, ADSL – liaza adenylbursztynianowa, ADSS – syntetaza adenylbursztynianowa, AdK – kinaza adenozyiny, cAMP – cykliczny adenozyino-5'-monofosforan, 5'NT -5'nukleotydaza, SAH – S-adenozylhomocysteina, HGPRT – fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa, SAHH – hydrolaza S-adenozylhomocysteiny, ADA – deaminaza adenozyiny, PNP – fosforylaza nukleozydów purynowych, XDH – oksydoreduktaza ksantynowa, CD39 – ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa, CD73 – ekto5'nukleotydaza, eADA – ekto-deaminaza adenozyiny, A1 – receptor adenozyinowy typu A1, A2a – receptor adenozyinowy typu A2a, A2b – receptor adenozyinowy typu A2b, A3 – receptor adenozyinowy typu A3, $G_{1/0}$ – białko G hamujące, G_s – białko G stymulujące, cAMP – cykliczny adenozyino-5'-monofosforan.

Ważniejszą rolę w metabolizmie adenozyiny odgrywa występująca na powierzchni komórek eADA. Katalizuje ona rozkład adenozyiny w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, regulując jej dostępność dla czterech podtypów receptorów adenozyinowych (Ryciny 1 i 2). Ponieważ adenozyina jest cząsteczką

o silnych właściwościach sygnałowych, aktywność eADA kontroluje wiele zależnych od adenozyń procesów międzykomórkowych, w tym odpowiedź immunologiczną i zapalną, funkcję śródbłonka naczyniowego, odpowiedź adaptacyjną na hipoksję (niedotlenienie) oraz angiogenezę. (Eltzschig et al. 2006; Linden and Cekic 2012; Antonioli et al. 2013) Ponadto, oprócz swojej funkcji enzymatycznej, eADA odgrywa ważną rolę w interakcjach między komórkami, które posiadają na swojej powierzchni białka kotwiczące ADA (Rycina 2). Moreno et al. wykazali istnienie trimerycznych kompleksów CD26-ADA-A2AR z udziałem dwóch komórek. (Moreno et al. 2018) Tworzenie takich kompleksów pomiędzy dwiema komórkami zapalnymi ma kluczowe znaczenie w ich ko-stymulacji, podczas gdy zależna od ADA adhezja komórek zapalnych do komórek śródbłonka może aktywować naciek zapalny w warstwie podśródbłonkowej prowadząc do rozwoju miażdżycy, a adhezja komórek nowotworowych do śródbłonka może stymulować rozwój i przerzutowanie nowotworu.



Rycina 2. Pozaenzymatyczne funkcje ekto-deaminazy adenozyń. ADA1 – deaminaza adenozyń 1, ADA2 – deaminaza adenozyń 2, eADA – ekto-deaminaza adenozyń, rADA2 – receptor dla ADA2, ARs – receptory adenozyńowe.

Praca 1. Kutryb-Zajac B et al. *Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor dependent mechanisms.* Journal of Cellular and Molecular Medicine 2018; 22(12): 5939-5954.

Cel pracy 1

Wykazanie głównych źródeł izoenzymów ADA w mikrośrodowisku nowotworowym oraz analiza wpływu hamowania ADA na funkcję śródbłonka naczyniowego w eksperymentalnych modelach raka piersi.

Na skutek szybkiej proliferacji komórek nowotworowych w obrębie guzów litych tworzy się mikrośrodowisko, które charakteryzuje się hipoksją, niskim pH oraz ograniczoną podażą składników odżywczych. W celu zachowania potencjału proliferacyjnego i możliwości tworzenia przerzutów w tych warunkach, komórki nowotworowe przechodzą przestawienie metabolizmu z tlenowego na beztlenowy. (Petrova et al. 2018) Niedotlenienie w mikrośrodowisku nowotworowym stymuluje również produkcję zewnątrzkomórkowej adenozyń, co jest związane ze wzrostem ekspresji i aktywności ekto-nukleotydz: ekto-difosfohydrolazy trifosfonukleozydowej 1 (eNTPD1, CD39) i ekto-5' nukleotydu (e5'NT, CD73). (Ohta 2016; Allard et al. 2017) Zewnątrzkomórkowa adenozyń, stymulując swoiste receptory na powierzchni komórek odpornościowych, hamuje odpowiedź prozapalną, prowadząc do wytworzenia permanentnego środowiska immunosupresyjnego. Biorąc pod uwagę przeciwzapalne działanie adenozyń, jej katabolizm wydaje się mieć hamujący wpływ na dalszy rozwój guza. Pomimo tego, w licznych typach nowotworów, w tym w raku piersi, jajnika, mózgu, krtani i jelita grubego obserwowany jest wzrost aktywności deaminazy adenozyń. (Lal et al. 1987; Eroğlu et al. 2000; Mishra et al. 2000; Aghaei et al. 2005; Rai et al. 2011; Urunsak et al. 2012; Pirinçci et al. 2012; Sharma et al. 2013) Istotnym do podkreślenia jest również fakt, że w przebiegu nowotworu dochodzi do zmian w aktywności obu izoenzymów ADA. U pacjentek z rakiem piersi odnotowano wzrost ADA1 i ADA2 w tkance guza, co

korelowało dodatnio z jego rozmiarem i stopniem zajęcia węzłów chłonnych. Z kolei w osoczu tych pacjentek, wykazano wzrost aktywności jedynie izoenzymu ADA2. Różnice w aktywności ADA zaobserwowano również pomiędzy guzami łagodnymi i złośliwymi. Wzrost aktywności izoenzymu ADA1 był silniejszy w guzie złośliwym, podczas gdy nie obserwowano różnic w aktywnościach osoczowych obu izoenzymów pomiędzy pacjentkami z łagodnymi i złośliwymi guzami piersi. (Trotta and Balis 1978; Balis 1985) Różnice w aktywności ADA w obrębie guzów wskazują na odmienne pochodzenie komórkowe obu izoform ADA w tkance guza, co zostało przeanalizowane w Pracy 1 (Praca 1, Ryciny 4, 7). Analizując aktywność całkowitej (wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej) oraz powierzchniowej ADA w mysich i ludzkich komórkach raka piersi, komórkach śródbłonka i komórkach zapalnych, wykazałam, że komórki śródbłonka oraz monocyty/makrofagi są głównym źródłem ADA u obu gatunków, podczas gdy komórki nowotworowe stanowią jedynie niewielkie jej źródło. Jako że, gryzonie nie posiadają ADA2, jej aktywność ograniczała się do komórek ludzkich, a najwyższy jej poziom obserwowany był wewnątrz monocytów i makrofagów. Powierzchniowa aktywność ADA2 nie została natomiast stwierdzona w żadnym z analizowanych typów komórek. Wyniki te sugerują, że za wzrost aktywności ADA1 w obrębie guza odpowiadają komórki zapalne, komórki śródbłonka oraz komórki nowotworowe. Podczas gdy wzrost ADA2, charakterystyczny dla osocza pacjentek z rakiem piersi jest najprawdopodobniej efektem uwalniania tego białka z krążących monocytów i nagromadzonych makrofagów obecnych w obrębie guza. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, dotyczącymi pochodzenia ADA2 z monocytów i makrofagów w osoczu. (Conlon and Law 2004a)

Wzrost aktywności ADA w tkance guza i w osoczu pacjentów onkologicznych może mieć charakter kompensacyjny przeciwko toksycznej akumulacji substratów dla ADA, powstałych w wyniku zwiększonego metabolizmu nukleotydów w mikrośrodowisku nowotworowym. Z jednej strony, wysoka aktywność wewnątrzkomórkowej ADA może działać na korzyść dalszego wzrostu komórek nowotworowych, poprzez udział w wytwarzaniu hipoksantyny, substratu dla szlaku odzysku nukleotydów przy udziale aktywności fosforybozylotransferazy hipoksantynowo-guaninowej (HGPRT) (Rycina 1). Z drugiej strony, poprzez wzrost aktywności eADA może dojść do uszczuplenia puli zewnątrzkomórkowej adenozyne, co pomimo potencjalnego wyciszenia jej działania przeciwzapalnego, może wywoływać również inne efekty receptorowe związane z progresją nowotworu. W pracy 1 wykazaliśmy, że zewnątrzkomórkowa adenozyne hamuje inwazję komórek mysiego raka piersi oraz zmniejsza ich adhezję do śródbłonka naczyniowego w sposób zależny od receptorów adenozynowych (Praca 1, Ryciny 5 G, J).

Powyższe wyniki sugerują, że rozkładająca adenozyne ADA, może poprzez regulację stężenia tego nukleozydu stymulować rozwój nowotworu. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że tłumienie aktywności ADA przez deoksykoformycynę (dCF) zmniejszało rozwój guza w mysim ortotopowym modelu raka piersi (Praca 1, Rycina 1), jak również hamowało w badaniach *in vitro* migrację i inwazję mysich oraz ludzkich komórek nowotworowych (Praca 1, Rycina 5A-F), jednocześnie uszczelniając barierę śródbłonkową, co miało bezpośredni wpływ na zmniejszenie transmigracji komórek raka piersi przez warstwę śródbłonka (Praca 1, Rycina 5K). Ponadto, w mysim dożylnym modelu raka piersi (Praca 1, Rycina 3), wykazałam że wzrost aktywności ADA na powierzchni naczyń, pochodzący najprawdopodobniej z aktywowanych komórek śródbłonka, wyprzedzał dysfunkcję śródbłonka spowodowaną podaniem komórek nowotworowych. Natomiast hamowanie ADA przez dCF normalizowało wykładniki dysfunkcji śródbłonka w tym modelu.

Wnioski z pracy 1

Komórki występujące w mikrośrodowisku nowotworowym stanowiły heterogenne źródło izoenzymów ADA. Głównym źródłem izoenzymu ADA1 były komórki odpornościowe, komórki śródbłonka oraz w mniejszym stopniu komórki nowotworowe, podczas gdy pochodzenie ADA2 ograniczo się tylko do monocytów i makrofagów.

Hamowanie aktywności ADA z zastosowaniem niskich dawek deoksykoformycyny wykazało wpływ na poprawę funkcji śródbłonka w modelach raka piersi *in vitro* i *in vivo* oraz zmniejszenie migracji i inwazji komórek nowotworowych oraz ich adhezji i transmigracji przez komórki śródbłonka, podkreślając zastosowanie inhibitorów ADA jako obiecującej strategii w leczeniu raka piersi.

Praca 2. Kutryb-Zajac B et al. *Vascular extracellular adenosine metabolism in mice correlated with susceptibility to atherosclerosis*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37(11):653-662.

Cel pracy 2

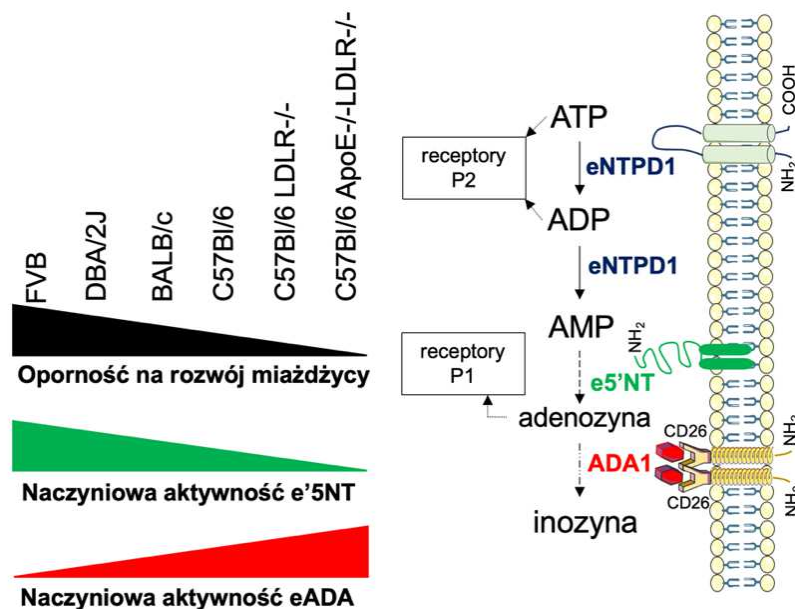
Wykazanie zmian naczyniowych aktywności enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów i adenozyne, w tym ADA, u szczepów myszy o różnej podatności na rozwój miażdżycy.

