

*Załącznik nr 2 do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego*

# **AUTOREFERAT**

**Agata Monika Sakowicz**

Zakład Biotechnologii Medycznej  
Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Łódź, 2019

## Spis treści:

1. Imię i Nazwisko	str. 3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej	str. 3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	str. 3
4. Wskazane osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):	
4.1. tytuł osiągnięcia naukowego	str. 3
4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	str. 4
4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	str. 5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:	
5.1. Dane bibliometryczne	str. 14
5.2. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora	str. 14
5.3. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora	str. 16
6. Literatura	str. 29

**Ad. 1. Imię i Nazwisko**

Agata Monika Sakowicz

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

- 2001                      Magister biologii w zakresie mikrobiologii,  
Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
- 2001                      Uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego, nr prawa wykonywania zawodu  
00919
- 2010                      Stopień naukowy doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej,  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Temat rozprawy doktorskiej:  
*„Rola wybranych genetycznych czynników ryzyka w chorobach naczyń  
wieńcowych u pacjentów przed 45 rokiem życia”*
- 2010                      uzyskanie tytułu specjalisty z laboratoryjnej diagnostyki medycznej
- 2015                      uzyskanie tytułu specjalisty z laboratoryjnej genetyki medycznej

**Ad. 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 01.10.2009 – 30.09.2010                      asystent w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Uniwersytet  
Medyczny w Łodzi
- 01.10.2010 – obecnie                      adiunkt w Zakładzie Biotechnologii Medycznej Uniwersytet  
Medyczny w Łodzi

**Ad. 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)****Ad. 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

„NEMO, kluczowy aktywator czynnika transkrypcyjnego NFκB, i jego związek z molekularnym mechanizmem zjawiska preeklampsji.”

#### Ad. 4.2. Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

##### Prace oryginalne

1. **Sakowicz A**, Hejduk P, Pietrucha T, Nowakowska M, Płuciennik E, Pospiech K, Gach A, Rybak - Krzyszkowska M, Sakowicz B, Kaminski M, Krasomski G, Biesiada L, Finding NEMO in Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Apr;214(4):538.e1-538.e7. doi: 10.1016/j.ajog.2015.11.002 (IF=5.226, MNiSW=45)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; zaplanowanie i koordynowanie wszystkich eksperymentów; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; uczestnictwo w wykonaniu prac związanych z ekstrakcją całkowitego RNA z krwi żyłnej, pępowinowej i łożyska oraz walidacji i przeprowadzeniu procesu Real-time qPCR; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział – 70%.
2. **Sakowicz A**, Pietrucha T, Rybak-Krzyszkowska M, Huras H, Gach A, Sakowicz B, Banaszczyk M, Grzesiak M, Biesiada L. Double hit of NEMO gene in preeclampsia. *PLoS One.* 2017 Jun 27;12(6):e0180065. (IF=2.766, MNiSW=35)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; pozyskanie dofinansowania na prowadzenie prac badawczych; zaplanowanie i koordynowanie wszystkich eksperymentów; uczestnictwo w wykonaniu prac związanych z (1) ekstrakcją całkowitego RNA z krwi żyłnej, pępowinowej i łożyska oraz przeprowadzeniu procesu Real-time qPCR, (2) izolacją DNA z krwi żyłnej matczynej i krwi pępowinowej, (3) przeprowadzeniem reakcji PCR i procesem znakowania uzyskanych w reakcji PCR fragmentów genu NEMO, (4) analizą bioinformatyczną uzyskanych wyników; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział – 70%.
3. **Sakowicz A**, Lisowska M, Biesiada L, Płuciennik E, Gach A, Rybak-Krzyszkowska M, Huras H, Sakowicz B, Romanowicz H, Piastowska-Ciesielska AW, Grzesiak M, Pietrucha T. Placental Expression of NEMO Protein in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Disease Markers.* 2019 Jan 2;2019:8418379. doi: 10.1155/2019/8418379. (IF=2.949, MNiSW=25)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za aspekt molekularny badań; wiodący autor koncepcji pracy; zaplanowanie i koordynowanie wszystkich eksperymentów; uczestnictwo w wykonaniu prac związanych z (1) ekstrakcją białka całkowitego oraz podfrakcji cytoplazmatycznej i jądrowej, (2) oceną stężenia białka NEMO metodą ELISA, (3) ocena ilości białka NEMO metodą Western blot, (4) wykonaniem analiz immunohistochemicznych; interpretacja wyników; napisanie finalnej wersji manuskryptu. Mój udział – 70%.

### **Prace podglądowe:**

**Sakowicz A.** The role of NFκB in the three stages of pregnancy - implantation, maintenance, and labour: a review article. BJOG. 2018 Oct;125(11):1379-1387. doi: 10.1111/1471-0528.15172. (IF=4.876, MNiSW=45)

Indywidualny wkład: autor korespondencyjny odpowiedzialny za przygotowanie pracy oraz dokonanie przeglądu literaturowego. Napisanie pełnej wersji manuskryptu wraz z przygotowaniem rycin. Mój udział – 100%

### **Ad. 4.3. Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Podstawowym kierunkiem prowadzonych przeze mnie badań jest poznanie patomechanizmu rozwoju zjawiska stanu przedrzucawkowego (preeklampsji, PE). Badania swoje prowadziłam i nadal kontynuuję w oparciu o materiał pochodzący od kobiet, których ciąża przebiegała bez komplikacji oraz tych u których zdiagnozowano stan przedrzucawkowy. Na początkowym etapie swojej pracy w oparciu o dane literaturowe wskazujące na:

- dziedziczny charakter zjawiska preeklampsji związany głównie z linią matczyną,<sup>1</sup>
- udział genów ojcowskich dziedziczonych przez płód w rozwoju stanu przedrzucawkowego,<sup>2</sup>
- związek pomiędzy płcią męską a zwiększoną predyspozycją do zjawiska preeklampsji,<sup>3</sup>
- związek pomiędzy podniesionym stężeniem mediatorów stanu zapalnego w organizmie matki a także łożysku a występowaniem zjawiska preeklampsji,<sup>4-7</sup>
- wzrost aktywności czynnika NFκB (z ang *Nuclear Factor kappa B*) w łożyskach pochodzących od kobiet których ciąża była powikłana stanem przedrzucawkowym,<sup>8,9</sup>

postawiłam hipotezę, iż istnieje jakiś czynnik kodowany przez gen znajdujący się na chromosomie X i odgrywający istotną rolę w aktywacji czynnika NFκB, który może mieć kluczowe znaczenie w rozwoju zjawiska preeklampsji. Analiza bioinformatyczna genów zlokalizowanych na chromosomie X pozwoliła mi na wytypowanie kandydata – gen kodujący białko NEMO (z ang. *NFκB Essential Modulator*), które odgrywa kluczową rolę w klasycznej ścieżce aktywacji czynnika NFκB. Ponadto, warianty sekwencji nukleotydowej genu *NEMO* skutkujące zaburzeniem funkcji lub stężenia białka wiązane są w literaturze z różnymi zespołami ze wspólnym dominującym elementem fenotypu w postaci zaburzeń immunologicznych u pacjentów. U chłopców zespoły te są z reguły letalne.<sup>10-13</sup>

Celem mojej pracy stanowiącej podstawę niniejszego postępowania było sprawdzenie czy NEMO może być zaangażowane w patomechanizm zjawiska preeklampsji. Z tego względu dokonywałam oceny ekspresji genu *NEMO* w komórkach krwi obwodowej matek, krwi pępowinowej oraz łożyskach pacjentek zakwalifikowanych do badania. Badałam również rozmieszczenie białka NEMO w poszczególnych strukturach kosmków łożyskowych (badania immunohistochemiczne) oraz

sprawdziłam czy istnieje zależność pomiędzy stężeniem białka NEMO w kompartmentach cytoplazmatycznych i jądrowych komórek łożyska a wystąpieniem zjawiska preeklampsji. Ponadto, dokonałam sekwencjonowania części egzomowych genu *NEMO*, poszukując tym samym odpowiedzi na pytanie czy istnieje związek pomiędzy istnieniem wariantów nukleotydowych genu *NEMO* u matek i ich dzieci a rozwojem zjawiska preeklampsji.

Badania moje mogą przyczynić się do zrozumienia patomechanizmu rozwoju preeklampsji, sposobu jej dziedziczenia oraz w przyszłości do opracowywania nowych leków i standardów terapeutycznych.

### **Wprowadzenie:**

Zgodnie z obecnymi wytycznymi Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów (z ang. *The American College of Obstetricians and Gynecologists*; ACOG) i Międzynarodowego Towarzystwa do Badań Nadciśnienia w Ciąży (z ang. *The International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy*; ISSHP), stan przedrzucawkowy (preeklampsja, PE) jest to zespół objawów chorobowych pojawiający się podczas ciąży (z reguły po 20-tym tygodniu ciąży, chociaż opisywane są przypadki bardzo wczesnej postaci preeklampsji) lub w czasie porodu lub połogu na który składają się: wzrost ciśnienia skurczowego  $\geq 140$  mmHg lub rozkurczowego  $\geq 90$  mmHg mierzonego dwukrotnie w odstępach przynajmniej 6-cio godzinnych oraz pojawienie się białkomoczu  $\geq 300$  mg/dobę lub przynajmniej na 1+ w pojedynczym badaniu moczu (kryteria ACOG) lub 2+ w pojedynczym badaniu moczu (kryteria ISSHP).