Sygnalizacja przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy i produkty ich katabolizmu, głównie adenozyne, pełni znaczącą rolę w utrzymywaniu homeostazy układu sercowo-naczyniowego. (Burnstock and Ralevic 2014) Nukleotydy (ATP, ADP, UTP), mogą być uwalniane z komórek układu sercowo-naczyniowego oraz komórek krwi na skutek działania patologicznych bodźców, m.in.: hipoksji, hiperglikemii czy aktywatorów zapalenia. Znajdujące się w przestrzeni pozakomórkowej nukleotydy aktywują wówczas receptory purynergiczne typu 2 (P2), wykazując przede wszystkim działanie pro-miażdżycowe, związane ze zwiększeniem proliferacji i migracji mięśniówki gładkiej naczyń, aktywacją komórek śródbłonna i płytek krwi oraz działaniem prozapalnym na komórki układu odpornościowego. (Kutryb Zajac and Smolenski 2017)

Pro-miażdżycowe efekty działania nukleotydów mogą być znoszone przez wpływ zewnątrzkomórkowej adenozyne, produkowanej w dużych ilościach przez ekto-nukleotyduzy, znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonna i mięśniówki gładkiej naczyń. Adenozyne, stymulując receptory P1 (receptory adenozynowe) tłumi adhezję komórek zapalnych do śródbłonna, proliferację mięśniówki gładkiej oraz tworzenie komórek piankowatych. (Bouma et al. 1996; Yang et al. 2006; Reiss and Cronstein 2012; Hassanian et al. 2014; Dubey et al. 2015) Stężenie pozakomórkowej adenozyne w układzie sercowo-naczyniowym podlega regulacji poprzez jej: 1) transport z udziałem odpowiednich przekaźników znajdujących się w błonie komórkowej oraz 2) metabolizm przez powierzchniowe enzymy zaangażowane w jej produkcję (ekto-nukleotyduzy: CD39 i CD73) i katabolizm (eADA). Wykazano, że w warunkach patologicznych związanych z miażdżycą, takich jak hipoksja i obniżenie stanu energetycznego komórek dochodzi do wzrostu uwalniania komórkowej adenozyne. (Eltzschig et al. 2004) Nasze badania pokazały jednak, że zewnątrzkomórkowy katabolizm tego nukleozydu na powierzchni naczyń jest podwyższony w przebiegu miażdżycy u człowieka oraz w mysim eksperymentalnym modelu tej choroby. (Kutryb-Zajac et al. 2014, 2016) Wzrost aktywności ADA w osoczu pacjentów ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym i miażdżycą tętnic również został opisany. (Chavan et al. 2007; Prasad Durga, Tripura Sundari Bala 2017) Prasad et al. wykazali, że pacjenci z otyłością charakteryzowali się dwukrotnie wyższym poziomem aktywności ADA w osoczu niż osoby zdrowe. (Prasad Durga, Tripura Sundari Bala 2017) W swoim badaniu zademonstrował również dodatnią korelację aktywności ADA z czynnikami ryzyka zespołu metabolicznego. Wzrost aktywności ADA w osoczu tych pacjentów był też silniej zarysowany u mężczyzn niż u kobiet, co odzwierciedla zwiększone ryzyko chorób sercowo-naczyniowych u płci męskiej. Warty podkreślenia jest również fakt, że wykazany przez nas wzrost aktywności eADA na powierzchni naczyń pozyskanych od mysiego modelu miażdżycy (myszy LDLR^{-/-} ApoE^{-/-}) był znacznie większy niż wzrosty tej aktywności w osoczu oraz wyprzedzał i korelował z rozwojem samych zmian miażdżycowych. (Kutryb-Zajac et al. 2016) Na podstawie tych wyników i dalszych badań z wykorzystaniem technik histologicznych i immunofluorescencyjnych, wykazaliśmy że u myszy LDLR^{-/-} ApoE^{-/-} głównym źródłem aktywności ADA w naczyniu na początkowym etapie rozwoju procesu patologicznego były aktywowane komórki śródbłonna, a w miarę wzrostu nacieków zapalnych w ścianie naczyń, ADA pochodziła również z komórek układu odpornościowego. (Kutryb-Zajac et al. 2016)

W pracy nr 2, będącej częścią niniejszego osiągnięcia naukowego przeanalizowałam zmiany w naczyniowych aktywnościach powierzchniowych enzymów produkujących i rozkładających zewnątrzkomórkową adenozyne u różnych szczepów myszy charakteryzujących się odmienną podatnością na rozwój miażdżycy. Myszy szczepów najbardziej opornych na rozwój tej patologii (tj. FVB, DBA/2J i BALB/c) charakteryzowały się najwyższym poziomem aktywności ekto-5' nukleotyduzy (CD73, e5'NT) produkującej adenozyne, przy stosunkowo niskiej aktywności eADA (Praca 2, Rycina 1B,

C). Spośród badanych szczepów tylko myszy C57Bl/6J uważane są za wrażliwe na hiperlipidemię indukowaną dietą i miażdżycę naczyń, spowodowaną modyfikacjami genetycznymi. (Getz and Reardon 2012) Istotnie, myszy C57Bl/6J wykazywały niższy poziom aktywności e5'NT i wyższy eADA niż myszy szczepów FVB, DBA/2J i BALB/c (Praca 2, Rycina 1B, C). Z kolei myszy C57Bl/6J z modyfikacjami genetycznymi w genie receptora dla LDL (LDLR^{-/-}) oraz w genach receptora dla LDL i apolipoproteiny E (LDLR^{-/-}ApoE^{-/-}) charakteryzowały się najwyższym poziomem aktywności naczyniowej eADA (Praca 2, Rycina 1C).



Rycina 3. Schemat zmian w zewnątrzkomórkowym metabolizmie nukleotydów adeninowych i adenozyiny na powierzchni aort myszy z różnym stopniem podatności na rozwój miażdżycy. ATP – adenozyino-5'-trifosforan, ADP – adenozyino-5'-difosforan, AMP – adenozyino-5'-monofosforan, eNTPD1 – ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa, e5'NT – ekto-5'-nukleotydaza, ADA1 – deaminaza adenozyiny 1, receptory P1 – receptory purynergiczne typu 1 (receptory adenozyinowe), receptory P2 – receptory purynergiczne typu 2 (receptory nukleotydydowe). (na podstawie Pracy 2, Ryciny 4).

Badania nad opornością myszy na rozwój miażdżycy utrzymują, że odpowiedzialne są za to zmiany w metabolizmie cholesterolu, związane z brakiem białka przenoszącego estry cholesterolu między lipoproteinami, co skutkuje zwiększaniem frakcji HDL u myszy. (Bennett et al. 2015) Analizując wyniki profilu lipidowego u badanych przez nas myszy, wykazaliśmy większe stężenie lipoprotein frakcji HDL niż LDL u myszy najbardziej opornych na rozwój miażdżycy (Praca 2, Rycina 2). Z kolei myszy z modyfikacjami genetycznymi charakteryzowały się znaczącym udziałem frakcji LDL i zwiększonym stężeniem triacylogliceroli, co było bezpośrednią przyczyną rozwoju rozległej blaszki miażdżycowej u myszy LDLR^{-/-}ApoE^{-/-}. Obserwowana u tych myszy hiperlipidemia, może oddziaływać na zmiany w metabolizmie komórek śródbłonna i prowadzić do niekorzystnego układu aktywności ekto-enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu adenozyiny, co w efekcie może powodować zaostrenie progresji miażdżycy.

Wnioski z pracy 2:

Myszy szczepów najbardziej podatnych na rozwój miażdżycy (C57Bl/6J, C57Bl/6J ApoE^{-/-}, C57Bl/6J LDLR^{-/-} oraz C57Bl/6J LDLR^{-/-}ApoE^{-/-}) wykazywały niekorzystny układ naczyniowych aktywności ekto-enzymów metabolizujących adenozyinę, który charakteryzował się jej zmniejszoną produkcją i zwiększoną degradacją (Rycina 3). Prowadzić to może do wyciszenia protekcyjnych mechanizmów receptorowych zależnych od pozakomórkowej adenozyiny.

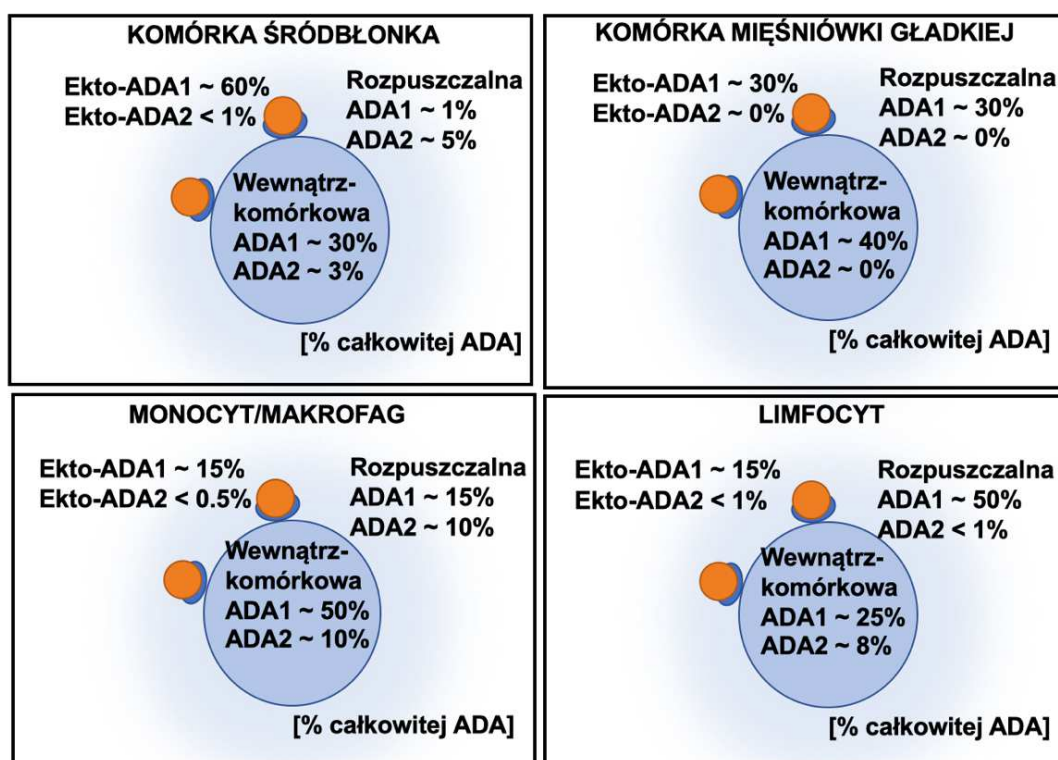
Praca 3. Kutryb-Zajac B et al. *Inhibition of LPS-stimulated ecto-adenosine deaminase attenuates endothelial cell activation.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2019; 128: 62-76.

Cel pracy 3

Identyfikacja źródeł oraz mechanizmu wzrostu aktywności ADA w ludzkich naczyniach objętych procesem miażdżycowym oraz potencjał terapeutycznego zastosowania jej inhibitorów w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego.

W pracy nr 3 podjęto próbę korelacji naczyniowej aktywności eADA z poziomem ekspresji genu dla ADA1 oraz z wykładnikami aktywacji komórek śródbłonna, parametrami profilu lipidowego i markerami zapalenia u pacjentów z miażdżycą tętnic. Wyniki tych analiz wykazały, że aktywność eADA korelowała dodatnio z ekspresją molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) w badanych naczyniach, osoczym stężeniem rozpuszczalnej formy VCAM-1 (sVCAM-1), stężeniem IL-6 oraz cholesterolu całkowitego i triacylogliceroli (Praca 3, Rycina 1). Ponadto, analiza histologiczna i immunofluorescencyjna badanych naczyń ludzkich, w różnym stopniu zajętych procesem miażdżycowym, wykazała ko-lokalizację ADA1 z markerami aktywowanych komórek śródbłonna i komórek zapalnych (Praca 3, Ryciny 1G, H; 2A, I). Nie zaobserwowano natomiast ko-lokalizacji pomiędzy ADA1 a markerem komórek mięśniówki gładkiej, będących w fazie proliferacji i tworzenia neointymy. Tym samym potwierdzono wcześniejsze spostrzeżenia uzyskane w badaniach nad mysim eksperymentalnym modelem miażdżycy, że aktywność eADA w miażdżycy u człowieka również pochodzi z aktywowanych komórek śródbłonna na wczesnym etapie jej rozwoju, natomiast na późniejszych etapach z komórek układu odpornościowego infiltrujących ścianę naczynia.