W przypadku gdy nadciśnieniu tętniczemu indukowanemu ciążą nie towarzyszy białkomocz, to wystąpienie alternatywnie jednego z poniższych symptomów:

- Trombocytopenii – spadek liczby płytek poniżej 100 tys/ul (wg ACOG) lub poniżej 150 tys/ul (wg ISSHP),
- wzrostu enzymów wątrobowych dwukrotnie powyżej górnego zakresu referencyjnego ustalanego dla danego laboratorium diagnostycznego,
- niewydolności nerek definiowanej jako wzrost stężenia kreatyniny w surowicy kobiety powyżej 1,1 mg/dl (wg ACOG) lub powyżej 90  $\mu$ mol/l co odpowiada 1,02 mg/dl (wg ISSHP),
- obrzęków,
- zaburzeń neurologicznych,

również stanowi podstawę do rozpoznania zjawiska preeklampsji.<sup>14,15</sup>

Pomimo, iż zjawisko stanu przedrzucawkowego zostało opisane już w czasach Hipokratesa, jego etiologia nadal nie została w pełni wyjaśniona. Uważa się, że głównym podłożem rozwoju preeklampsji jest nieprawidłowa inwazja trofoblastu do tkanek macicznych na początkowym etapie ciąży, która prowadzi do hipoksji i wzmożonej apoptozy komórek trofoblastu oraz do nadmiernej produkcji przez komórki trofoblastu szeregu mediatorów w tym reaktywnych form tlenu, które pobudzają matczyny układ immunologiczny i prowadzą do ogólnoustrojowego stanu zapalnego.<sup>4,16</sup> W surowicy kobiet obserwuje się znaczący wzrost stężenia markerów zapalnych w tym czynnika martwicy nowotworów

typu alfa (z ang. *Tumor Necrosis Factor alpha*; TNF $\alpha$ ), Interleukiny 6 (IL-6) czy Interleukiny 1 (IL-1), których regulacja zależy m.in. od czynnika NF $\kappa$ B.<sup>17</sup> Czynniki matczyne m.in. występowanie cukrzycy (także indukowanej ciąży), otyłość, ciąża mnoga czy choroby o podłożu immunologicznym również stanowią istotny czynnik ryzyka rozwoju preeklampsji do niedawna wiązany z późną postacią PE pojawiającą się po 34 tygodniu ciąży.<sup>18</sup> Szereg badań rodzinnych wskazuje, iż preeklampsja ma również charakter dziedziczny, związany głównie z linią matczyną. Córki kobiet których ciąża była powikłana stanem przedzucawkowym mają zwiększone ryzyko wystąpienia preeklampsji w czasie ich własnej ciąży, podczas gdy częstość występowania stanu przedzucawkowego w ciąży z partnerem urodzonym z ciąży powikłanej preeklampsją jest równa ryzyku występowania preeklampsji w ogólnej populacji.<sup>1,19</sup> Niemniej jednak uważa się iż geny ojcowskie dziedziczone przez płód również stanowią czynnik predysponujący do wystąpienia preeklampsji.<sup>20</sup>

Każdy etap ciąży jest ściśle ewolucyjnie zaprogramowany zarówno pod względem zmian w budowie ciała kobiety jak również pod kątem hormonalnym i immunologicznymi. W swojej pracy przeglądowej „*The role of NF $\kappa$ B in the three stages of pregnancy - implantation, maintenance, and labour: a review article*”, omówiłam falowość zmian immunologicznych i adaptacyjnych matki i płodu zależnych od czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B (z ang. *Nuclear Factor kappa B*) jakie zachodzą w czasie trzech różnych etapów ciąży: implantacji, utrzymania ciąży i w czasie przygotowania organizmu kobiety do porodu. W pracy tej zostały również poruszone odstępstwa od fizjologicznej adaptacji organizmu matki pod kątem immunologicznym i związane z tym powikłania okresu ciążowego ze szczególnym uwzględnieniem wewnątrzmacicznego zaburzenia wzrastania płodu (IUGR) oraz zjawiska stanu przedzucawkowego. W oparciu o przegląd danych literaturowych dotyczących zarówno rozwoju człowieka jak i zwierząt laboratoryjnych wykazałam, iż stan nasilonej reakcji immunologicznej zależnej od czynnika NF $\kappa$ B jest niezbędny do otwarcia okienka implantacyjnego a także do prawidłowego przebiegu procesu implantacji. Ten nasilony stan odpowiedzi immunologicznej w miarę rozwoju ciąży powinien ulec wyciszeniu m.in. poprzez obniżoną aktywację czynnika NF $\kappa$ B, co prowadzi do przesunięcia równowagi w obrębie układu immunologicznego z odpowiedzi typu Th1 na korzyść Th2. U kobiet ze stanem przedzucawkowym to przesunięcie nigdy nie zachodzi a aktywacja czynnika NF $\kappa$ B jest ponad 10-krotnie zwiększona w łożyskach kobiet których ciąża przebiegała z preeklampsją.<sup>9</sup> Ponadto, szereg badań wskazuje iż nasilona aktywacja czynnika NF $\kappa$ B jest obecna w również w komórkach krwi obwodowej kobiet ze zdiagnozowanym stanem przedzucawkowym.<sup>21,22</sup> Niestety żadna z dostępnych prac nie opisuje na jakiej drodze (klasycznej, alternatywnej czy atypowej) zachodzi aktywacja czynnika NF $\kappa$ B zarówno w łożyskach jak i krwi kobiet których ciąża przebiega z preeklampsją. Poznanie tej ścieżki aktywacji czynnika NF $\kappa$ B mogłoby okazać się kluczowe dla poznania mechanizmu rozwoju zjawiska preeklampsji.

Celem pracy „*Finding NEMO in preeclampsia*” było sprawdzenie czy istnieje zależność pomiędzy ekspresją genu *NEMO* a wystąpieniem zjawiska preeklampsji. Gen *NEMO* znajduje się na chromosomie

Xq28 a produkt tego genu, białko NEMO (z ang. *NFκB Essential Modulator*) zwane również jako IKBKG lub  $IKK\gamma$ , jest niezbędne do aktywacji czynnika NFκB na drodze klasycznej. W prezentowanej pracy badałam nie tylko czy istnieje związek pomiędzy ekspresją genu *NEMO* a wystąpieniem zjawiska preeklampsji ale również sprawdzałam czy rozwój stanu przedzucawkowego może być związany z zaburzoną ekspresją jednego z trzech głównych transkryptów genu *NEMO* (1A, 1B czy 1C), których ekspresja jest regulowana przez różne promotory, co w konsekwencji prowadzi do powstawania produktów o różnej długości. Badanie zostało przeprowadzone w oparciu o materiał biologiczny: krew żylna, pępowinowa i łożyska, pochodzący od kobiet których ciąża była powikłana stanem przedzucawkowym lub przebiegała bez komplikacji. Do grupy badanej zakwalifikowałam 43 pacjentki ze zdiagnozowanym stanem przedzucawkowym, z czego u 19 pacjentek preeklampsja wystąpiła przed 34 tygodniem ciąży (wczesna postać preeklampsji) a u 24 pacjentek  $\geq 34$  tygodnia ciąży (późna postać preeklampsji). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 48 pacjentek. Pacjentki były rekrutowane z dwóch szpitali Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi oraz Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Badanie przeprowadzono za zgodą lokalnej Komisji Bioetyki ds. badań na ludziach działającej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi. Kryterium kwalifikującym pacjentki do grupy badanej było występowanie nadciśnienia ( $>140/90$  mmHg) indukowanego ciążą oraz obecność białka w moczu (przynajmniej 2+ w pojedynczym badaniu paskowym moczu); kryteria rozpoznania preeklampsji według ISSHP. W grupie kontrolnej znajdowały się pacjentki, których ciąża przebiegała bez komplikacji. Kryterium dyskwalifikującym pacjentki zarówno z grupy badanej jak i kontrolnej były: ciąża mnoga, stwierdzenie przewlekłego nadciśnienia, cukrzyca (również indukowana ciążą), stwierdzenie choroby o podłożu autoimmunologicznym, BMI matki  $>30$  kg/m<sup>2</sup>, wady genetyczne u płodu. W przypadku wieloródek występowanie nadciśnienia indukowanego ciążą w poprzedniej ciąży dyskwalifikowało pacjentkę z grupy kontrolnej. W obu grupach krew żylna maczyna była pobierana od pacjentek 1-2 godziny przed porodem (poród odbywał się drogą cesarskiego cięcia), natomiast fragment popłodu 2cmx2cm w odległości około 5 cm od ujścia pępowiny wraz z krwią pępowinową był pobierany zaraz po urodzeniu łożyska. Wskazaniem do cesarskiego cięcia w grupie kontrolnej były m.in.: wskazania okulistyczne, ortopedyczne, nieprawidłowe położenie płodu lub ryzyko rozejścia się blizny poporodowej powstałej na skutek cesarskiego cięcia przeprowadzonego w poprzedniej ciąży.

Badanie wykazało istotnie statystycznie wyższą ekspresję całkowitą genu *NEMO* (Total NEMO) we krwi kobiet których ciąża przebiegała z preeklampsją. Co ciekawe zależność ta dotyczyła również każdego z badanych transkryptów genu *NEMO* (1A, 1B, 1C). W przypadku dzieci urodzonych z ciąży powikłanej preeklampsją jedynie ekspresja genu *NEMO* z promotora 1A okazała się istotnie statystycznie wyższa w stosunku do dzieci z grupy kontrolnej. Ponadto, w grupie badanej zaobserwowano istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy wzrostem całkowitej ekspresji genu *NEMO* (Total NEMO) we krwi matki a wszystkim jej transkryptami (1A, 1B, 1C) oraz wszystkimi badanymi transkryptami u jej dziecka (Total NEMO, 1A, 1B i 1C). Zależność ta nie była odnotowana

w grupie kontrolnej. Wyniki badań sugerują, iż aktywacja czynnika NFκB we krwi kobiet i ich dzieci, których ciąża jest powikłana stanem przedrzucawkowym, może zachodzić na drodze klasycznej. Całkowitym zaskoczeniem były wyniki analizy ekspresji genu *NEMO* w łożyskach kobiet których ciąża przebiegała ze stanem przedrzucawkowym. Zaobserwowałam, iż ekspresja genu *NEMO* niezależnie od regionu promotorowego była istotnie statystycznie niższa w łożyskach pochodzących od kobiet których ciąża przebiegała z preeklampsją. Ponadto wykazałam, iż obniżenie łożyskowej ekspresji genu *NEMO* w stosunku do kontroli jest przede wszystkim związane z rozwojem późnej postaci zjawiska preeklampsji. Dodatkowo, brak statystycznie istotnych różnic w ekspresji genu *NEMO* pomiędzy wczesną postacią preeklampsji a kontrolą sugeruje, iż te dwie postaci preeklampsji (późna i wczesna) mogą mieć odmienne podłoże molekularne, co jest podkreślane w literaturze.<sup>23</sup>

Ponadto, wyniki niniejszej pracy pozwoliły mi wysunąć hipotezę, iż regulacja aktywacji czynnika NFκB w łożyskach kobiet ze stanem przedrzucawkowym najprawdopodobniej przebiega na drodze innej niż klasyczna. Ponieważ obserwowane zaburzenia na etapie ekspresji genu *IKBKG* mogą, ale nie muszą wpływać na stężenie białka *NEMO* w komórce lub mogą być wynikiem nieprawidłowości sekwencji nukleotydowej genu *NEMO*, potrzebne było poprowadzenie dalszych badań na pozostałych poziomach molekularnych (białkowym i kwasu deoksyrybonukleinowego).