Następnie, przeanalizowano udział poszczególnych izoenzymów ADA w jej całkowitej aktywności w ludzkich komórkach śródbłonna, mięśniówki gładkiej naczyń, limfocytach i monocytach/makrofagach. Uzyskane na tym etapie wyniki również wykazały, że komórki zapalne i komórki śródbłonna charakteryzują się najwyższą aktywnością ADA, z dominującą komponentą ADA1 (Praca 3, Rycina 3). Aktywność ADA2 obserwowana była w niewielkim stopniu jedynie w badanych komórkach układu odpornościowego (Praca 3, Rycina 3). Następnie dokonałam analizy kompartmentacji aktywności ADA1 i ADA2 w powyższych typach komórek po ich stymulacji z wykorzystaniem lipopolisacharydu *E. Coli* (LPS). W badaniu tym wykazałam, że większość aktywności ADA (będącej głównie wynikiem obecności izoenzymu ADA1) w komórkach śródbłonna zlokalizowana jest na ich powierzchni jako ekto-enzym i aktywność tej właśnie frakcji wzrasta po stymulacji przez LPS. Komórki mięśniówki gładkiej nie odpowiadały na stymulację przez LPS zmianą aktywności ADA, a dominujący w tych komórkach izoenzym ADA1 był równomiernie rozłożony wewnątrz komórki, na jej powierzchni oraz w formie rozpuszczalnej. W monocytach i makrofagach ADA1 zlokalizowana była głównie wewnątrz komórki i wraz ze swoją rozpuszczalną frakcją podlegała wzrostowi po stymulacji przez LPS. Spośród wszystkich analizowanych komórek, w monocytach/makrofagach obserwowana była najwyższa aktywność ADA2 i w równym stopniu zlokalizowana była ona wewnątrz komórki, jak i w formie rozpuszczalnej. Limfocyty były natomiast dominującym źródłem aktywności rozpuszczalnej ADA (złożonej z izoenzymu ADA1), ale wszystkie frakcje ADA1 w limfocytach: wewnątrzkomórkowa, powierzchniowa i rozpuszczalna podlegały wzrostowi po stymulacji przez LPS. Omówione powyżej aspekty dotyczące kompartmentacji izoenzymów ADA w komórkach stymulowanych przez LPS zostały schematycznie przedstawione na Rycinie 4.



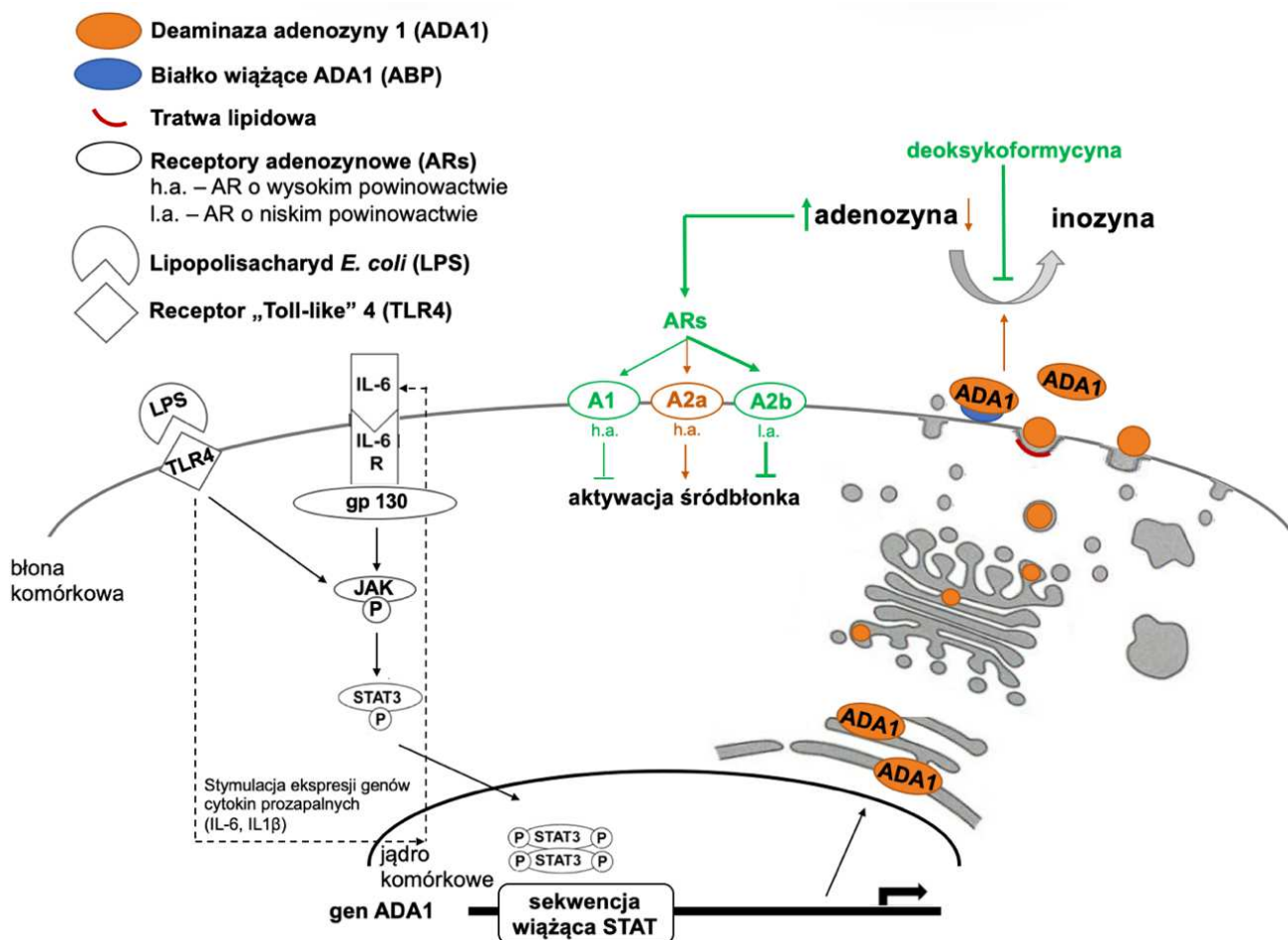
Rycina 4. Komórkowa kompartmentacja aktywności izoenzymów ADA w ludzkich komórkach śródbłonka, mięśniówki gładkiej naczyń, monocytach/makrofach i limfocytach stymulowanych przez LPS. ADA – deaminaza adenozyne. (Na podstawie Pracy 3, Ryciny 7).

Na kolejnym etapie badań, przeprowadzona została analiza mechanizmów wzrostu aktywności ADA1 w aktywowanych komórkach śródbłonka. W związku z tym, że wszystkie typy komórek odpowiedzialne za wzrost aktywności ADA w naczyniu objętym procesem miażdżycowym (komórki śródbłonka, limfocyty, monocyty/makrofagi) odpowiadały wzrostem ekspresji i aktywności ADA1 na stymulację przez LPS, czynnik ten został wykorzystany w kolejnych eksperymentach *in vivo* oraz *in vitro*. Traktowanie lipopolisacharydem szczurów rasy Wistar jest powszechnie uznanym modelem zapalenia i aktywacji śródbłonka. Jak wynika z naszych badań na tym modelu, stymulacja przez LPS wywoływała zmiany w naczyniowym metabolizmie adenozyne, powodując znaczący wzrost aktywności eADA na wewnętrznej powierzchni aort u tych szczurów (Praca 3, Rycina 2). Ponadto, aktywność ta korelowała dodatnio ze stężeniem IL-6 w surowicy oraz wykazywała tendencję do pozytywnej korelacji ze stężeniem cholesterolu całkowitego w surowicy, który również był podwyższony u szczurów traktowanych LPS (Praca 3, Tabela 2).

W naszych badaniach naczyniowa aktywność eADA i ekspresja ADA1, nie tylko korelowały ze stężeniem IL-6 w osoczu/surowicy u pacjentów z miażdżycą i w szczurzym modelu aktywacji śródbłonka, ale również sama IL-6 wykazywała bezpośredni efekt na wzrost aktywności eADA na powierzchni komórek śródbłonka w badaniach *in vitro*. (Kutryb-Zajac et al. 2016) W celu zbadania mechanizmów tego wzrostu, w pierwszej kolejności przeanalizowane zostały efekty braku IL-6 u myszy na zewnątrzkomórkowy metabolizm adenozyne w naczyniach. Myszy C57Bl/6J z nokautem genu kodującego IL-6 (IL-6^{-/-}) wykazywały na powierzchni swoich naczyń niższy poziom aktywności eADA niż myszy C57Bl/6J typu dzikiego (Praca 3, Rycina 4). Osoczowa aktywność ADA u zwierząt IL6^{-/-} również była niższa, co odzwierciedlone było wyższym stężeniem adenozyne w krwi pełnej, będącej głównie adenozyną pozakomórkową (Praca 3, Rycina 4).

Następnie, prześledzony został udział szlaków sygnalizacyjnych stymulowanych przez IL-6 na aktywność ADA w komórkach mysiego śródbłonka. Zastosowanie inhibitorów ścieżek zależnych od kinaz JAK i białek STAT na komórkach śródbłonka aktywowanych przez LPS, wykazało zniesienie wzrostu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej aktywności ADA, stymulowanej przez LPS (Praca 3, Rycina 5A, B). Oznacza to, że układ przekaźnikowy JAK/STAT jest zaangażowany we wzrost ADA w aktywowanych komórkach śródbłonka.

Na kolejnym etapie, podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów eksternalizacji ADA na powierzchnię komórek śródblonka. W tym celu przeanalizowany został udział szlaków transcytozy przez błonę komórkową. Badania te wykazały, że inhibitory szlaków sekrecyjnych hamują wzrost aktywności eADA na powierzchni komórek śródblonka stymulowanych LPS (Praca 3, Rycina 5C). Podczas gdy, zastosowanie aktywatorów egzocytozy powodowało zatrzymanie aktywności tego białka na powierzchni komórki (Praca 3, Rycina 5C, D). Co ciekawe, najsilniejszy efekt zapobiegania wzrostowi eADA w komórkach śródblonka aktywowanych LPS, uzyskano stosując metylo- β -cyklodekstrynę, inhibitor egzocytozy zależnej od tratw lipidowych (Praca 3, Rycina 5E). Tratwy lipidowe są to mikrodomeny obecne w błonie komórkowej, bogate w sterole (np. cholesterol), glikosfingolipidy i glicerofosfolipidy, które regulują procesy związane z transportem białek przez błonę komórkową. (Salaün et al. 2004) Wykazano, że cholesterol obecny w tratwach lipidowych pełni funkcję stabilizującą, a jego zwiększone stężenie w surowicy może sprzyjać zależnej od tratw lipidowych sekrecji białek na powierzchnię błony komórkowej. (Catalgol and Kartal Ozer 2010) Oznacza to, że hipercholesterolemia obserwowana w modelach eksperymentalnych *in vivo* (myszy z nokautem LDLR^{-/-} i podwójnym nokautem LDLR^{-/-} ApoE^{-/-} oraz szczury traktowane LPS) może być czynnikiem stymulującym eksternalizację eADA na powierzchnię komórek śródblonka. Na podstawie tych wyników, możemy wnioskować, że współistnienie stanu zapalnego z hiperlipidemią może bezpośrednio stymulować ekspresję genu ADA1 i aktywności wewnątrzkomórkowej ADA w komórkach śródblonka poprzez szlaki sygnałowe aktywowane przez cytokiny prozapalne (w tym układ przekaźnikowy JAK/STAT) oraz zwiększać eksternalizację białka ADA na powierzchnię komórki przez aktywację zależnej od cholesterolu egzocytozy (Rycina 5).



Rycina 5. Mechanizmy wzrostu ekspresji ADA1 i aktywności eADA w komórkach śródblonka stymulowanych LPS oraz efekty hamowania eADA jako potencjalnej terapii przeciwko aktywacji śródblonka. gp 130 – glikoproteina 130, JAK – kinazy janusowe, STAT3 – białko STAT3. (Na podstawie Pracy 3, Ryciny 7).

W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy terapeutyczny potencjał hamowania ADA w leczeniu miażdżycy. (Kutryb-Zajac et al. 2016) Zastosowanie dCF u myszy LDLR-/-ApoE-/- wykazało redukcję przyrostu blaszki miażdżycowej mierzonej w aorcie *en face*, korzeniu aorty oraz w pniu ramienno-głowym. Ponadto, zaobserwowaliśmy stabilizację blaszki miażdżycowej powstałej przed wdrożeniem terapii dCF. Zastosowana w badaniu niska dawka dCF powodowała utrzymanie naczyniowej aktywności eADA na poziomie 20-30% i nie wykazywała efektów immunosupresyjnych. Pomimo tego, wywołała ona szereg innych zmian ogólnoustrojowych i naczyniowych, takich jak zwiększenie stężenia adenozyiny we krwi, redukcję parametrów stanu zapalnego i wykładników aktywacji śródbłonka czy obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego i triacylogliceroli w osoczu. Na tym etapie, niemożliwe było jednak stwierdzenie czy poprawa funkcji śródbłonka w mysim modelu eksperymentalnej miażdżycy traktowanym dCF była bezpośrednim efektem hamowania ADA na komórkach śródbłonka, czy efektem wtórnym wywołanym innymi zmianami (m.in. w profilu lipidowym i statusie stanu zapalnego).

Dlatego w pracy 3 będącej częścią niniejszego osiągnięcia naukowego skupiłam się na zgłębieniu mechanizmów leżących u podstaw działania dCF na śródbłonek naczyniowy. Hamowanie aktywności ADA w komórkach mysiego śródbłonka stymulowanego LPS powodowało zmniejszenie produkcji i uwalniania IL-6 przez te komórki (Praca 3, Rycina 6D). Jak również, prowadziło do zmniejszenia stężenia rozpuszczalnych molekuł adhezyjnych mierzonych w medium komórkowym (Praca 3, Rycina 6E, F). Stymulacja komórek śródbłonka z wykorzystaniem LPS prowadziła do spadku stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyiny w medium komórkowym, co było efektem zwiększenia aktywności eADA na powierzchni tych komórek (Praca 3, Rycina 6G). Zahamowanie katabolizmu adenozyiny przez dCF prowadziło natomiast do odbudowania puli zewnątrzkomórkowej adenozyiny do poziomów obserwowanych w komórkach niestymulowanych (Praca 3, Rycina 6G). Kolejne badania z wykorzystaniem agonistów i antagonistów receptorów adenozyinowych na komórkach mysiego śródbłonka i siRNA wyciszającego geny kodujące poszczególne podtypy tych receptorów w ludzkich komórkach śródbłonka wykazały, że stymulacja receptorów adenozyinowych podtypów A1 i A2b hamuje aktywację śródbłonka indukowaną przez LPS (Praca 3, Rycina 6H, K). Znaczenie stymulacji receptorów adenozyinowych A2b w uzależnionej od adenozyiny protekcji śródbłonka w odpowiedzi na dCF okazało się być tym większe, ponieważ ten podtyp receptorów adenozyinowych wykazywał najsilniejszą ekspresję w naczyniach ludzkich (Praca 3, Rycina 6I, J). Aspekty związane z mechanizmem protekcyjnego działania dCF na komórki śródbłonka zostały schematycznie przedstawione na Rycinie 5.

Wnioski z pracy 3

Współistnienie przewlekłego stanu zapalnego oraz hiperlipidemii u pacjentów z miażdżycą tętnic może istotnie przyczyniać się do wzrostu aktywności naczyniowej ekto-deaminazy adenozyiny, pochodzącej głównie z komórek śródbłonka. W pracy wykazano, że aktywacja szlaku przekąźnikowego JAK/STAT znacząco wpływa na wzrost produkcji białka ADA, podczas gdy mechanizmy zależnej od cholesterolu egzocytozy stymulują jego transport na powierzchnię komórki. Ponadto, protekcyjne działanie inhibitora aktywności ADA, uzależnione od zwiększonego stężenia pozakomórkowej adenozyiny i aktywacji receptorów adenozyinowych wykazywało znaczący potencjał terapeutyczny przeciwdziałając zapaleniu i aktywacji śródbłonka naczyniowego.

Praca 4. Kutryb-Zajac B et al.. *The effects of pro- and anti-atherosclerotic factors on intracellular nucleotide concentration in murine endothelial cells.* Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37(11):645-652.

Cel pracy 4

Analiza wpływu związków modulujących aktywność ADA na status energetyczny komórek śródbłonka.

Pozytywne efekty hamowania ADA w leczeniu patologii związanych z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego otwierają nowe możliwości terapeutycznego zastosowania inhibitorów tego enzymu. Oprócz dCF będącej pochodną substratu dla ADA, 2'deoksyadenozyny, odkryto szereg innych inhibitorów tego enzymu i związków modulujących jego aktywność, do których należą również leki i naturalnie występujące flawonoidy. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że statyny (w tym atorwastatyna) oraz kemferol, występujący w cebuli i czosnku hamują aktywność eADA na powierzchni komórek mysiego śródbłonka. (Kutryb-Zajac et al. 2016) W pracy 1 i 4 niniejszego osiągnięcia naukowego zbadane zostały natomiast efekty dCF, kemferolu i atorwastatyny na metabolizm energetyczny komórek śródbłonka. Wykazano, że dCF i atorwastatyna nie zaburzały statusu energetycznego tych komórek (Praca 1, Rycina S2; (Praca 4, Ryciny 1-3). Podczas gdy wysokie stężenia kemferolu obniżały poziom wewnątrzkomórkowego ATP o ok. 30% (Praca 4, Rycina 1E). Ponadto, atorwastatyna powodowała wzrost wewnątrzkomórkowej puli dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺) (Praca 4, Rycina 3F), będącego z uwagi na jego działanie w reakcjach utleniania-redukcji, deacetylacji białek czy ADP-rybozylacji związkiem cytoprotekcyjnym. Wydaje się zatem, że przynajmniej część plejotropowych efektów działania statyn może wynikać z modulacji metabolizmu nukleotydów i adenozyne.

W pracy 4 przeanalizowany również został wpływ czynników stymulujących aktywację śródbłonka (IL-6, LPS, kwasów tłuszczowych, kwasu moczowego i hiperglikemii) na metabolizm energetyczny komórek. W naszych wcześniejszych badaniach wszystkie wyżej wymienione czynniki powodowały wzrost aktywności śródbłonkowej eADA. (Kutryb-Zajac et al. 2016) Jednak w analizie statusu energetycznego komórek śródbłonka, tylko kwas palmitynowy (w stężeniach ≥ 1 mM) i kwas oleinowy (>0.1 mM) powodowały spadek stężenia wewnątrzkomórkowego ATP (Praca 4, Rycina 1D).

Wnioski z pracy 4

W pracy wykazano, że związki obniżające aktywność eADA na powierzchni śródbłonka, takie jak deoksykoformycyna czy atorwastatyna nie zaburzą metabolizmu energetycznego komórek co świadczy o ich braku cytotoksyczności i podkreśla potencjał powodzenia terapeutycznego w patologiach śródbłonka naczyniowego.

Wnioski końcowe z prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Z przedstawionych powyżej badań wynika, że wzrost aktywności naczyniowej ekto-deaminazy adenozyne (eADA) może być dobrym wykładnikiem patologicznego procesu związanego z aktywacją, zapaleniem i dysfunkcją śródbłonka naczyniowego. W modelach eksperymentalnych miażdżycy oraz raka piersi, aktywność eADA pochodząca z komórek śródbłonka wyprzedzała inne zmiany świadczące o jego dysfunkcji, co podkreśla potencjał eADA jako wczesnego markera funkcji śródbłonka.

Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wzrost aktywności eADA w komórkach śródbłonka była aktywacja szlaku przekąźnikowego JAK/STAT, a transport tego białka na powierzchnię komórki uzależniony był od mechanizmów zależnej od cholesterolu egzocytozy. Oznacza to, że współistnienie przewlekłego stanu zapalnego i hiperlipidemii u pacjentów z miażdżycą tętnic może przyczyniać się do wzrostu aktywności śródbłonkowej eADA.

Hamowanie aktywności eADA z zastosowaniem niskich dawek deoksykoformycyny w eksperymentalnych modelach raka piersi, zapalenia naczyń oraz miażdżycy znacząco poprawiało funkcję śródbłonka i uzależnione było od zwiększonego stężenia pozakomórkowej adenozyne i aktywacji receptorów adenozynowych. Podkreśla to zastosowanie inhibitorów eADA jako obiecującej strategii w leczeniu chorób nowotworowych i sercowo-naczyniowych.

Bibliografia

- Aghaei M, Karami-Tehrani F, Salami S, Atri M (2005) Adenosine deaminase activity in the serum and malignant tumors of breast cancer: The assessment of isoenzyme ADA1 and ADA2 activities. *Clin Biochem* 38:887–891. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2005.05.015
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276:121–144. doi: 10.1111/imr.12528
- Andreasyan NA, Hairapetyan HL, Sargisova YG, Mardanyan SS (2005) ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. *FEBS Lett* 579:643–647. doi: 10.1016/j.febslet.2004.11.109
- Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G (2013) Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* 13:842–857. doi: 10.1038/nrc3613
- Balis ME (1985) Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann N Y Acad Sci* 451:142–9
- Bennett BJ, Davis RC, Civelek M, et al (2015) Genetic Architecture of Atherosclerosis in Mice: A Systems Genetics Analysis of Common Inbred Strains. *PLOS Genet* 11:e1005711. doi: 10.1371/journal.pgen.1005711
- Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA (1996) Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol* 270:C522-9
- Burnstock G, Ralevic V (2014) Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 66:102–192. doi: 10.1124/pr.113.008029
- Catalgol B, Kartal Ozer N (2010) Lipid rafts and redox regulation of cellular signaling in cholesterol induced atherosclerosis. *Curr Cardiol Rev* 6:309–24. doi: 10.2174/157340310793566181
- Chavan V, Patil N, Karnik ND (2007) Study of leukocytic hydrolytic enzymes in patients with acute stage of coronary heart disease. *Indian J Med Sci* 61:73–82
- Chisci E, De Giorgi M, Zanfrini E, et al (2017) Simultaneous overexpression of human E5NT and ENTPD1 protects porcine endothelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress and cytotoxicity in vitro. *Free Radic Biol Med* 108:. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.038
- Conlon BA, Law WR (2004a) Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol* 138:14–20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02591.x
- Conlon BA, Law WR (2004b) Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin Exp Immunol* 138:14–20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02591.x
- Cortés A, Gracia E, Moreno E, et al (2015) Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Med Res Rev* 35:85–125
- Dong RP, Tachibana K, Hegen M, et al (1997) Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J Immunol* 159:6070–6
- Dubey RK, Fingerle J, Gillespie DG, et al (2015) Adenosine Attenuates Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation by Inhibiting Multiple Signaling Pathways That Converge on Cyclin D. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 66:1207–19. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05912
- Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, et al (2006) Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 108:1602–1610. doi: 10.1182/blood-2006-02-001016
- Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J, et al (2004) Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. *Blood* 104:3986–3992. doi: 10.1182/blood-2004-06-2066
- Eroğlu A, Canbolat O, Demirci S, et al (2000) Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. *Med Oncol* 17:319–324. doi: 10.1007/BF02782198
- Flinn AM, Gennery AR (2018) Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet J Rare Dis* 13:65. doi: 10.1186/s13023-018-0807-5
- Gakis C (1996) Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 9:632–3
- Getz GS, Reardon CA (2012) Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1104–15. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237693
- Hassanian SM, Dinarvand P, Rezaie AR (2014) Adenosine Regulates the Proinflammatory Signaling Function of Thrombin in Endothelial Cells. *J Cell Physiol* 229:1292–1300. doi: 10.1002/jcp.24568
- Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Hebanowska A, et al (2020a) Statin treatment of patients with calcific aortic valve disease modulates extracellular adenosine metabolism on the cell surface of the aortic valve. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 1–11. doi: 10.1080/15257770.2020.1733603
- Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Serocki M, et al (2020b) Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; its relation to pathological changes and clinical presentation. *Clin Res Cardiol*. doi: 10.1007/s00392-019-01495-x