W pracy *"Double hit of NEMO gene in preeclampsia"* kontynuowałam badania nad ekspresją genu *NEMO* we krwi żyłnej, pępowinowej i łożyskach w oparciu o liczniejszą populację pacjentek (72 pacjentki z rozpoznaniem stanem przedrzucawkowym i 79 kontrole) niż ta która była prezentowana w pracy *"Finding NEMO in preeclampsia"* oraz dokonałam sekwencjonowania części egzomowych genu *NEMO* w oparciu o DNA kobiet ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym.

Wyniki analiz całkowitej ekspresji genu *NEMO* (Total *NEMO*) i jego poszczególnych transkryptów (1A, 1B i 1C) w grupie 151 pacjentek potwierdziły obserwacje uzyskane w poprzedniej pracy (*"Finding NEMO in preeclampsia"*) w odniesieniu do analiz na materiale łożyskowym i krwi żyłnej matczynej oraz pozwoliły na dodatkowe spostrzeżenie dotyczące nieprawidłowości ekspresji genu *NEMO* we krwi pępowinowej dzieci urodzonych z ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym. Ekspresja poszczególnych transkryptów genu *NEMO* (1A, 1B i 1C) była znacząco statystycznie wyższa we krwi pępowinowej dzieci urodzonych z ciąży powikłanej preeklampsją niż w populacji kontrolnej. Jedynie całkowita ekspresja genu *NEMO* (Total *NEMO*) nie różniła się znacząco w stosunku do grupy kontrolnej. Może to sugerować, iż we krwi pępowinowej powstaje jakiś dodatkowy transkrypt genu *NEMO* którego ekspresja jest znamienne obniżona w populacji dzieci urodzonych z ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym w stosunku do kontroli, co w konsekwencji prowadzi do wyrównania całkowitej ekspresji genu *NEMO* (Total *NEMO*).

Niezależnie od badań związanych z analizą ekspresji genu *NEMO*, które były kontynuacją eksperymentów prezentowanych w pracy *"Finding NEMO in preeclampsia"*, głównym celem pracy *"Double hit of NEMO gene in preeclampsia"* było zsekwencjonowanie części egzomowych genu *NEMO* u kobiet ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym. Sekwencję uzyskanych odczytów

porównywałam z dostępną w bazach danych ENSEMBL GRCh38.p5 i Human Genome Browser GRCh38/hg38. Wyniki sekwencjonowania pozwoliły mi na wyodrębnienie dwóch wariantów nukleotydowych zlokalizowanych w regionie 3'UTR genu *NEMO*. W kolejnym etapie obecność obu wariantów: IKBKG:c.\*368C>A i IKBKG:c.\*402C>T była sprawdzana w materiale pochodzącym od dzieci urodzonych z ciąży powikłanej preeklampsją oraz od matek i ich dzieci z grupy kontrolnej. Analizy statystyczne uzyskanych wyników pozwoliły na stwierdzenie, iż jednocześnie homozygotyczne nosicielstwo wariantu IKBKG:c.\*402C>T przez matkę (homozygota TT) i jej córkę (homozygota TT) lub jej syna (hemizygota T) jest związane z wyższą predyspozycją do wystąpienia zjawiska preeklampsji (OR = 2.59, 95% CI 1.20 - 5.57; p<0.05). Wyniki tej analizy wydają się być spójne z ogólnym poglądem, iż preeklampsja ma podłoże dziedziczne oraz że dziedziczenie zjawiska preeklampsji przebiega po linii matczynej. Można również przypuszczać, iż geny ojcowskie (w przypadku płodów płci żeńskiej) również przyczyniają się do wzrostu ryzyka wystąpienia preeklampsji.

Wyniki analiz *in silico* przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy pozwoliły na bioinformatyczne wyjaśnienie mechanizmu działania wytypowanego w ramach pracy doświadczalnej wariantu IKBKG:c.\*402C>T. Analiza stabilności struktury mRNA w oparciu o bezpłatne narzędzie RNAfold Online tool (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), wykazała iż obecność allelu T w pozycji 402 regionu 3'UTR genu *NEMO* wpływa na zwiększenie stabilności cząsteczki mRNA (minimalna wolna energia, MFE, była niższa w przypadku transkryptów 1B i 1C które w pozycji 402 regionu 3'UTR zawierały tyminę). Ponadto, kolejna analiza *in silico* z wykorzystaniem dwóch niezależnych pakietów RegRNA (<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/detection.html>) i miRNA\_targets ([http://mamsap.it.deakin.edu.au/~amitkuma/mirna\\_targetsnew/sequence.html](http://mamsap.it.deakin.edu.au/~amitkuma/mirna_targetsnew/sequence.html)) wykazała, iż obecność tyminy może wpływać na stabilizację cząsteczki mRNA poprzez regulację przyłączania się do niej cząsteczek microRNA: miR-3960 i miR-5090 oraz miR-503, miR-885-3p, miR-1266 i miR-4519. Niezależnie od analiz bioinformatycznych, wykazałam iż u nosicieli wariantu IKBKG:c.\*402C>T obserwuje się wyższą ekspresję genu *NEMO* w komórkach krwi obwodowej i pępowinowej. Ekspresja genu *NEMO* oraz jego poszczególnych transkryptów 1A, 1B i 1C była wyższa w populacji pacjentek i ich dzieci u których zdiagnozowano układ matka homozygota TT/ córka homozygota TT lub matka homozygota TT/ syn hemizygota T, ale tylko dla wariantów: 1A (transkrypt pochodzący od matki) oraz Total NEMO, 1A i 1C (transkrypty analizowane we krwi pępowinowej) wyniki osiągnęły istotność statystyczną (p<0.05).

Uzyskane wyniki jednak w żaden sposób nie pokazały powiązania pomiędzy nosicielstwem układu homozygotycznego przez matkę i córkę (TT/TT) lub homo/hemizygotycznego (TT/T) przez matkę i jej syna a obniżeniem ekspresji genu *NEMO* w łożyskach. Być może wykryty wariant nukleotydowy ma tylko swoje przełożenie na ekspresję genu *NEMO* w komórkach krwi natomiast nie wywiera istotnego znaczenia na regulację ekspresji genu *NEMO* w komórkach łożyska. Może to sugerować iż preeklampsja ma podłoże wielogenowe a wariant IKBKG:c.\*402C>T może w pewien sposób modulować predyspozycje do wystąpienia preeklampsji.

Z tego względu kolejnym etapem mojej pracy było sprawdzenie czy spadek ekspresji genu NEMO w łożyskach pochodzących z ciąży powikłanych preeklampsją ma faktycznie swoje odzwierciedlenie w stężeniu białka NEMO. Dodatkowo chciałam się dowiedzieć w jakich strukturach kosmków łożyskowych znajduje się białko NEMO oraz czy jego stężenie różni się pomiędzy kompartmentem cytoplazmatycznym a jądrowym w obrębie komórek łożyska. Wyniki badań na poziomie białkowym w oparciu o materiał łożyskowy zostały przedstawione w kolejnej pracy „*Placental expression of NEMO protein in normal pregnancy and preeclampsia*”. Analizie zostało poddanych 185 łożysk (97 pochodzących z ciąży powikłanych preeklampsją i 88 kontrolnych). Wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy do oznaczania białka NEMO w oparciu o technikę ELISA oznaczyłam stężenie białka NEMO w całkowitych frakcjach, frakcjach cytoplazmatycznych i jądrowych wyizolowanych z łożysk. Czystość uzyskiwanych frakcji cytoplazmatycznych i jądrowych została potwierdzona techniką Western blot z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białku cytoplazmatycznemu - dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) i jądrowemu Laminie A/C. Przeprowadzone analizy statystyczne pozwoliły mi na wykazanie iż stężenie białka NEMO (całkowita frakcja łożyskowa) jest istotnie obniżone w łożyskach kobiet których ciąża przebiegała z preeklampsją. Dodatkowo wykazałam, iż frakcja cytoplazmatyczna pochodząca z łożysk nie różni się istotnie pomiędzy grupą badaną a kontrolną pod względem stężenia białka NEMO natomiast istotne różnice w stężeniach białka NEMO zostały odnotowane we frakcji jądrowej. Wyniki badań uzyskane w teście ELISA zostały potwierdzone drugim niezależnym badaniem, techniką półilościową - Western blot z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białku NEMO. Badanie Western blot wykonano w oparciu o spulowane w utworzonych grupach (kontrolna, wczesna PE, późna PE) frakcje całkowite, cytoplazmatyczne i jądrowe. Niezależnie od wybranej metody uzyskane wyniki na poziomie białkowym są spójne z wynikami uzyskanymi na poziomie mRNA prezentowanymi w poprzednich pracach w odniesieniu do postaci późnej i wczesnej preeklampsji. Zarówno frakcja całkowita oraz jądrowa były znacząco obniżone w przypadku łożysk pochodzących z ciąży powikłanych późną postacią preeklampsji. Dodatkowo nie zaobserwowano różnic w stężeniach białka NEMO pomiędzy wczesną postacią preeklampsji a kontrolą, co może sugerować odmienną etologię rozwoju wczesnej i późnej postaci stanu przedrzucawkowego.

Dodatkowo w ramach pracy przeprowadziłam badanie immunohistochemiczne w oparciu o 15 losowo wybranych łożysk (5 łożysk kontrolnych, 5 pochodzących z ciąży powikłanej późną i 5 pochodzących z ciąży powikłanej wczesną postacią preeklampsji). Badanie immunohistochemiczne potwierdziło obniżenie stężenia białko NEMO w łożyskach pochodzących z ciąży powikłanych preeklampsją oraz dodatkowo pozwoliło ustalić, iż niezależnie od losów ciąży (powikłana bądź niepowikłana stanem przedrzucawkowym) białko NEMO jest zlokalizowane głównie w warstwie syncytiotrofoblastu kosmków łożyskowych, czyli w warstwie która według danych literaturowych cechuje się najwyższą aktywnością czynnika NFκB.

Wyniki uzyskane w ramach badania pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków: (1) nasiloną aktywacją czynnika NFκB w łożyskach kobiet których ciąża przebiega z preeklampsją najprawdopodobniej odbywa się na innej ścieżce niż klasyczna ponieważ stężenie białka NEMO w grupie badanej i kontrolnej nie różniło się znacząco w przestrzeni cytoplazmatycznej, (2) obniżenie białka NEMO z kompartmentu jądrowym wyekstrahowanym z łożysk pochodzących z ciąż powikłanych preeklampsją wskazuje iż białko NEMO odgrywa znaczącą funkcję w prawidłowym funkcjonowaniu łożyska, przy czym funkcja ta nie jest jedynie związana z aktywacją czynnika NFκB. Przegląd danych literaturowych pozwolił na zrozumienie dualistycznej roli białka NEMO, które w cytoplazmie jest niezbędne do aktywacji czynnika NFκB, natomiast w jądrze hamuje transkrypcyjną zdolność aktywnego czynnika NFκB do inicjacji ekspresji szeregu genów w tym genów odpowiedzialnych za nasiloną odpowiedź immunologiczną. Ponadto, białko NEMO niezależnie od czynnika NFκB ma zdolność do oddziaływania z innymi białkami, m.in. obecnymi w przestrzeni jądrowej np. białkiem c-Myc, wpływając tym samym na regulację procesów związanych ze śmiercią komórkową oraz tworzeniem i rozbudową naczyń. Obniżenie stężenia białka NEMO w łożyskach ciąż powikłanych stanem przedzruciawkowym może zatem tłumaczyć, obserwowaną w licznych badaniach, (1) nasiloną aktywność czynnika NFκB – brak sprawnego mechanizmu jądrowego zależnego od białka NEMO hamującego aktywność transkrypcyjną czynnika NFκB, (2) nasiloną apoptozę, nekrozę, nekroptozę komórek łożyska oraz zaburzenia procesu angiogenezy – niedostateczne stężenie białka NEMO zaburza jego interakcje z białkami kluczowymi dla szlaków komórkowych regulujących w/w procesy.

**Za najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z powyżej opisanych badań uważam:**

1. Jako pierwsza wykazałam istnienie zależności pomiędzy NEMO, kluczowym aktywatorem czynnika transkrypcyjnego NFκB, a zjawiskiem wystąpienia preeklampsji.
2. Udokumentowałam, iż ekspresja genu *NEMO* oraz jego poszczególnych transkryptów (1A, 1B, 1C) jest znacząco podniesiona w komórkach krwi obwodowej kobiet i krwi pępowinowej ich dzieci które zostały urodzone z ciążą powikłaną preeklampsją.
3. Wykazałam, iż w łożyskach kobiet, których ciąża przebiega z preeklampsją, dochodzi do spadku ekspresji genu *NEMO*. Ponadto zaobserwowałam, iż spadek stężenia białka NEMO w całkowitych izolatach komórek łożyska oraz ich frakcji jądrowej jest charakterystyczny dla ciąż powikłanych preeklampsją. Z kolei stężenie białka NEMO we frakcji cytoplazmatycznej komórek łożyska nie różni się istotnie pomiędzy grupą badaną a kontrolną, sugerując tym samym, że nasiloną aktywacją czynnika NFκB w komórkach łożyska pochodzącego z ciąż powikłanych preeklampsją może być wynikiem innej niż klasyczna ścieżki aktywacji. Białko NEMO odgrywa kluczową rolę w aktywacji czynnika NFκB na ścieżce klasycznej zachodzącej w przestrzeni cytoplazmatycznej komórki.

4. Wykazałam w oparciu o badania immunohistochemiczne, że głównym miejscem ekspresji białka NEMO w łożyskach jest warstwa syncytiotrofoblastu.
5. Wykazałam, potwierdzając spostrzeżenia innych naukowców, iż mechanizm rozwoju preeklampsji o wczesnym i późnym przebiegu może mieć inne podłoże molekularne; ekspresja genu *NEMO* oraz białka NEMO w łożyskach kobiet z późną postacią preeklampsją różniła się istotnie w stosunku do kontroli, z kolei nie obserwowałam istotnie statystycznych różnic pomiędzy wczesną postacią preeklampsji a kontrolą.
6. Udokumentowałam, iż rozwój zjawiska preeklampsji może być związany z jednoczesnym homozygotycznym lub homo/hemizygotycznym nosicielstwem wariantu IKBKG:c.\*402C>T przez matkę i płód; układ matka TT/córka TT lub matka TT/syn T. Obserwacje te mogą potwierdzać teorię iż: (1) preeklampsja ma charakter dziedziczny, (2) preeklampsja jest dziedziczona po linii matczynej; płód męski dziedziczy chromosom X z wariantem IKBKG:c.\*402C>T od matki, (3) geny ojcowskie dziedziczone przez płód również mogą przyczyniać się do rozwoju zjawiska preeklampsji; córka dziedziczy jeden chromosom X z wariantem IKBKG:c.\*402C>T od ojca a drugi od matki uzyskując tym samym genotyp TT (IKBKG:c.\*402TT) predysponujący do wystąpienia preeklampsji.

## **Ad. 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.**

### ***5.1. Dane bibliometryczne***

- Sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania: 64.903  
w tym IF=16.565 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne
- Sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania w przypadku prac opublikowanych poza cyklem prac umieszczonych w dysertacji: 49.086  
w tym IF=5.624 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne
- Sumaryczny *impact factor* zgodnie z rokiem opublikowania dla prac umieszczonych w dysertacji: 15.817  
w tym IF=10.941 przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne  
a IF=4.876 przypada na pierwszoautorską pracę przeglądową

Łącznie **234** cytowań, indeks Hirscha wynosi 7.

(Źródło: ISI Web of Science)

Łącznie **246** cytowań, indeks Hirscha wynosi 7.

(Źródło: Scopus)

### ***Tematyka prac badawczych:***

#### ***5.2. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora***

Jeszcze w czasie studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi odbywałam staż w formie wolontariatu w Laboratorium diagnostycznym Szpitala Zakonu Bonifratrów św. Jana Bożego w Łodzi. Po ukończeniu studiów w 2001 roku zostałam zatrudniona w w/w laboratorium, z którym byłam związana stosunkiem o pracę do końca września 2005 roku. Czas ten nie był związany z działalnością naukową jednakże pozwolił mi na uzyskanie tytułu diagnosty laboratoryjnego, uzyskanie uprawnień serologicznych oraz pogłębianie wiedzy klinicznej w aspekcie zmian parametrów biochemicznych, hematologicznych i hormonalnych. Praca w laboratorium pozwoliła mi również na zapoznanie się z walidacją i kontrolą jakości w laboratorium diagnostycznym (wiedzę ta wykorzystuję w chwili obecnej do kontroli badań naukowych) oraz przygotowaniem dokumentacji medycznej w zakresie normy ISO 17025 i ISO 15189.

Dopiero powrót na uczelnię, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, w charakterze doktoranta Dziennego Studium Doktoranckiego, w październiku 2005 roku pozwolił mi na rozwijanie kariery naukowej. Jako doktorant prowadziłam badania dotyczące genetycznego podłoża wystąpienia zawału mięśnia sercowego u pacjentów przed 45 rokiem życia w populacji polskiej. Prace badawcze pozwoliły mi na

przygotowanie dwóch publikacji naukowych które zostały przyjęte do druku i stanowiły podstawę do obrony doktoratu. Prace te ukazały się drukiem krótko po mojej obronie doktoratu.

1. **Sakowicz A**, Fendler W, Lelonek M, Pietrucha T, Genetic variability and the risk of myocardial infarction in Polish under 45 years of ages. Archives of Medical Science 2010;6(2):160-167
2. **Sakowicz A**, Fendler W, Lelonek M, Gluba A, Pietrucha T, Two polymorphisms of the FVII gene and their impact on the risk of myocardial infarction in the Poles under 45 years of age Molecular Biology 2010,44(2):202-207

W trzy lata po obronie doktoratu ukazał się jeszcze jeden manuskrypt, który był również wynikiem prac prowadzonych w ramach doktoratu:

3. **Sakowicz A**, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, Pietrucha T Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age Biochemical Genetics 2013;51:230-242

W powyższych manuskryptach prezentowałam wyniki badań prowadzonych w czasie studiów doktoranckich wykazując związek pomiędzy nosicielstwem zmienności polimorficznych zlokalizowanych w genach związanych z rozwojem blaszki miażdżycowej oraz procesami krzepnięcia i fibrylizacji a wystąpieniem zawału mięśnia sercowego u pacjentów populacji polskiej. Ponieważ przesłanki literaturowe wskazywały iż zawał mięśnia sercowego ma podłoże dziedziczne (badania na bliźniętach) oraz że w populacji młodych pacjentów znaczenie podłoża genetycznego przeważa nad czynnikami środowiskowymi, badania swoje prowadziłam w oparciu o populację pacjentów u których zawał wystąpił przed 45 rokiem życia. Pacjenci ci przed wystąpieniem ostrego incydentu wieńcowego nie mieli zdiagnozowanych jakichkolwiek czynników lub chorób współtowarzyszących, które mogłyby wskazywać na potencjalne ryzyko wystąpienia zawału serca w tak młodym wieku (z wyjątkiem nadciśnienia). Grupa kontrolna została utworzona z ochotników, którzy po przekroczeniu 45 roku życia nie manifestowali żadnych objawów choroby niedokrwiennej mięśnia sercowego oraz u których nigdy nie wystąpiły symptomy ostrego incydentu wieńcowego. Badaniu zostało poddanych 272 pacjentów zakwalifikowanych do grupy badanej i 141 osób stanowiących grupę kontrolną. W oparciu o dane literaturowe, które podają, iż prawie 90% wszystkich przypadków ostrego incydentu wieńcowego jest spowodowane nagłym pęknięciem blaszki miażdżycowej i wytworzeniem się zakrzepu powodującego okluzję naczyń, w swoich pracach głównie skupiłam się na wytypowaniu genów, których produkty białkowe są związane z:

- rozwojem stanu zapalnego (gen kodujący reduktazę metylenotetrahydrofolianu – MTHFR, polimorfizm C677T; gen kodujący cząsteczki receptora utlenionych LDL podobnego do lektyny – LOX1, polimorfizm K167N)
- zaburzeniami funkcji śródbłonna naczyń (gen kodujący Selektynę E – polimorfizm Ser128Arg; gen kodujący cząsteczkę adhezji międzykomórkowej typu 1 – ICAM1, polimorfizm K469E; gen kodujący cząsteczkę adhezji płytkowo-śródbłonkowej – PECAM1, polimorfizm L125V i polimorfizm G1688A),

- nadmierną degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej (gen kodujący metaloproteinazę typu 1 – MMP1, polimorfizm -1607 1G/2G; gen kodujący metaloproteinazę typ 3 – MMP3, polimorfizm -16125A/6A; gen kodujący metaloproteinazę typu 9 – MMP9, polimorfizm -1562C/T)
- zaburzeniami koagulacyjnymi (gen kodujący czynnik tkankowy – TF, polimorfizm -603 A/G; gen kodujący inhibitor tkankowego aktywatora fibrynogenu – PAI, polimorfizm -6754G/5G; gen kodujący fibrynogen, polimorfizm -146C/T i polimorfizm -455G/A; gen kodujący czynnik VII krzepnięcia krwi – FVII, polimorfizm -323A1/A2, polimorfizm R353Q, polimorfizm IVS7 oraz gen kodujący czynnik V krzepnięcia krwi – FV, polimorfizm 1691G/A).