- Kutryb-Zajac B, Mateuszuk L, Zukowska P, et al (2016) Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovasc Res* 112:590–605. doi: doi:10.1093/cvr/cvw203
- Kutryb-Zajac B, Zukowska P, Toczek M, et al (2014) Extracellular Nucleotide Catabolism in Aortoiliac Bifurcation of Atherosclerotic ApoE/LDLr Double Knock Out Mice. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33:323–328. doi: 10.1080/15257770.2014.880478
- Kutryb-Zajac B, Smolenski RT (2017) Rola nukleotydów i sygnalizacji purynergiczej w stenozie aortalnej i miażdżycy tętnic. *Postępy Biol Komórki* 44:73–109
- Lal H, Munjal SK, Wig U, Saini AS (1987) Serum enzymes in head and neck cancer III. *J Laryngol Otol* 101:1062–1065. doi: 10.1017/S0022215100103226
- Linden J, Cekic C (2012) Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arter Thromb Vasc Biol* 32:2097–2103. doi: 10.1161/atvbaha.111.226837
- Lupia M, Angiolini F, Bertalot G, et al (2018) CD73 Regulates Stemness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer-Initiating Cells. *Stem Cell Reports* 10:. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.02.009
- Mishra R, Agarwal MK, Chansuria JP (2000) Serum adenosine deaminase levels as an index of tumor growth in head and neck malignancy. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 52:360–3. doi: 10.1007/BF02991478
- Moreno E, Canet J, Gracia E, et al (2018) Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine A2A Receptor and CD26 Proteins. *Front Pharmacol* 9:106. doi: 10.3389/fphar.2018.00106
- Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, et al (2004) Immunohistochemical Demonstration of Adenosine Deaminase (ADA 1) in Human Tissues
- Ohta A (2016) A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 7:109. doi: 10.3389/fimmu.2016.00109
- Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I (2018) The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* 7:10. doi: 10.1038/s41389-017-0011-9
- Pirinççi N, Geçit I, Güneş M, et al (2012) Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. *Clinics (Sao Paulo)* 67:1443–6
- Prasad Durga, Tripura Sundari Bala PVB (2017) Study of adenosine deaminase (ADA) levels in truncal obesity with and without the cardiometabolic risk. *Indian J Res* 6:74–76
- Rai B, Kaur J, Jacobs R, Anand SC (2011) Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Oral Investig* 15:347–349. doi: 10.1007/s00784-010-0404-z
- Reiss AB, Cronstein BN (2012) Regulation of foam cells by adenosine. *Arter Thromb Vasc Biol* 32:879–886. doi: 10.1161/atvbaha.111.226878
- Romano G, Reggi S, Kutryb-Zajac B, et al (2018) APOA-1Milano muteins, orally delivered via genetically modified rice, show anti-atherogenic and anti-inflammatory properties in vitro and in ApoE^{-/-} atherosclerotic mice. *Int J Cardiol* 271:. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.04.029
- Salaün C, James DJ, Chamberlain LH (2004) Lipid Rafts and the Regulation of Exocytosis. *Traffic* 5:255–264. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.0162.x
- Sharma S, Desai PB, Metgudmath RB (2013) Evaluation of Serum Adenosine Deaminase and Retinol in patients with Laryngeal Cancer
- Trotta PP, Balis ME (1978) Characterization of adenosine deaminase from normal colon and colon tumors. Evidence for tumor-specific variants. *Biochemistry* 17:270–278. doi: 10.1021/bi00595a013
- Urunsak IF, Gulec UK, Paydas S, et al (2012) Adenosine deaminase activity in patients with ovarian neoplasms. *Arch Gynecol Obstet* 286:155–159. doi: 10.1007/s00404-012-2279-5
- Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, et al (2006) The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* 116:1913–23. doi: 10.1172/JCI27933
- Zavialov A V, Engström A (2005) Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* 391:51–7. doi: 10.1042/BJ20050683

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

Analiza bibliometryczna

Sumaryczna wartość *Impact Factor* **70.144**

Sumaryczna wartość punktów MNiSW **965.000**

Sumaryczna wartość *Impact Factor* po uzyskaniu stopnia doktora **45.048**

Sumaryczna wartość punktów MNiSW po uzyskaniu stopnia doktora **705.000**

Liczba cytowań według *Web of Science* **135** bez autocytowań **103**

Indeks *h* według *Web of Science* **7**

Liczba cytowań według *Scopus* **140** bez autocytowań **107**

Indeks *h* według bazy *Scopus* **7**

Po odjęciu 4 prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego punktacja uzyskana po doktoracie wynosi:

Impact Factor = **33.923**

MNiSzW = **500.000**

Wykaz innych opublikowanych prac oraz wskaźniki osiągnięć naukowych

11. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Toczek M, Zabielska M, Lipinski M, Rybakowska I, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT. *Extracellular nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic ApoE/LDLr double knock out mice*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2014; 33: 4/6: 323-328.
IF=1.018, MNiSW=15.000
12. Rybakowska I., Waldman W., **Kutryb-Zajac B.**, Sein Anand J. *Niedobór witaminy D czynnikiem patogenetycznym w chorobach układu krążenia?* Ann. Acad. Med. Gedan. 2014 : t. 44, s. 113-116.
IF=---, MNiSW=---
13. Toczek M, **Kutryb-Zajac B**, Kapczynska M, Lipinski M, Slominska EM, Smolenski RT. *Extracellular adenine nucleotide catabolism in heart valves*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2014; 33: 4/6: 329-332.
IF=1.018, MNiSW=15.000
14. Zukowska P, **Kutryb-Zajac B**, Toczek M, Smolenski RT, Slominska EM. *The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies*. Pharmacol Rep 2015; 67: 4: 675-681.
IF=2.251, MNiSW=25.000
15. Federowicz A, Mateuszuk L, Kopec G, Skorka T, **Kutryb-Zajac B**, Zakrzewska A, Walczak M, Jakubowski A, Lomnicka M, Slominska EM, Chlopicki S. *Activation of the nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)-1-methylnicotinamide (MNA) pathway in pulmonary hypertension*. Respiratory Research 2016; 17: 108: 726-731.
IF=3.841, MNiSW=35.000
16. Kochan Z, Karbowska J, Gogga P, **Kutryb-Zajac B**, Slominska EM, Smolenski RT. *Polymorphism in exon 6 of the human NT5E gene is associated with aortic valve calcification*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2016; 35: 10/12: 726-731.
IF=0.868, MNiSW=15.000
17. Zabielska Magdalena, **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Slominska EM, Smolenski RT. *Effects of 4-Pyridone-3-carboxamide-1 β -D-ribo nucleoside on adenine nucleotide catabolism in the aortic wall; Implications for atherosclerosis in ApoE-/-LDLR-/- mice*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2016; 35: 10/12: 720-725.
IF=0.868, MNiSW=15.000
18. Toczek M, **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Slominska EM, Isalan M, Mielcarek M, Smolenski RT. *Changes in cardiac nucleotide metabolism in Huntington's disease*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2016; 35: 10/12: 707-712.
IF=0.868, MNiSW=15.000
19. **Kutryb-Zajac B**, Yuen AHY, Khalpey Z, Zukowska P, Slominska EM, Taylor PM, Goldstein S, Heacox AE, Lavitrano M, Chester AH, Yacoub MH, Smolenski RT. *Nucleotide catabolism on the surface of aortic valve xenografts; Effect of different decellularization strategies*. J Cardiovascular Translational Research 2016; 9: 2: 119-126.
IF=2.319, MNiSW=30.000
110. **Kutryb-Zajac B**, Mateuszuk L, Zukowska P, Jaształ A, Zabielska MA, Toczek M, Jablonska P, Zakrzewska A, Sitek B, Rogowski J, Lango R, Slominska EM, Chlopicki S, Smolenski RT. *Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition*. Cardiovascular Research 2016; 112:2: 590-605.
IF=5.878, MNiSW=40.000
111. **Kutryb-Zajac B**, Smolenski RT. *Rola nukleotydów i sygnalizacji purynergicznej w stenozie aortalnej i miażdżycy*. Postępy Biologii Komórki 2017; 443: 73-110.
IF=0.147, MNiSW=15.000

- I12.** Zukowska P, **Kutryb-Zajac B**, Jaształ A, Toczek M, Zabielska MA, Borkowski T, Khalpey Z, Smolenski RT, Slominska EM. *Deletion of CD73 in mice leads to aortic valve dysfunction*. BBA- Molecular Basis of Diseases 2017; 1863: 6: 1464-1472.
IF=5.108, MNiSW=40.000
- I13.** Chisci E, De Giorgi M, Zanfrini E, Testasecca A, Brambilla E, Cinti A, Farina L, **Kutryb-Zajac B**, Bugarin C, Villa C, Grassilli E, Combi R, Galpa G, Cerrito G, Rivolta I, Smolenski RT, Lavitrano M, Giovannoni R. *Simultaneous overexpression of human E5NT and ENTPD1 protects porcine endothelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress and cytotoxicity in vitro*. Free Radical and Biology Medicine 2017; 108: 320-333.
IF=6.020, MNiSW=40.000
- I14.** Mierzejewska P, Gawlik-Jakubczak T, Jablonska P, Czajkowski M, **Kutryb-Zajac B**, Smolenski RT, Matuszewski M, Slominska EM. *Nicotinamide metabolism alteration in bladder cancer. Preliminary studies*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37:12, 687-695.
IF=1.167, MNiSW=15.000
- I15.** Toczek M, Pierzynowska K, **Kutryb-Zajac B**, Gaffke L, Slominska EM, Wegrzyn G, Smolenski RT. *Characterization of adenine nucleotide metabolism in the cellular model of Huntington's disease*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37:11, 630-638.
IF=1.167, MNiSW=15.000
- I16.** Rybakowska IM, **Kutryb-Zajac B**, Milczarek R, Lukasz B, Slominska EM, Smolenski RT. *Activities of purine converting enzymes in heart, liver and kidney mice LDLR^{-/-} and ApoE^{-/-}*. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2018; 37:6, 304-347.
IF=1.167, MNiSW=15.000
- I17.** Kaniewska-Bednarczyk E, **Kutryb-Zajac B**, Sarathchandra P, Pelikant-Malecka I, Sielicka A, Piotrowska I, Slominska EM, Chester AH, Yacoub MH, Smolenski RT. *CD39 and CD73 in the aortic valve – biochemical and immunohistochemical analysis in valve cell populations and its changes in valve mineralization*. Cardiovascular Pathology 2018; 36:56-63.
IF=1.765, MNiSW=25.000
- I18.** Romano G, Reggi S, **Kutryb-Zajac B**, Facchetti A, Chisci E, Pettinato M, Giuffrè MR, Vecchio F, Leoni S, De Giorgi M, Avezza F, Cadamuro M, Crippa L, Leone BE, Lavitrano M, Rivolta I, Donatella B. *ApoA-1 Milano mureins, orally delivered via genetically modified rice, show anti-atherogenic and anti-inflammatory properties in vitro and in ApoE^{-/-} atherosclerotic mice*. International Journal of Cardiology 2018; 271:233-239.
IF=3.471, MNiSW=40.000
- I19.** Lupia M, Angiolini F, Bertalot G, Freddi S, Sachsenmeier KF, Chisci E, **Kutryb-Zajac B**, Confalonieri S, Smolenski RT, Giovannoni R, Colombo N, Bianchi F, Cavallaro U. *CD73 regulates stemness and epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer-initiating cells*, Stem Cell Reports 2018; 10: 1-14.
IF=5.499, MNiSW=40.000
- I20.** Jablonska P, Mierzejewska P, **Kutryb-Zajac B**, Rzyman W, Dziadziuszko R, Polanska J, Sitkiewicz M, Smolenski RT, Slominska EM. *Increased concentration of 4-pyridone-3-carboxamide-1-β-ribonucleoside (4PYR) in lung cancer preliminary studies*, Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids 2019; 38(10): 781-787.
IF=1.556, MNiSW=40.000
- I21.** Mierzejewska P, Zabielska MA, **Kutryb-Zajac B**, Tomczyk M, Koszalka P, Smolenski RT, Slominska EM. *Impaired L-arginine metabolism marks endothelial dysfunction in CD73-deficient mice*, Molecular and Cellular Biochemistry 2019; 458: 133-142.
IF=2.795, MNiSW=70.000

I22. Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Serocki M, Bulinska A, Mierzejewska, Friebe D, Alter C, Jaształ A, Lango R, Rogowski J, Bartoszewski R, Slominska EM, Chlopicki S, Schrader J, Yacoub MH, Smolenski RT. *Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; relation to pathological changes and clinical presentation*, Clinical Research in Cardiology 2019; 38(10): 781-787.