W pierwszej prezentowanej pracy wykazałam iż polimorfizm –1607 1G/2G zlokalizowany w obrębie genu dla *MMP1* jest związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zawału mięśnia sercowego (OR=5.68, 95% CI 2.60-12.36). Wyniki kolejnej pracy pozwoliły mi wykazać, iż nosiciele allele A2 genu kodującego czynnik VII krzepnięcia krwi (polimorfizm zlokalizowany w regionie -323 A1/A2) mają obniżone ryzyko wystąpienia zawału mięśnia sercowego przed 45 rokiem życia aniżeli homozygoty A1/A1 (OR=0.40, 95% CI=0.20-0.80). Z kolei w trzeciej z prezentowanych prac wskazałam, iż osoby które w genie *PECAMI* w pozycji 373 regionu kodującego zawierają guaninę (polimorfizm C373G zwany również polimorfizmem Leu125Val) zamiast cytozyny mają zwiększoną predyspozycję do wystąpienia zawału mięśnia sercowego w stosunku do homozygot CC (OR=1.571, 95% CI=1.19-2.08). Dodatkowo moje badania wykazały, iż zmienności polimorficzne C677T genu *MTHFR* oraz -16125A/6A genu *MMP3* są związane z wyższym ryzykiem wystąpienia 75% stenozy w naczyniach wieńcowych.

Ponadto, w prezentowanych pracach potwierdziłam obserwacje innych badaczy, iż płeć męska, nadciśnienie, hipercholesterolemia oraz dodatni wywiad rodzinny są istotnymi czynnikami ryzyka wystąpienia zawału mięśnia sercowego u pacjentów przed 45 rokiem życia.

### **5.3. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora**

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania badawcze można przypisać do następujących obszarów tematycznych:

#### **Użyteczność markerów biochemicznych, genetycznych a także Reynolds Risk Score w ocenie ryzyka chorób układu krążenia**

Powyższa tematyka badawcza została upowszechniona przez 13 artykułów oryginalnych. Artykuły [1, 3-5 oraz 13] w głównej mierze związane były z oceną diagnostyczną i rokowniczą rozpuszczalnej formy białka ST2 (solubleST2, sST2) jako nowego markera niewydolności mięśnia sercowego (HF) oraz stenozy aortalnej. Artykuły [6-7] dotyczyły związku sześciu zmienności polimorficznych oraz 9 biomarkerów biochemicznych o dotąd nieustalonej wartości diagnostycznej z niewydolnością mięśnia sercowego o różnej etiologii. Z kolei strategia ustalania wartości diagnostycznej markerów

genetycznych oraz Reynolds Risk Score w ocenie ryzyka wystąpienia nadciśnienia lub rozwoju choroby wieńcowej związanej z rozwojem blaszki miażdżycowej oraz strategii farmakologicznych była oceniana w pracach [8-12].

Białko ST2 występuje w organizmie w postaci czterech izoform: długiej (L), zakotwiczonej w błonie komórkowej tzw. forma przezbłonowa ST2L, rozpuszczalnej (soluble) niezwiązanej z komórką (sST2) oraz izoform ST2V i ST2LV. Każda z tych izoform jest swoistym receptorem dla interleukiny-33 (IL-33), która uwalniana jest m.in. z komórek śródbłonka i fibroblastów w czasie rozciągania kardiomiocytów. Przyłączenie IL-33 przez formę przezbłonową ST2L wpływa korzystnie na mięsień sercowy przeciwdziałając jego włóknieniu i postępującemu przerostowi. Z kolei rozpuszczalna forma białka solubleST2 ma za zadanie przechwycenie IL-33 zanim zwiąże się ona z formą przezbłonową, hamując tym samym tworzenie się kardioprotekcyjnego kompleksu ST2L/IL-33.

W badaniu [1] badano związek pomiędzy stężeniem rozpuszczalnej formy białka sST2 a parametrami klinicznymi, biochemicznymi, elektro i echokardiograficznymi oraz angiograficznymi w populacji pacjentów z niewydolnością mięśnia sercowego (klasa NYHA I-III z wyłączeniem klasy IV) oraz zakresem wyrzutowej lewej komory serca mieszczącym się w przedziale 13-44%. W pracy wykazano, iż istnieje dodatnia korelacja pomiędzy dwoma niezależnymi markerami niewydolności mięśnia sercowego (HF): białkiem sST2 oraz peptydem natriuretycznym NT-proBNP ( $R=0.34$ ,  $p<0.05$ ). Co ciekawe, zaobserwowaliśmy również, iż istnieje silne powiązanie pomiędzy stężeniem sST2 we krwi pacjentów a liczbą naczyń wieńcowych objętych procesem miażdżycowym oraz stężeniem markera NT-proBNP; im wyższe stężenie białka sST2 jest tym mniejsza liczba naczyń wieńcowych była objęta procesem miażdżycowym przy jednoczesnym wyższym stężeniu NT-proBNP. Prace nad rozpuszczalną postacią białka ST2 były kontynuowane, aby ustalić wartość prognostyczną tego markera dla pogorszenia się stanu klinicznego pacjenta z HF w ciągu roku od hospitalizacji.

W badaniu „*Single sST2 protein measurement predicts adverse outcomes at 1-year follow-up in patients with chronic heart failure*” opartym o populację 145 pacjentów z objawową przewlekłą niewydolnością mięśnia sercowego (CHF) u których frakcja wyrzutowa serca wynosiła  $<30\%$ , wykazano użyteczność informacji jaką niosą za sobą dwa niezależne markery niewydolności mięśnia sercowego: sST2 i NT-proBNP w krótkoterminowym rokowaniu pogorszenia się stanu pacjenta ( $HR=3.77$ ,  $95\% CI=1.55-9.18$ ,  $p=0.003$  i  $HR=2.043$ ,  $95\% CI=1.088-3.837$ ,  $p=0.026$ , odpowiednio). Dodatkowo ustaliliśmy, iż jednoczesny wzrost stężenia biomarkerów powyżej punktów odcięcia: sST2 $>0.296$  ng/ml i NT-proBNP $>2664$  pg/ml w trakcie pierwszej hospitalizacji podnosi ponad 4 krotnie ryzyko pogorszenia się w ciągu roku stanu klinicznego pacjenta definiowanego jako: śmierć z powodu chorób sercowo-naczyniowych, powtórna hospitalizacja z powodu zaostrzenia CHF, konieczność zwiększenia dawki stosowanych u pacjenta leków o działaniu diuretycznym albo pogorszenie się stanu klinicznego pacjenta według skali NYHA.

W kolejnych dwóch pracach [4,5] również badaliśmy użyteczną wartość białka sST2 jako niezależnego markera niewydolności mięśnia sercowego w połączeniu z dodatkowymi 58 parametrami użytecznymi

w diagnostyce CHF w aspekcie rokowania pogorszenia się stanu klinicznego w ciągu roku od hospitalizacji. Badania te były przeprowadzane na grupie 167 pacjentów z przewlekłą chorobą niewydolności mięśnia sercowego (CHF), u których frakcja wyrzutowa lewej komory serca wynosiła  $\leq 45\%$ . W pracach tych potwierdzono wyniki uzyskane na mniejszej populacji pacjentów z CHF i frakcją wyrzutową  $< 30\%$ , iż stężenie białka sST2 może być niezależnym markerem rokowniczym pogorszenia się w ciągu roku stanu klinicznego pacjenta w rozumieniu: ponownej hospitalizacji z powodu zaostrzenia choroby niedokrwiennej serca, konieczności zwiększenia dawki leków o działaniu diuretycznym, przyporządkowania ciężkości objawów u pacjenta do kolejnej klasy wg skali NYHA czy śmierci, jednak tym razem wartość odcięcia dla sST2 została oszacowana na 0.33 ng/ml. Różnica w punktach odcięcia dla sST2 pomiędzy prezentowanymi pracami może wynikać z różnych kryteriów doboru pacjentów do obu badań pod względem frakcji wyrzutowej ( $< 30\%$  vs  $< 45\%$ ). W badaniach [4,5] również oszacowaliśmy, iż wyższe stężenie białka sST2 mierzone w czasie hospitalizacji wiąże się ze spadkiem prawdopodobieństwa przeżycia pacjenta z 95% do 65%. Ponadto wykazaliśmy iż: wzrost stężenia glukozy mierzonej na czczo powyżej 5.9 mmol/l również może być dobrym markerem rokowniczym pogorszenia się stanu pacjenta w ciągu roku od hospitalizacji. Pokazaliśmy również, że algorytm uwzględniający wyniki stężenia sST2 i glukozy powyżej przyjętych punktów odcięcia poprawia negatywną wartość predykcijną obu testów z odpowiednio: 68.6% dla sST2 i 70.9% dla glukozy do 88.7% dla glukozy+sST2.

Pomimo tego, iż rozpuszczalna forma białka ST2 okazała się bardzo dobrym markerem diagnostycznym oraz prognostycznym w ocenie ryzyka pogorszenia się stanu pacjenta w ciągu roku od hospitalizacji nie udało się wykazać użyteczności tego parametru w ocenie zaawansowania stenozы aortalnej u pacjentów z zachowaną funkcją skurczową lewej komory serca. W badaniu [13] wykazano słabą korelację pomiędzy sST2, peptydem natiuretycznym NT-proBNP a parametrami oceniającymi stopień zaawansowania stenozы aortalnej: powierzchnią otwarcia zastawki aortalnej (z ang. aortic valve area, AVA), średnim gradientem ciśnień (z ang. Mean pressure gradient, MPG) oraz szczytową prędkością przepływu przez zastawkę aorty (z ang. Peak aortic velocity).

Z kolei użyteczność dziewięciu potencjalnych markerów biochemicznych i sześciu markerów genetycznych w populacji pacjentów z niewydolnością mięśnia sercowego o różnej etiologii została omówiona w publikacjach [6-7]. W pracy "*Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies*" grupa 110 pacjentów z rozpoznaną chorobą niewydolności mięśnia sercowego została podzielona na podgrupy pod względem różnej etiologii: grupę pierwszą HFpEF (N=51) utworzono z pacjentów u których nadciśnienie było czynnikiem sprawczym niewydolności mięśnia sercowego przebiegającego z zachowaną frakcją wyrzutową serca ( $EF \geq 50\%$ ), grupa druga HFrEF-ICM składała się z 32 pacjentów u których HF z frakcją wyrzutową lewej komory  $< 50\%$  rozwinęła się w wyniku choroby niedokrwiennej serca natomiast w trzeciej grupie HFrEF-DCM (N=27) podłożem niewydolności mięśnia sercowego przebiegającego z obniżoną frakcją wyrzutową lewej komory serca ( $EF < 50\%$ ) była kardiomiopatia rozstrzeniowa. W wymienionych grupach ustalano

użyteczność markerów biochemicznych: NT-proBNP, kardiotropiny-1 (CT-1), cystatyny C (CysC), czynnika martwicy nowotworów typu alfa (TNF- $\alpha$ ), N-końcowego propeptydu kolagenu typu III (PIIINP), syndekanu-4 (Syn4), białka podobnego do receptora dla interleukiny-1 (IIIRL1), transformującego czynnika wzrostu typu beta (TGF- $\beta$ ), lipokaliny- 2 (LCN2) oraz sześciu zmienności polimorficznych: polimorfizmu -174G/C genu *IL-6* (rs1800795), polimorfizmu -1260C/A genu *CYP27B1* (rs10877012), polimorfizmu -786T/C genu *NOS3* (rs2070744), polimorfizmu Arg25Pro genu *TGF- $\beta$*  (rs1800471), polimorfizmu -608G/A genu *TNF- $\alpha$*  (rs1800629) oraz polimorfizmu Pro12Ala genu *PPAR $\gamma$*  (rs18012) do różnicowania pacjentów z niewydolnością mięśnia sercowego o różnej etiologii. Badanie wykazało iż populacja HFpEF miała wyższe stężenie TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$  niż grupa HFrfEF-DCM ( $p < 0.01$ ). Stężenie TGF- $\beta$  było również znamienne wyższe w populacji pacjentów z zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory w stosunku do tych, u których choroba rozwinęła się na skutek niedokrwienia mięśnia sercowego (HFrfEF-ICM). Stężenia CT-1 oraz Syn4 były podwyższone u pacjentów HFrfEF-DCM w stosunku do pozostałych dwóch grup, co sugeruje udział tych dwóch czynników w etiologii niewydolności mięśnia sercowego związanej z kardiomiopatią rozstrzeniową. Dodatkowo analiza wieloczynnikowa wykazała, iż dwa niezależne markery biochemiczne: TGF- $\beta$  i Syn4 pozwalają jednocześnie na różnicowanie pacjentów z niewydolnością mięśnia sercowego, która rozwinęła się w wyniku kardiomiopatii od pacjentów z HF i zachowaną frakcją wyrzutową serca oraz na różnicowanie pacjentów ze zdiagnozowaną HFrfEF-ICM od HFpEF. Analiza badanych czynników genetycznych wykazała z kolei iż polimorfizm -786C/T zlokalizowany w obrębie regionu promotorowego genu syntazy tlenku azotu (*NOS3*) jest niezależnym markerem szybszego postępowania niewydolności mięśnia sercowego w populacji pacjentów z HF o etiologii kardiomiopatii rozstrzeniowej.

W kolejnej pracy "*The profile of selected single nucleotide polymorphisms in patients with hypertension and heart failure with preserved and mid-range ejection fraction*" wykazano użyteczność markerów genetycznych w diagnostyce pacjentów z HFpEF i HFmpEF (pacjenci z niewydolnością mięśnia sercowego i częściowo zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory) o różnym stopniu niewydolności nerek szacowanej w oparciu o wyliczany współczynnik filtracji nerkowej eGFR MDRD (z *ang. estimated Gromelurar Filtration Rate calculated based on Modification of Diet in Renal Disease study*). W badaniu tym wykazaliśmy, iż pacjenci z genotypem GG (polimorfizmu -174G/C genu *IL-6*) cechują wyższe wartości eGFR niż heterozygoty GC i homozygoty CC (66.4 vs 89 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). Ponadto, udokumentowaliśmy iż nosicielstwo allele C (polimorfizm -786T/C genu *NOS3*) oraz genotypu AA (polimorfizm-1260C/A genu *CYP27B1*) istotnie korelują z niższymi wartościami eGFR. Analiza wieloczynnikowa pozwoliła również na wyciągnięcie wniosku, iż pacjenci będący heterozygotami CG (polimorfizm -174G/C gnu *IL-6*) oraz nosiciele allele A polimorfizm-1260C/A genu *CYP27B1*) mają bardziej zaostrożony przebieg niewydolności mięśnia sercowego niezależnie od stopnia zachowania frakcji wyrzutowej lewej komory serca.

Jedną z lepszym metod szacowania ryzyka wystąpienia w przyszłości poważnych komplikacji chorób sercowo-naczyniowych jest kalkulator oparty o tzw. Reynolds Risk Score (RRS). Użyteczność Reynolds Risk Score (RRS) oraz innych parametrów klinicznych i laboratoryjnych w ocenie ciężkości zaawansowania zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych w populacji mężczyzn ze zdiagnozowaną stabilną chorobą wieńcową i zachowaną funkcją lewej komory serca po raz pierwszy była sprawdzana w badaniu „*Usefulness of Reynolds Risk Score in men with stable angina*”. Badanie i wywiad kliniczny poza elementami niezbędnymi do wyliczenia RRS jak: płeć, wiek, status palenia, wartość ciśnienia skurczowego, stężenie cholesterolu całkowitego i frakcji HDL, stężenie białka CRP szacowane testem o wysokiej czułości (hsCRP) oraz dodatni wywiad rodzinny w kierunku wystąpienia ostrego incydentu wieńcowego u rodziców badanego pacjenta przed 60 rokiem życia, obejmował również oznaczenie stężenia kreatyniny, stężenia sercowej troponiny T testem o wysokiej czułości (hsTnT), stężenia czynnika wzrostu łożyska (z ang. *Placental Growth Factor; PLGF*) oraz wyniki badania koronograficznego. W pracy tej wykazano, iż ocena zaawansowania zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych w oparciu o jeden wybrany czynnik kliniczny lub biochemiczny nie przynosi oczekiwanych rezultatów. Dopiero strategia oparta o jednoczesną analizę kilku parametrów klinicznych i laboratoryjnych stanowi bardzo dobre narzędzie w ocenie stopnia zajęcia naczyń wieńcowych przez blaszkę miażdżycową. Pacjenci z niższym wskaźnikiem RRS (<10%) cechowali się mniejszą liczbą zajętych krytycznie (>50%) naczyń procesem miażdżycowym oraz ogólnie niższym stopniem zaawansowania blaszki miażdżycowej w naczyniach wieńcowych. Możliwość wykorzystania RRS w ocenie zaawansowania zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych u mężczyzn ze stabilną chorobą wieńcową i zachowaną frakcją wyrzutową lewej komory serca może mieć swoje zastosowanie w redukcji liczby inwazyjnych zabiegów koronograficznych w tej populacji pacjentów, co znacznie obniża czas hospitalizacji, redukuje koszty a co najważniejsze poprawia jakość życia.

Ryzyko krytycznego (>50%) zwężenia naczyń wieńcowych przez blaszkę miażdżycową w oparciu o czynniki kliniczne, biochemiczne i genetyczne było oceniane w ramach pracy „*The genetic variation and the cardiovascular risk in Polish population*”. W badaniu tym wzięło udział 148 pacjentów u których przed 45 rokiem życia został zdiagnozowany zawał mięśnia sercowego oraz 117 zdrowych ochotników. Jak już wykazałam w pracach stanowiących podstawę do obrony doktoratu, zawał mięśnia sercowego ma podłoże genetyczne i 90% wszystkich ostrych incydentów wieńcowych jest spowodowanych nagłym przerwaniem blaszki miażdżycowej, która jest związana z toczącym się procesem zapalnym w naczyniu. Z tego względu chciałam sprawdzić czy zmienności genetyczne zlokalizowane w trzech genach, których produkty związane są z immunologiczną odpowiedzią organizmu: polimorfizm -2518A/G genu *MCP1* (z ang. *Monocyte Chemotactic Protein-1*), polimorfizm 656 C/G i 17T/C genu *MIF* (z ang. *macrophage Migration Inhibitory Factor*) oraz dwóch zmiennościach rs2383207 i rs10757278 zlokalizowanych na chromosomie 9p21 w regionie kodującym cząsteczkę nie-kodującego RNA (*ANRIL*) uczestniczącego w kontrolowaniu genów ulegających ekspresji m.in. w leukocytach, mogą stanowić czynnik ryzyka wystąpienia zawału mięśnia sercowego,

który rozwinął się na skutek nagłego pęknięcia blaszki miażdżycowej. Analiza wieloczynnikowa wykazała iż nosicielstwo allele recesywnego w przypadku polimorfizmu rs2383207 i polimorfizmu -2518A/G jest związane obok hipercholesterolemii (cholesterol całkowity >200 mg/dl), statusu palenia i płci męskiej ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia zawału mięśnia sercowego w młodym wieku (OR=1.96 95% CI=1.01-3.81 dla rs2383207 oraz OR=2.55, 95% CI=1.42-4.60 dla nosicielstwa allele G, polimorfizm -2518A/G *MCP-1*). Ponadto zaobserwowaliśmy, iż hipercholesterolemia, palenie oraz nosicielstwo allele G (polimorfizm -2518A/G *MCP-1*) jest związane z wyższym ryzykiem krytycznej (>50%) stenozы występującej przynajmniej w jednym naczyniu wieńcowym w populacji pacjentów młodych, u których przed 45 rokiem życia wystąpił zawał mięśnia sercowego (OR=3.89 95% CI=1.68-9.02; OR=2.65 95% CI=1.14-6.20; OR=2.41 95% CI=1.06-5.50; odpowiednio).