IF=5.268, MNiSW=100.000

I23. Mateuszuk L, Campagna R, **Kutryb-Zajac B**, Kus K, Slominska EM, Smolenski RT, Chlopicki S. *Reversal of endothelial dysfunction by nicotinamide mononucleotide via extracellular conversion to nicotinamide riboside*, Biochemical Pharmacology 2020; 178: 114019.

IF=4.960, MNiSW=100.000

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych (przed 08 czerwca 2017r.)

W roku 2013 uzyskałam tytuł zawodowy magistra analityki medycznej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed. Od III roku studiów magisterskich związana jestem z Katedrą i Zakładem Biochemii GUMed, gdzie pełniłam funkcję Przewodniczącej Biochemicznego Koła Naukowego, a moje prace z tego okresu nagradzane były na krajowych i międzynarodowych studenckich konferencjach naukowych. W czasie studiów magisterskich realizowałam badania w projektach naukowych, w tym w programie TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej pt. "Nukleotydy w Patologii, Diagnostyce i Terapii Chorób Serca" oraz w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR) pt. "Śródbłonek Naczyniowy w Chorobach Cywilizacyjnych: od Badań Poznawczych do Oferty Innowacyjnego Leku o Działaniu Śródbłonkowym". Praca magisterska pt. "Katabolizm nukleotydów na powierzchni zastawek serca" przygotowana w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda T. Smoleńskiego, uzyskała 1 miejsce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich organizowanym przez Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed oraz została uhonorowana Nagrodą Publiczności. Wyniki badań prowadzonych w pracy magisterskiej prezentowałam na uznanych konferencjach międzynarodowych, m.in. na 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (Madryt, 2013). Ponadto, podczas studiów magisterskich byłam aktywnym członkiem Międzynarodowego Stowarzyszenia Studentów Medycyny (IFMSA), w ramach którego udzielałam się społecznie i charytatywnie.

Od 1 czerwca 2013 roku, byłam uczestnikiem Studiów Doktoranckich na Wydziale Lekarskim GUMed. Rozprawę doktorską pt. „Zewnątrzkomórkowe przemiany nukleotydów w stenozie aortalnej i miażdżycy naczyń” przygotowałam w Katedrze i Zakładzie Biochemii, pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda T. Smoleńskiego. W pracy doktorskiej prowadziłam badania dotyczące tematyki sygnalizacji poprzez zewnątrzkomórkowe nukleotydy i ich katabolity w patologii układu sercowo-naczyniowego, takich jak miażdżycy tętnic oraz stenoza zastawki aortalnej. Schorzenia te są obok choroby nowotworowej jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych. Pacjenci z dysfunkcją mięśnia sercowego spowodowaną zwężeniem zastawki aortalnej lub chorobą wieńcową stanowią najliczniejszą grupę chorych na oddziałach kardiologicznych i kardiochirurgicznych. Na pierwszym etapie pracy doktorskiej, realizowałam badania w projekcie OPUS Narodowego Centrum Nauki pt. „Regulacja ekspresji ekto-5'-nukleotydu – zmiany w patologii i zastosowanie w terapii” oraz w projekcie TEAM Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Wyniki prowadzonych badań w zakresie analizy zmian zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów w miażdżycy tętnic wykazały wielokrotnie wyższą aktywność enzymu odpowiedzialnego za rozkład zewnątrzkomórkowej adenozy (ekto-deaminazy adenozy) w mysim modelu eksperymentalnej miażdżycy. Zjawisko znacznego wzrostu aktywności eADA w naczyniu miażdżycowym opisałam po raz pierwszy w roku 2014 (**II**). Badania te kontynuowałam w ramach grantu Preludium NCN, pt. „Mechanizmy i konsekwencje zmian aktywności ekto-deaminazy adenozy w procesie miażdżycowym”, którego byłam kierownikiem. Badania biochemiczne z tego zakresu realizowałam w Zakładzie Biochemii GUMed, natomiast badania służące ocenie lokalizacji komórkowej eADA z wykorzystaniem technik histologicznych i

immunohistochemicznych w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) w Krakowie, w ramach stażu. Pierwszy etap projektu został zakończony publikacją wyników w czasopiśmie *Cardiovascular Research* (I10). W pracy tej wykazałam, że wzrost aktywności naczyniowej eADA u myszy wyprzedza rozwój zmian miażdżycowych i wzrasta wraz z rozwojem procesu patologicznego w ścianie naczynia. Zidentyfikowanie tak spektakularnej zmiany w obrębie ściany naczynia, poprzedzającej rozwój procesu miażdżycowego, podkreśla nowatorski charakter dokonań badawczych i stanowi bezpośrednią przyczynę ich kontynuacji w ramach prac wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

Badania dotyczące metabolizmu nukleotydów w przebiegu stenozы aortalnej realizowałam we współpracy z Kliniką Kardiochirurgii i Chirurgii Naczyniowej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Obecnie, w obliczu braku prewencji oraz farmakoterapii stenozы aortalnej, chirurgiczna wymiana zastawki jest jedyną efektywną metodą leczenia. Niestety, późna kwalifikacja do zabiegu operacyjnego wielokrotnie doprowadza pacjentów do rozwoju schyłkowego stadium choroby. Podkreśla to znaczenie badań nad mechanizmami rozwoju stenozы aortalnej, poszukiwaniem celów terapeutycznych oraz wczesnych markerów tej choroby. Charakterystykę zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów w zastawce aortalnej, zaczęłam od badania tych przemian na powierzchni zastawek świńskich, które charakteryzowały się wysokimi aktywnościami ekto-nukleotydaz, enzymów odpowiedzialnych za zewnątrzkomórkową hydrolizę nukleotydów (I3). Enzymy te, a szczególnie bezpośrednio zaangażowana w produkcję zewnątrzkomórkowej adenozy, ekto-5'nukleotydaza okazały się kluczowe w utrzymywaniu prawidłowej funkcji zastawki aortalnej również w eksperymentalnym modelu mysim (I12). Natomiast badania przez nas pacjenci z rozwiniętą stenozą aortalną wykazywali specyficzne polimorfizmy w genie kodującym ekto-5'nukleotydazę (I6). Z uwagi na kluczowe znaczenie biologicznych protez zastawkowych w wymianie stenotycznej zastawki aortalnej, na kolejnym etapie badań przeanalizowałam wpływ znanych metod opracowania protez zastawkowych na aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów. Badania te wykazały, że zastosowanie odpowiednich warunków decelularyzacji tych protez może istotnie przyczynić się do poprawy ich jakości oraz wytrzymałości powszechniejszej (I9). W tym temacie, uczestniczyłam również w przygotowaniu trzech artykułów poglądowych, które dotyczyły przede wszystkim roli nukleotydów oraz sygnalizacji purynergiczej w rozwoju dysfunkcji naczyń i zastawek serca (I4, I11, I2). Ponadto, w swojej pracy naukowej przed obroną rozprawy doktorskiej brałam udział w badaniach dotyczących zaburzeń metabolizmu nukleotydów w miażdżycy pod wpływem działania nowych pochodnych nikotynamidu (I6), w nadciśnieniu tętniczym (I5) oraz chorobie Huntingtona (I8).

Podsumowując, przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych mój dorobek obejmował 9 oryginalnych artykułów naukowych i 3 prace przeglądowe (IF=25.096; MNiSW=260.000).

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych (po 08 czerwca 2017r.)

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych 08 czerwca 2017 roku nadanego przed Radę Wydziału Lekarskiego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego kontynuowałam badania dotyczące znaczenia sygnalizacji purynergiczej w stenozie zastawki aortalnej. W grupie 86 pacjentów dokonałam analizy aktywności enzymów zewnątrzkomórkowego katabolizmu nukleotydów na powierzchni stenotycznych (n=62) i niestenotycznych (n=24) zastawek aortalnych, uzyskanych podczas wymiany zastawki aortalnej bądź zabiegu Bentalla w Klinice Kardiochirurgii i Chirurgii Naczyniowej GUMed. Wyniki wykazały obecność pro-zapalnego i pro-stenotycznego układu aktywności ekto-enzymów na powierzchni zmienionych patologicznie zastawek, obejmującego obniżenie aktywności ekto-nukleotydaz i podwyższenie aktywności enzymu degradującego adenozyne (eADA). Ponadto, zaobserwowałam ujemne korelacje aktywności ekto-nukleotydaz z parametrami echokardiograficznymi zaawansowania stenozы aortalnej u badanych pacjentów, podczas gdy aktywność eADA korelowała dodatnio z zaawansowaniem choroby. Aktywności ekto-enzymów korelowały również ze stężeniem jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} i PO_4^{3-} w zastawce aortalnej (aktywności ekto-nukleotydaz – ujemnie, aktywność eADA – dodatnio). Wykorzystując testy funkcjonalne oraz techniki histologiczne i immunofluorescencyjne, cytometrię przepływową i RT-PCR zidentyfikowałam wszystkie główne ekto-enzymy zaangażowane w metabolizm nukleotydów w zastawkach aortalnych, które obejmowały ekto-nukleotydazy (CD39, CD73, eNPP1), fosfatazę alkaliczną oraz ekto-deaminazę adenozyne. Ponadto, w ramach badań realizowanych

w Instytucie Kardiologii Molekularnej Uniwersytetu w Düsseldorfie oraz w Heart Science Centre w Imperial College of London at Harefield Hospital w Wielkiej Brytanii, wykazałam, że aktywności ekto-enzymów szlaku katabolizmu nukleotydów mogą pochodzić zarówno z komórek budujących zastawkę aortalną (komórki śródblónka i śródmiaższu), jak również z komórek nacieku zapalnego. Wykorzystanie cytometrii przepływowej pozwoliło nie tylko uzyskać informację na temat pochodzenia poszczególnych aktywności enzymatycznych, ale również scharakteryzować infiltrat zapalny w stenotycznej zastawce aortalnej, który obejmował: limfocyty T pomocnicze > limfocyty B > makrofagi > limfocyty T cytotoksyczne > granulocyty. W swoich badaniach wykazałam również, że zahamowanie aktywności enzymu rozkładającego adenozyne spowodowało znaczne zmniejszenie grubości zastawki aortalnej i obniżenie stężenia osoczowych markerów zwapnienia w mysim modelu stenozы aortalnej, co podkreśla potencjał terapeutycznego stosowania inhibitorów eADA w stenozie zastawki aortalnej (**I17, I22**). Ponadto, w jednej z ostatnich prac wykazałam znaczenie statyn, które poprzez swój wpływ na aktywności enzymów modulujących stężenie zewnątrzkomórkowej adenozyne w zastawkach aortalnych (ekto-5'nukleotydazy i ekto-deaminazy adenozyne) wykazywały istotny potencjał w łagodzeniu przebiegu zwężenia zastawki i następującej wtórnie niewydolności serca u pacjentów ze stenozą aortalną (*Kutryb-Zajac et al. NNA 2020, publikacja przyjęta do druku*).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych prowadziłam również badania nad ekspresją i lokalizacją receptorów purynergiczných w zmienionych patologicznie zastawkach aortalnych i naczyniach. Zagadnienie to realizowałam w ramach kontynuacji uzyskanego finansowania na zadanie badawcze MNiSW dla młodych naukowców GUMed w latach 2016 i 2017. Materiałem badanym w tym projekcie były ludzkie zastawki aortalne pozyskane na wcześniejszych etapach pracy. Komórkowa lokalizacja receptorów purynergiczných w skalcyfikowanych zastawkach aortalnych oraz naczyniach objętych procesem miażdżycowym oceniana była z wykorzystaniem technik histologiczných i immunohistochemiczných w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) w Krakowie oraz w Heart Science Centre, Imperial College London at Harefield Hospital, w Wielkiej Brytanii. Wyniki tych badań wykazały ekspresję receptorów adenozynowych podtypów A1, A2a i A2b w ludzkich zastawkach aortalnych. Ponadto testy funkcjonalne *ex vivo* z wykorzystaniem mysich zastawek aortalnych traktowanych medium osteogennym wykazały, że aktywacja receptorów A2a działa pro-stenotycznie, podczas gdy aktywacja receptorów A1 i A2b chroni zastawkę przez kalcyfikacją (**I22**).