Kolejne dwa badania [10,11] związane były z oceną użyteczności wybranych markerów genetycznych w ocenie ryzyka rozwoju pierwotnego nadciśnienia tętniczego. Do analizy wytypowano zmienności genetyczne występujące w obrębie dwóch genów, których produkty na podstawie danych literaturowych są uwikłane w regulację ciśnienia tętniczego: gen kodujący dehydrogenazę 11-beta-hydroksysteroidową typu 1 (*11βHSD1*) oraz gen kodujący podjednostkę gamma 5 białka G (*GNG5*). Dehydrogenaza 11-beta-hydroksysteroidowa jest zaangażowana w proces tworzenia kortyzolu, który znany jest ze swoich właściwości regulujących ciśnienie krwi oraz gospodarkę węglowodanową. W obrębie genu kodującego *11βHSD* znajduje się polimorfizm insercyjno/delecyjny ins4436A (rs45487298), który wiązany jest z wyższą ekspresją genu. W badaniu [10] wykazano, iż nosiciele dodatkowej adeniny w pozycji 4436 genu *11βHSD* mają wyższe ryzyko wystąpienia pierwotnego nadciśnienia aniżeli homozygoty del/del (OR=2.41, 95% CI=1.22-4.70) oraz że u nosicieli ins4436A wzrasta ponad 9 krotnie szansa na rozwój cukrzycy oraz pojawienie się zaburzeń gospodarki lipidowej. Z kolei poszukiwanie odpowiedzi na pytanie czy istnieje powiązanie pomiędzy zmiennościami polimorficznymi genu kodującego podjednostkę gamma 5 białka G zaangażowanego w regulację pracy receptorów  $\alpha_{2A}$ -adrenergicznych a rozwojem pierwotnego nadciśnienia tętniczego stanowiło cel [11] kolejnej opisywanej pracy. Spośród pięciu wytypowanych zmienności polimorficznych tylko polimorfizm rs13093 (C/A) okazał się być związany z rozwojem nadciśnienia; nosiciele allele A cechowali się wyższym ryzykiem rozwoju choroby aniżeli homozygoty CC (OR=2.91 95% CI=1.68-5.05).

Dodatkowo rola zmienności polimorficznych w rozwoju nadciśnienia i chorób mu współtowarzyszących została omówiona w pracy poglądowej „*Genetic of metabolic syndrome*”. W oparciu o doniesienia literaturowe wykazaliśmy związek pomiędzy genami kodującymi: receptor dla glikokortykosteroidów, receptor beta-3-adrenergiczny, dehydrogenazę 11-beta-hydroksysteroidową oraz receptor dla insuliny a rozwojem zespołu metabolicznego, którego jednym z kryterium rozpoznania jest nadciśnienie.

Użyteczność markerów genetycznych była również wykazana w aspekcie rozważenia u pacjenta terapii kłopidogrelem w populacji pacjentów z chorobą niedokrwioną serca w pracy „*Changes in response to clopidogrel therapy in patients after percutaneous coronary interventions as assessed by different*

platelet function tests” . Zgodnie z informacją znajdującą się na ulotce leku oraz z wytycznymi znajdującymi się na stronie Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA), nosiciele wariantu \*2 lub \*3 genu kodującego cytochrom *P450* (CYP2C19\*2 lub CYP2C19\*3) mogą nie odnosić korzyści z terapii kłopidogrelem z uwagi na jego nieprawidłowy metabolizm u pacjenta i w przypadku tych pacjentów powinna zostać zastosowana inna terapia zastępcza. Z tego względu klasyfikacja pacjentów do badania spośród populacji mężczyzn cierpiących z powodu choroby wieńcowej i poddanych przezskórnej interwencji wieńcowej (PCI) odbywała się właśnie w oparciu o nosicielstwo allele CYP2C19\*2, które zostało wykryte u ośmiu kandydatów. Pacjenci ci zostali usunięci z badania jako osoby nie reagujące na działanie badanego leku. U pozostałych pacjentów (N=35) poddanych działaniu kłopidogrelu była oceniana funkcja płytek w oparciu o 4 różne testy: agrometria płytek oparta na transmisji światła (z ang. *Light Transmission Aggregometry; LTA*), test wielokrotnej agregacji elektrodowej (z ang. *Multiple Electrode Aggregometry; MEA*), stymulowany wazodylatatorem test fosfoproteiny (z ang. *vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation, VASP*) i test aktywacji płytek krwi na szlaku receptora P2Y1 znany pod nazwą handlową jako INNOVANCE® PFA P2Y (PFA). W oparciu o przeprowadzone badanie nie udało się ustalić, który z wprowadzonych testów na rynek przeważa w ocenie funkcji płytek. Z tego względu testy te nie powinny być wykorzystywane jako zamiennie w rutynowej diagnostyce pacjenta, niemniej jednak poznanie genetycznego profilu pacjenta ma istotne znaczenie w ustaleniu strategii jego terapii farmakologicznej.

- [1] Wojtczak-Soska K, Pietrucha T, **Sakowicz A**, Lelonek M. Soluble ST2 protein in chronic heart failure is independent of traditional factors. *Arch Med Sci.* 2013;9(1):21-26. doi:10.5114/aoms.2013.33344
- [2] **Sakowicz A**, Damian S, Hejduk P, Pietrucha T. The genetics of metabolic syndrome. *Med Sci Tech.* 2013;54:1-6.
- [3] Sobczak S, Wojtczak-Soska K, Ciurus T, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M. Single sST2 protein measurement predicts adverse outcomes at 1-year follow-up in patients with chronic heart failure. *Pol Arch Med Wewn.* 2014;124(9):452-458.
- [4] Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M. Soluble ST2 protein in the short-term prognosis after hospitalisation in chronic systolic heart failure. *Kardiol Pol.* 2014;72(8):725-734. doi:10.5603/KP.a2014.0085
- [5] Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Janikowski K, Lelonek M. Soluble ST2 protein and hospitalizations due to worsening chronic heart failure during a one-year follow-up in a population with reduced ejection fraction. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(6). doi:10.17219/acem/63005.
- [6] Bielecka-Dabrowa A, **Sakowicz A**, Misztal M, von Haehling S, Ahmed A, Pietrucha T, Rysz J, Banach M. Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies. *Int J Cardiol.* 2016;221. doi:10.1016/j.ijcard.2016.07.150

- [7] Bielecka-Dabrowa A, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Misztal M, Chruściel P, Rysz J, Banach M. The profile of selected single nucleotide polymorphisms in patients with hypertension and heart failure with preserved and mid-range ejection fraction. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/s41598-017-09564-9.
- [8] Pietka I, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Cichocka-Radwan A, Lelonek M. Usefulness of Reynolds Risk Score in men with stable angina. *Cent Eur J Med*. 2014;9(1):21-27. doi:10.2478/s11536-013-0240-z
- [9] **Sakowicz A**, Adam S, Hejduk P, Zalejska K, Lelonek M, Pietrucha T. The genetic variation and the cardiovascular risk in Polish population. *Exp Clin Cardiol*. 2014;20(1).
- [10] Hejduk P, **Sakowicz A**, Pietrucha T. Association between ins4436A in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene and essential hypertension in Polish population. *Postep Hig Med Dosw*. 2015;69:1245-1250.
- [11] Hejduk P, **Sakowicz AM**, Mikołajczyk M, Sliwińska A, Drzewoski J, Pietrucha T. Association between single nucleotide polymorphisms of the G-protein  $\gamma 5$  subunit and the risk of essential hypertension in the population of Poland. *Pol Arch Med Wewn*. 2015;125(12):903-909.
- [12] Golanski, J.; Syska, K.; Chizynski, K.; Kassasir, H.; Watala, C.; **Sakowicz, A.**; Kuliczkowski, W. Changes in response to clopidogrel therapy in patients after percutaneous coronary interventions as assessed by different platelet function tests. *Pol Arch Med Wewn*. 2016, 126(9):653-661
- [13] Sobczak S, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M. Diagnostic utility of biomarkers of left ventricular stress in patients with aortic stenosis and preserved left ventricular ejection fraction. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Pol*. 2017;14(2). doi:10.5114/kitp.2017.68737.

Dodatkowo wyniki badań w odniesieniu do tematyki **Użyteczność markerów biochemicznych, genetycznych a także Reynolds Risk Score w ocenie ryzyka chorób układu krążenia** były prezentowane w czasie ogólnopolskich i międzynarodowych konferencji:

- [K1] Piętka I, Pietrucha T, **Sakowicz A**, Lelonek M. Użyteczność kliniczna łożyskowego czynnika wzrostu u mężczyzn ze stabilną chorobą wieńcową. : XVII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Wrocław, 26-28 września 2013
- [K2] Piętka I, Pietrucha T, **Sakowicz A**, Lelonek M Spoczynkowa częstość pracy serca a biomarkery zapalne u mężczyzn ze stabilną chorobą wieńcową XIX Konferencja Szkoleniowa; XV Międzynarodowa Konferencja Wspólna Sekcji Elektrokardiologii Nieinwazyjnej i telemedycyny Polskiego Towarzystwa kardiologicznego oraz International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology , Zakopane Kościelisko, 27 lutego-2 marca 2013 roku
- [K3] Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M. Migotanie przedsionków i białko sST2 w rokowaniu chorych z przewlekłą niewydolnością serca w obserwacji rocznej. XVII

Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Wrocław, 26-28 września 2013

- [K4] Sobczak S, Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M. Białko sST2 jako marker prognostyczny niekorzystnych zdarzeń sercowych w przewlekłej niewydolności serca. XVII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Wrocław, 26.09.2013-28.09.2013
- [K5] Lelonek M, Huziuk I, Pietrucha T, **Sakowicz A** Powszechnie oznaczana hsTnT i glukoza na czczo a nie częstość rytmu serca niezależnymi zmiennymi wielonaczyniowej stabilnej choroby wieńcowej XVI Międzynarodowa Konferencja Wspólna International Society for Holter & Noninvasive Electrocardiology oraz Sekcji Elektrokardiologii Nieinwazyjnej i Telemedycyny Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Zakopane Kościelisko 5-8.03.2014
- [K6] Lelonek M, Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T. Czas trwania zespołu QRS niezależnym czynnikiem powiązany z białkiem sST2 w przewlekłej niewydolności serca XVI Międzynarodowa Konferencja Wspólna International Society for Holter & Noninvasive Electrocardiology oraz Sekcji Elektrokardiologii Nieinwazyjnej i Telemedycyny Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Zakopane Kościelisko 5-8.03.2014
- [K7] Lelonek M, Sobczak S, Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T Charakterystyka pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca oraz ciężką dysfunkcją skurczową lewej komory z uwzględnieniem strategii wielomarkerowej oraz niekorzystnych zdarzeń sercowych w rocznej obserwacji od hospitalizacji XVI Międzynarodowa Konferencja Wspólna International Society for Holter & Noninvasive Electrocardiology oraz Sekcji Elektrokardiologii Nieinwazyjnej i Telemedycyny Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego, Zakopane Kościelisko 5-8.03.2014
- [K8] Wojtczak-Soska K, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Lelonek M Białko sST2 i rehospitalizacje z powodu zaostrenia przewlekłej niewydolności serca w obserwacji rocznej. XVIII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego 2014, 18-20 września, Poznań.
- [K10] Bielecka-Dabrowa A, **Sakowicz A**, Misztal M, Pietrucha T, Rysz J, Banach M Differences in biochemical and genetic biomarkers in patients with heart failure of various etiologies European Journal of Heart Failure Abstracts Supplement ( 2016 ) 18 ( Supplement 1 ), 243 27 - 31 sierpień 2016, Rome - Italy.
- [K11] Gasiorek P, Banach M, **Sakowicz A**, Glabinski A, Sosnowka B, Bielecka-Dabrowa A The potential role of inflammation in cryptogenic stroke European Heart Journal ( 2018) 39 ( Supplement ), 1330-1331 European Society of Cardiology Congress, 25-29 sierpień 2018 , Munich - Germany