Kolejno, zajmowałam się tematem uwalniania nukleotydów z komórek zastawek i naczyń, które badałam w ramach uzyskanego finansowania na zadanie badawcze MNiSW dla młodych naukowców GUMed w latach 2018 i 2019. W tych badaniach wykazałam, że zmienione patologicznie tkanki uwalniają znaczną ilość nukleotydów, obserwowanych w medium inkubacyjnym jako ich katabolity (głównie hipoksantyna oraz urydyna). Interesującym wynikiem okazała się ilość obserwowanej w medium urydyny, niewspółmiernie wysoka w porównaniu z wewnątrzkomórkową pulą nukleotydów uracylowych. Zwiększone uwalnianie urydyny zostało potwierdzone w eksperymentach *in vitro* podczas traktowania komórek śródblónka oligomycyną/jodoocetanem oraz nadtlenoazotynem. Istotnym uzupełnieniem tych badań będzie analogiczne traktowanie komórek mięśniówki gładkiej naczyń oraz wpływ wyżej wymienionych czynników na wewnątrzkomórkowe stężenie nukleotydów uracylowych (*artykuł w przygotowaniu*).

Istotnym elementem moich badań po uzyskaniu stopnia doktora była praca nad mechanizmami dysfunkcji śródblónka i miażdżycy tętnic, niezwiązanymi ze wzrostem aktywności ekto-deaminazy adenozyne. Badania te realizowane były w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed we współpracy z wiodącymi międzynarodowymi i krajowymi jednostkami badawczymi, m.in. z Department of Surgery and Translational Medicine, University of Milano-Bicocca, Monza we Włoszech oraz z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków w Krakowie. Wykazały one kluczową rolę aktywności ekto-nukleotydaz (eNTPD1, e5'NT) w protekcji komórek śródblónka przed stresem oksydacyjnym (**I13**), znaczenie pochodnych nikotynamidu w przeciwdziałaniu dysfunkcji śródblónka indukowanej przez IL1 β - i TNF α (**I23**) oraz przeciw-miażdżycowego działania mutein Apo-A1 Milano (**I18**). Ponadto, w badaniach prowadzonych w Zakładzie Biochemii wykazaliśmy kluczowe zmiany w metabolizmie argininy i pochodnych jej aminokwasów, jak również w przemianach nukleotydów purynowych w eksperymentalnych modelach miażdżycy oraz choroby Huntingtona (**I21, I16, I15**).

Kolejnym zagadnieniem badawczym, które podjęłam w ramach mojej pracy naukowej po

uzyskaniu stopnia doktora było poszukiwanie związku pomiędzy zmianami w metabolizmie nukleotydów a rozwojem choroby nowotworowej. Badania te były kontynuacją pracy rozpoczętej w ramach projektu NCBiR pt. „Farmakoterapia śródblonka naczyniowego i aktywacja płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej”, w którym uczestniczę od grudnia 2015 roku, a do ich efektów można zaliczyć identyfikację zwiększonego stężenia osoczowego 4-pirydono-3-karbokysamidu-1-beta-rybonukleozydu (4PYR) u pacjentów z rakiem płuc (**I20**), zaburzeń metabolizmu nikotynamidu u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego (**I14**), oraz znaczenia ekto-5' nukleotydyazy w rozwoju i stopniu złośliwości raka jajnika (**I19**).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, wyniki moich badań, wyłączając dzieło habilitacyjne, zostały opublikowane w 11 oryginalnych artykułach naukowych (IF=33.923; MNiSW=500.000). W tym czasie byłam wykonawcą projektu NCBiR oraz 3 projektów NCN, spośród których w jednym z nich jestem kierownikiem.

Współpraca z zagranicznymi jednostkami naukowymi

- 1. Department of Biology, University of Pisa, Piza, Włochy; School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Włochy; Unit of Gynecological Oncology Research, European Institute of Oncology, Mediolan, Włochy, Kierownik: Prof. Roberto Giovannoni**
Okres współpracy: 2016-obecnie
Rola habilitantki:
 - udział w badaniach dotyczących:
 - wpływu i mechanizmu działania ekto-5' nukleotydyazy na rozwój raka jajnika;
 - protekcyjnego działania ko-ekspresji enzymów zewnątrzkomórkowego metabolizmu nukleotydów, ekto-5' nukleotydyazy i ekto-difosfohydrolazy trójfosfonukleozydowej w świńskich komórkach śródblonka wyeksponowanych na działanie stresu oksydacyjnego oraz wpływu białka ApoA1-Milano na rozwój miażdżycy w modelu mysim;
 - kierowanie międzynarodowym projektem Sonata NCN, w ramach którego współpraca obejmuje optymalizację metod transfekcji i transdukcji lentiwirusowej, projektowanie wektorów ekspresyjnych, wykorzystywanych do znakowania białek ekto-enzymów i analizy ich transferu pomiędzy komórkami.Dotychczasowe efekty współpracy: publikacja 3 artykułów naukowych o łącznym wskaźniku IF=14.990 (**I13, I18, I19**).
- 2. Heart Science Centre, Imperial College London at Harefield Hospital, Londyn, Wielka Brytania, Kierownik: Prof. Magdi H. Yacoub, Okres współpracy: 2014-obecnie**
Rola habilitantki: udział w badaniach dotyczących:
 - wpływu metod opracowania protez zastawkowych na aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów;
 - analizy aktywności ekto-enzymów przemian nukleotydów oraz uwalniania nukleotydów i ich katabolitów z ludzkich zastawek aortalnych.Dotychczasowe efekty współpracy: publikacja 3 artykułów naukowych o łącznym wskaźniku IF=8.754 (**I9, I17, I22**).
- 3. Instytut Kardiologii Molekularnej Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Niemcy, Kierownik: Prof. Jürgen Schrader, Okres współpracy: 2015-obecnie**
Rola habilitantki: udział w badaniach dotyczących analizy infiltratu zapalnego w ludzkiej stenotycznej zastawce aortalnej oraz identyfikacja komórkowych źródeł ekto-enzymów w tych zastawkach.
Dotychczasowe efekty współpracy: publikacja artykułu naukowych o wskaźniku IF=5.268 (**I22**).

Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi i zadaniami naukowymi

1. „Ekto-enzymy w interakcjach śródbłonka naczyniowego z komórkami krążącymi we krwi w fizjologii, patologii i terapii; czy komórki mogą wymieniać się ekto-enzymami?”; okres realizacji 2020 – obecnie; Projekt Sonata finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (kierownik; projekt o zasięgu międzynarodowym)
2. „Uwalnianie i zewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów zawierających uracyl w hodowlach komórek naczyń krwionośnych i zastawek serca”, okres realizacji: 2018 – 2019 Zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW (kierownik; zadanie o zasięgu międzynarodowym)
3. „Ekspresja oraz lokalizacja receptorów purynergicznycych w zmienionych patologicznie zastawkach aortalnych i naczyniach”, okres realizacji: 2016 – 2017, Zadanie badawcze dla młodych naukowców GUMed finansowane przez MNiSW (kierownik; zadanie o zasięgu międzynarodowym)
4. „Mechanizmy i konsekwencje zmian aktywności ekto-deaminazy adenozyliny w procesie miażdżycowym”, okres realizacji: 2015 – 2017, Projekt Preludium finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (kierownik; projekt o zasięgu krajowym)

Udział w projektach badawczych

1. Projekt Opus finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, okres trwania projektu: 2017 – obecnie, tytuł projektu: „Adaptacje metabolizmu energetycznego miocytów serca w miażdżycy – znaczenie w patologii i strategiach terapeutycznych”, kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński, charakter uczestnictwa: wykonawca
2. Projekt Harmonia finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, okres trwania projektu: 2017 – obecnie, tytuł projektu: „Rewersja niewydolności serca podczas mechanicznego wspomaganie funkcji lewej komory – rola nukleotydów i przemian energetycznych w komórkach serca”, kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński, charakter uczestnictwa: wykonawca
3. Program STRATEGMED finansowany przez: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, okres trwania projektu: 2015 – obecnie, tytuł projektu: „Farmakoterapia śródbłonka naczyniowego i aktywacja płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenu azotu i tlenu węgla”, charakter uczestnictwa: wykonawca
4. Projekt TEAM finansowany przez: Fundację na rzecz Nauki Polskiej, okres trwania projektu: 2013 – 2015, tytuł projektu: „Nukleotydy w patologii, diagnostyce i terapii chorób serca”, charakter uczestnictwa: wykonawca
5. Program STRATEGMED finansowany przez: Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, okres trwania projektu: 2010 – 2015, tytuł projektu: „Śródbłonek Naczyniowy w Chorobach Cywilizacyjnych: od Badań Poznawczych do Oferty Innowacyjnego Leku o Działaniu Śródbłonkowym”, charakter uczestnictwa: wykonawca
6. Projekt Opus finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, okres trwania projektu: 2011 – 2014, tytuł projektu: „Regulacja ekspresji ekto-5'-nukleotydu – zmiany w patologii i zastosowania w terapii”, kierownik projektu: prof. dr hab. Ryszard T. Smoleński, charakter uczestnictwa: wykonawca

Pobyty w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych

2. Heart Science Centre, Imperial College London at Harefield Hospital, Londyn, Wielka Brytania, kierownik jednostki: prof. Magdi H. Yacoub, maj-czerwiec 2014;
3. Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET), Kraków, Polska, Pracownia Farmakoterapii Doświadczalnej Śródbłonna, kierownik jednostki: prof. dr hab. Stefan Chłopicki, od 2015 roku regularne wyjazdy (łącznie 6 miesięcy);
4. Instytut Kardiologii Molekularnej Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Niemcy, kierownik jednostki: prof. Jürgen Schrader, kwiecień 2015;
5. Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, Wielka Brytania, kierownik jednostki: dr Mick Henderson, luty 2016.

Członkostwo w międzynarodowych lub krajowych towarzystwach naukowych

1. Polskie Towarzystwo Biochemiczne, od 2018 roku
2. Purine and Pyrimidine Society, od 2017 roku

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę oraz sztukę

Działalność dydaktyczna

1. Prowadzenie zajęć dydaktycznych z biochemii dla studentów II roku kierunku lekarskiego, lekarsko-dentystycznego oraz English Division Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
2. Promotor pracy dyplomowej mgr Pauliny Mierzejewskiej pt. „Model myszy z nokautem CD73 w badaniach naukowych” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed, okres sprawowania opieki: 2017-2018, nazwa uczelni lub innej instytucji kształcącej studentów: Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Popularyzacja nauki

1. Udział w organizacji XV Ogólnopolskiego Konkursu Wiedzy Biochemicznej „Superhelisa 2018”, który odbył się 25-26 maja 2018 w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed

Organizacja konferencji

1. XXII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej PTK oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych PAN, 2017, Gdańsk-Sobieszewo, rola habilitanta: członek komitetu organizacyjnego,
2. 17th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, 2017, Gdansk, rola habilitanta: członek komitetu organizacyjnego i organizator sesji tematycznej.

Recenzent w czasopismach

1. BioMed Research International, od 2020 roku
2. Disease Markers, od 2020 roku

3. Journal of Cellular and Molecular Medicine, od 2019 roku
4. Journal of Cardiovascular Translational Research, od 2017 roku
5. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, od 2017 roku

Działalność organizacyjna

1. Współkoordynacja pracy zespołu „Mikrokrążenie i miażdżycy” w ramach Priorytetowego Obszaru Badawczego „Kardiologia i medycyna sercowo-naczyniowa” Inicjatywy Doskonałości – Uczelni Badawczej (2020 – obecnie).

Praca zespołu, którego jestem współkoordynatorem, opierać się będzie o poszukiwanie mechanizmów dysfunkcji śródbłonka u pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną z Krajowego Centrum Hipercholesterolemii Rodzinnej w Gdańsku. Stan śródbłonka u tych pacjentów będzie oceniony metodą opartą o badanie fluorescencji NADH w następstwie przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia w Centrum Medycyny Translacyjnej GUMed. Następnie uzyskane wyniki zostaną skorelowane z parametrami funkcji śródbłonka, które będą oznaczone w ramach obszernego panelu analiz metabolomicznych i proteomicznych w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed. Pozwoli to wskazać potencjalne mechanizmy dysfunkcji śródbłonka u pacjentów, które będą następnie analizowane w eksperymentalnych komórkowych i zwierzęcych modelach hiperlipidemii i miażdżycy.

2. Wdrożenie w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed diagnostyki i monitorowania leczenia cystynozy w Polsce.

Od kwietnia 2015 roku, we współpracy z firmą Orphan-Europe Recordati Group, prowadzę w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed diagnostykę i monitorowanie leczenia cystynozy w Polsce. Cystynozą jest uwarunkowaną genetycznie chorobą metaboliczną, spowodowaną mutacjami genu *CTNS* kodującego cystynozynę, lizosomalne białko transportowe dla aminokwasu – cystyny. Następstwem jest wewnątrzlizosomalne spichrzenie cystyny w większości tkanek i narządów, w tym nerek i oka, co prowadzi do ich nieodwracalnego uszkodzenia. Przyczynowe leczenie cystynozy polega na przyjmowaniu cysteaminy, która łącząc się z wewnątrzlizosomalną cystyną umożliwia jej uwalnianie z lizosomów poprzez kanał transportowy dla lizyny. Oznaczenie poziomu cystyny w leukocytach krwi obwodowej jest obok obrazu klinicznego podstawą diagnostyki oraz monitorowania leczenia cystynozy. Dotychczas tylko nieliczne laboratoria w Europie (w tym żadne w Polsce) prowadziły oznaczanie poziomu cystyny w leukocytach, co komplikowało monitorowanie polskich pacjentów oraz znacząco ograniczało diagnostykę nowych przypadków. Będąc diagnostą laboratoryjnym, po odbytym w Wielkiej Brytanii szkoleniu w Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, w zakresie metodyki oznaczania stężenia cystyny, wdrożyłam tego rodzaju oznaczenie w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed. Obecnie pod opieką naszego laboratorium znajduje się 16 pacjentów z Polski oraz 6 pacjentów z krajów Europy Środkowo-Wschodniej. Rocznie w Katedrze i Zakładzie Biochemii wykonywanych jest ok. 50 oznaczeń stężenia cystyny w leukocytach krwi obwodowej.

6. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Nagrody za działalność naukową i dydaktyczną

1. Nagrody za udział w konferencjach naukowych i granty wyjazdowe:
 - a. Grant wyjazdowy na konferencję „18th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man”, która odbyła się w dniach 12-14 czerwca 2019 roku w Lyon, we Francji, rok przyznania: 2019, organ przyznający nagrodę: The Purine and Pyrimidine Society
 - b. Nagroda za najlepszą prezentację na konferencji „27th Krakow Conference on Endothelium, IX Seminarium JCET”, która odbyła się w dniach 6-8 czerwca 2019 roku

w Małym Cichym, rok przyznania: 2019, organ przyznający nagrodę: Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków w Krakowie

- c. Nagroda za najlepszy poster na konferencji „8th Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering”, która odbyła się w dniach 26-28 września 2018 roku w Londynie, rok przyznania: 2018, organ przyznający nagrodę: Komitet organizacyjny konferencji
 - d. Nagroda za najlepszy poster na konferencji „8th Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering”, która odbyła się w dniach 26-28 września 2018 roku w Londynie, rok przyznania: 2018, organ przyznający nagrodę: Komitet organizacyjny konferencji
 - e. Grant wyjazdowy na konferencję „International Conference on Purinergic Signalling. 6th Joint German – Italian Purine Club Meeting”, która odbyła się w dniach 23-25 lipca 2015 roku w Hamburgu, rok przyznania: 2015, organ przyznający nagrodę: German – Italian Purine Club
 - f. I m-ce w Sesji Kardiologicznej XXI Międzynarodowej Naukowej Konferencji Studenckiej, rok przyznania: 2013, organ przyznający nagrodę: Komitet Organizacyjny XXI Międzynarodowej Naukowej Konferencji Studenckiej
 - g. I m-ce w Sesji Posterowej XXVII Ogólnopolskiej Studenckiej Konferencji Kardiologicznej, rok przyznania: 2013, organ przyznający nagrodę: Komitet Organizacyjny XXVII Ogólnopolskiej Studenckiej Konferencji Kardiologicznej
2. Nagrody Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego:
- a. Nagroda za wyróżnioną rozprawę doktorską, rok przyznania: 2018
 - b. Nagroda zespołowa I stopnia za badania nad metabolizmem nukleotydów obecnych poza komórką w patologiach naczyniowych, rok przyznania: 2018
 - c. Nagroda zespołowa II stopnia za badania katabolizmu nukleotydów i identyfikację nieznanych szlaków przemian oraz ich zmian w fizjologii i patologii, rok przyznania: 2018
 - d. Stypendium doktorskie dla pracowników GUMed, rok przyznania: 2016
 - e. Stypendium projakościowe dla doktorantów GUMed, lata przyznawania: 2014-2016, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed
 - f. Stypendium dla najlepszych doktorantów GUMed, lata przyznawania: 2014-2016, organ przyznający nagrodę: Rektor GUMed
3. Inne nagrody i wyróżnienia:
- a. Nagroda Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za najlepszą rozprawę doktorską z biochemii obronioną w roku 2017, rok przyznania: 2018
 - b. Wyróżnienie Oddziału Państwowej Akademii Nauk w Gdańsku dla młodych naukowców za najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2016r., rok przyznania: 2017
 - c. I m-ce w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich organizowanym przez Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed, rok przyznania: 2013,

organ przyznający nagrodę: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed

- d. Nagroda Publiczności w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich organizowanym przez Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed, rok przyznania: 2013, organ przyznający nagrodę: Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed

Wygłoszenie referatów na konferencjach tematycznych

1. **Kutryb-Zajac B**, Jablonska P, Mierzejewska P, Lango R, Rogowski J, Slominska EM, Yacoub MH, Smolenski RT, 2019, *Clinical correlations of extracellular nucleotide metabolism ecto-enzymes in patients with calcific aortic valve disease*, 18th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Lyon, Francja.
2. Jablonska P, **Kutryb-Zajac B**, Tomczyk M, Mierzejewska P, Koszalka P, Smolenski RT, Slominska EM, 2019, *Extracellular metabolism of NAD⁺ and NMN on the surface of murine lung endothelial cells*, 18th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Lyon, Francja.
3. **Kutryb-Zajac B**, Mierzejewska P, Bulinska A, Koszalka P, Jaształ A, Zabielska M, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT, 2019, *Mechanizmy wzrostu aktywności ekto-deaminazy adenozynej w komórkach śródbłonna i terapeutyczne efekty jej hamowania w patologiach naczyniowych i chorobie nowotworowej*, 27th Krakow Conference on Endothelium, IX Seminarium JCET, Male Ciche, Polska
4. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Bulinska A, Jaształ A, Jablonska P, Serocki M, Bartoszewski, Lango R, Rogowski J, Slominska EM, Smolenski RT, 2017, *Nucleotide converting ecto-enzyme pattern in vascular inflammation and atherosclerosis*, 17th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man, Gdansk, Polska.
5. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Jaształ A, Sucaszys-Szulc E, Mateuszuk L, Zabielska M, Serocki M, Bartoszewski, Slominska EM, Chlopicki S, Smolenski RT, 2017, *Vascular adenosine deaminase in endothelial activation, inflammation and atherosclerosis*, XXII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Gdansk, Polska.
6. **Kutryb-Zajac B**, Smolenski RT, 2017, *Molekularne i komórkowe podstawy uszkodzeń implantowanych rusztań macierzy zewnątrzkomórkowej*, Czwarte Międzynarodowe Warsztaty dotyczące zastosowania macierzy zewnątrzkomórkowej „CorMatrix” w kardiochirurgii dziecięcej oraz kardiochirurgii dorosłych, Łódź, Polska.
7. **Kutryb-Zajac B**, Smolenski RT, 2016, *Co nowego w leczeniu cystynozy w Polsce?*, XV Konferencja Polskiego Towarzystwa Nefrologii Dziecięcej, Toruń, Polska.
8. **Kutryb-Zajac B**, Mateuszuk L, Zukowska P, Bulinska A, Toczek M, Slominska EM, Chlopicki S, Smolenski RT, 2015, *Vascular ecto-adenosine deaminase (EADA) in the development of atherosclerosis and anti-atherosclerotic effects of EADA inhibitors*, XXII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk przy udziale Instytutu Kardiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Collegium Medicum w Krakowie, Kraków, Polska.

9. **Kutryb-Zajac B**, Mateuszuk L, Zukowska P, Olkowicz M, Zabielska M, Toczek M, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT, 2015, *Endothelial extracellular nucleotide degradation in valve disease and atherosclerosis*, 6th Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics Seminar, Wierchomla Mała, Polska.
10. **Kutryb-Zajac B**, Jablonska P, Zukowska P, Toczek M, Rogowski J, Lango R, Slominska EM, Smolenski RT, 2014, *Extracellular nucleotide catabolism on the Surface of human aortic valves and its changes in pathology*, XIX Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Gdansk, Polska.
11. **Kutryb-Zajac B**, Sommerfeld P, Zukowska P, Toczek M, Rogowski J, Lango R, Slominska EM, Smolenski RT, 2014, *Extracellular adenine nucleotide catabolism on the calcified aortic valve surface and its clinical correlates*, 6th Biennial Meeting on Heart Valve Biology and Tissue Engineering, Londyn, Wielka Brytania.
12. **Kutryb-Zajac B**, 2014, *Nucleotide catabolites production in the heart valves and vessel wall. The specific role of uridine*, 22nd International Student Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Polska.
13. **Kutryb-Zajac B**, Toczek M, Zukowska P, Lipinski M, Rybakowska I, Romaszko P, Zabielska M, Kapczynska M, Stanislawska A, Slominska EM, Smolenski RT, 2013, *Extracellular adenine nucleotide catabolism on the aortic valve Surface in mice model of atherosclerosis*, XVIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Szczyrk, Polska.
14. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Toczek M, Lipinski M, Slominska EM, Chlopicki S, Smolenski RT, 2013, *Flow system in the study of adenine nucleotide catabolism in aortoiliac bifurcation of atherosclerotic mice*, XVIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Szczyrk, Polska.
15. **Kutryb-Zajac B**, Lango R, Lipinski M, Slominska EM, Smolenski RT, 2013, *Nucleotide metabolism on the surface of human aortic valve*, XVIII Sympozjum Sekcji Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Szczyrk, Polska.
16. **Kutryb-Zajac B**, Zukowska P, Toczek M, Kapczynska M, Szkodo A, Rybakowska I, Romaszko P, Koszalka P, Chlopicki S, Slominska EM, Smolenski RT, 2013, *Enzymes of extracellular nucleotide catabolism in aortic wall and its relation to development of atherosclerosis in ApoE/LDLr double KO mice*, 15th International Symposium on Purine and Pyrimidine in Man, Madryt, Hiszpania.
17. **Kutryb B**, 2013, *Enzymes of nucleotide catabolism on the human valve surface and its relation to development of calcification*, 21st International Student Conference for Students and Young Doctors, Gdańsk, Polska.
18. **Kutryb B**, Kapczynska M, Koszalka P, Golunska M, Slominska EM, Smolenski RT, 2012, *Endothelial Ecto-5'-nucleotidase and its Role in Extracellular Nucleotide Degradation: a Mouse Knock-out Study*, 20th Krakow Conference of Endothelium, Kraków Polska.
19. **Kutryb B**, Toczek M, Kapczynska, Lango R. M, Slominska EM, Smolenski RT. *Extracellular Adenine Nucleotide Catabolism in Experimental Models and Human pathology*, 2012, XVII Sympozjum Sekcji

Kardiologii Eksperymentalnej Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Komitetu Nauk Fizjologicznych i Farmakologicznych Polskiej Akademii Nauk, Rynia, Polska.

Nie ubiegałam się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

dr n. med. Barbara Kutryb-Zajac
B. Kutryb-Zajac
Adiunkt
Katedra i Zakład Biochemii
Gdański Uniwersytet Medyczny

.....
(podpis wnioskodawcy)