[K12] Bielecka-Dabrowa A, Gasiorek P, **Sakowicz A**, Banach M Arterial stiffness and indices of diastolic heart failure as predictors of ischemic strokes of undetermined etiology European Heart Journal ( 2018 ) 39 ( Supplement ), 1342-1343 European Society of Cardiology Congress, 25-29 sierpień 2018, Munich - Germany

### **Związek czynników angiogennych, genetycznych oraz krążących komórek śródbłonna we krwi pacjentów z chorobami mieloproliferacyjnymi**

Czynniki angiogenne odgrywają znaczącą rolę w patogenezie rozrostów hematologicznych. Sprzyjają one nie tylko procesowi nowotworowemu ale również w znaczący sposób wpływają na zaburzenia koagulacyjne pojawiające się u pacjentów cierpiących z powodu chorób mieloproliferacyjnych. Markerem procesu angiogenezy są krążące komórki śródbłonna (z ang. *Circulating Endothelial Cells, CEC*). Komórki te ekspozując na swojej powierzchni cząsteczki proadhezyjne i prokoagulacyjne mogą dodatkowo aktywować układ krzepnięcia prowadząc do poważnych powikłań zakrzepowych. Dodatkowymi czynnikami zaburzeń koagulacyjnych towarzyszących chorobom mieloproliferacyjnym są: wiek powyżej 60 lat, wystąpienie wcześniejszego incydentu zakrzepowego u pacjenta, leukocytoza oraz obecność mutacji somatycznej genu kinazy tyrozynowej *JAK2* (mutacja V617F).

Celem badań było określenie liczby krążących komórek śródbłonna oraz stężenia wybranych czynników angiogennych a także określenie ich związku z obecnością mutacji somatycznej genu kinazy tyrozynowej *JAK2* (mutacja V617F) u pacjentów z rozpoznaną czerwienicą prawdziwą (z ang. Polycythemia Vera, CV) lub nadpłytkowością samoistną (z ang. Essential Thrombocythemia, ET). W pierwszym badaniu "*Circulating endothelial cells in essential thrombocythemia and polycythemia vera: correlation with JAK2-V617F mutational status, angiogenic factors and coagulation activation marker*" wzięło udział 16 pacjentów ze zdiagnozowaną czerwienicą prawdziwą i 31 z nadpłytkowością samoistną natomiast w drugim badaniu 65 pacjentów z nadpłytkowością samoistną zostało podzielonych na dwie grupy pod względem zastosowanej farmakoterapii: adandrelidem (A) lub hydroksymocznikiem (HU). W obu badaniach grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy z negatywnym wywiadem w kierunku chorób przebiegającym z zaburzeniami krzepnięcia krwi.

W niniejszych badaniach wykazaliśmy, iż liczba krążących komórek niezależnie od badanej subpopulacji definiowanej poprzez obecność lub brak na swojej powierzchni odpowiedniego antygeny różnicowania komórkowego (z ang. *cluster differentiation, CD*): CD31, CD34, CD45, CD133, CD105, CD106 i CD146 była znamienne wyższa w populacji pacjentów z czerwienicą prawdziwą oraz nadpłytkowością samoistną w stosunku do kontroli. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, iż pacjenci z czerwienicą prawdziwą cechowali się znamienne wyższą liczbą CEC o fenotypie CD45-, CD133-, CD31, CD34, CD146, CD105-, CD106- oraz populacji komórek śródbłonna o fenotypie apoptotycznym

aniżeli pacjenci u których zdiagnozowano nadpłytkowość samoistną. Badania na poziomie białkowym w oparciu o testy ELISA pozwoliły na ustalenie związku pomiędzy czynnikami angiogennymi a chorobami mieloproliferacyjnymi. Stężenie wolnego receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyń typu 1 (z ang. *souuble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor type 1*, sVEGFR-1) oraz czynnika wzrostu śródbłonna (z ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) było wyższe w populacji pacjentów, u których zdiagnozowano zespoły mieloproliferacyjne. Z kolei stężenie czynnika wzrostu łożyska (z ang. *Placental Growth Factor*, PlGF) było istotnie statystycznie niższe we krwi pacjentów ze zdiagnozowaną CV i ET. Ponadto wykazaliśmy, iż stężenie czynników angiogennych jest związane z obecnością mutacji somatycznej V617F genu kinazy tyrozynowej JAK2; stężenie PlGF było znacząco niższe w populacji pacjentów z ET z pozytywnym testem w kierunku V617F JAK2 w porównaniu do osób, u których nie wykryto mutacji. Może to sugerować, iż ciągła aktywacja kinazy tyrozynowej JAK2 związana z obecnością w jej genie mutacji somatycznej V617F może prowadzić do pobudzenia ścieżek sygnałowych związanych z regulacją procesów angiogenezy.

- [1] Treliński J, Wierzbowska A, Krawczyńska A, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Smolewski P, Robak T, Chojnowski K Plasma levels of angiogenic factors and circulating endothelial cells in essential thrombocythemia: Correlation with cytoreductive therapy and JAK2-V617F mutational status. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(9):1727-1733.
- [2] Treliński J, Wierzbowska A, Krawczyńska A, **Sakowicz A**, Pietrucha T, Smolewski P, Robak T, Chojnowski K Circulating endothelial cells in essential thrombocythemia and polycythemia vera: correlation with JAK2-V617F mutational status, angiogenic factors and coagulation activation markers. *Int J Hematol*. 2010;91(5):792-798. doi:10.1007/s12185-010-0596-7

### **Ciąża wysokiego ryzyka w aspekcie badań genetycznych, proteomicznych i lipidowych.**

Nadciśnienie tętnicze w okresie ciąży jest związane z poważnym ryzykiem powikłań okołoporodowych a badania na świecie wskazują iż u około 35% kobiet u których wzrost ciśnienia wystąpił przed 34 tygodniem ciąży zostanie zdiagnozowany stan przedzucawkowy (preeklampsja, PE). Pomimo tego, że objawy kliniczne PE pojawiają się po 20-tym tygodniu to proces patologiczny prowadzący do manifestacji choroby zaczyna się już w pierwszym trymestrze ciąży. Uważa się, iż u podłoża patomechanizmu preeklampsji leży nieprawidłowa inwazja trofoblastu w tkanki macicy m.in. w ścianę jej końcowych gałęzi tętnic spiralnych. W procesie tym znaczącą rolę odgrywają enzymy proteolityczne, m.in. metaloproteinazy (MMPs), które wydzielane są zarówno przez komórki trofoblastu jak i komórki zlokalizowane w warstwie doczesnej macicy. Niedostateczna synteza MMPs, wynikająca m.in. z zaburzenia ekspresji ich genów na skutek występowania w nich pojedynczych zmian nukleotydowych (z ang. *Single Nucleotide Polymorphism SNP*), może znacząco zaburzać prawidłowy etap implantacji,

prowadząc do nieprawidłowej przebudowy tętnic spiralnych macicy i ograniczenia dostępu tlenu i składników pokarmowych do rozwijającego się płodu.

Celem pracy *“Association of Maternal and Fetal Single-Nucleotide Polymorphisms in Metalloproteinase (MMP1, MMP2, MMP3, and MMP9) Genes with Preeclampsia”* było zbadanie czy istnieje zależność pomiędzy występowaniem pojedynczych zmian nukleotydowych w obrębie genów kodujących MMPs u matki i jej płodu a rozwojem zjawiska preeklampsji. W oparciu o analizę danych literaturowych do badania wybraliśmy geny kodujące te metaloproteiny które odgrywają istotne znaczenie w procesie implantacji: metaloproteinazę 1 (MMP1) należąca do grupy kolagenaz, metaloproteinazę 3 (MMP3) należąca do rodziny stromelizin oraz metaloproteinazy 2 (MMP2) i 9 (MMP9) należące do grupy gelatynaz. W obrębie tych genów wytypowane zostały warianty nukleotydowe, które zgodnie z piśmiennictwem są związane z zaburzeniem regulacji ekspresji tych genów: polimorfizm -1607 1G/2G genu *MMP1* (rs1799750), -735 C/T *MMP2* (rs2285053), -1306 C/T *MMP2* (rs243865), -1171 5A/6A *MMP3* (rs35068180) i -1562C/T *MMP9* (rs3918242). Wyniki analizy jednoczynnikowej wykazały, iż nosicielstwo genotypu 1G/1G *MMP1*, związanego w piśmiennictwie z redukcją ekspresji genu dla metaloproteinazy 1, przez matkę lub przez płód jest związane z rozwojem stanu przedrzucawkowego. Zaobserwowaliśmy również, że z chwilą gdy matka jest homozygotą 5A/5A *MMP3* lub dziecko jest heterozygotą 5A/6A *MMP3* rośnie ryzyko wystąpienia PE (OR=2.76, 95% CI=1.17-6.49 oraz OR=2.44, 95% CI=1.16-5.13), ponadto ryzyko to wzrasta dwukrotnie kiedy zarówno matka jak i jej dziecko tworzą układ genotypów *MMP3* 5A/5A i 5A/6A (OR= 4.57, 95% CI 1.85–11.26). Wykazaliśmy również, że obecność układu alleli u płodu 1G *MMP1*/5A *MMP3*/C *MMP9*/C *MMP2*/T *MMP2* wiązał się z prawie sześciokrotnym wzrostem szansy na wystąpienie zjawiska PE (OR=5.93, 95% CI=1.06-33.19), sugerując iż preeklampsja ma podłoże genetyczne a wytypowanie markerów molekularnych może mieć istotne znaczenie dla klasyfikacji pacjentek do grupy zwiększonego ryzyka. Związek zmienności polimorficznych z ryzykiem wystąpienia preeklampsji oraz jej dalekoterminowym powikłaniem jakim są choroby układu krążenia omówiliśmy w pracy przeglądowej *„Preeclampsia and Related Cardiovascular Risk: Common Genetic Background”*. W oparciu o analizę danych literaturowych pokazaliśmy związek na poziomie molekularnym pomiędzy stanem przedrzucawkowym a chorobami układu krążenia okresu pozaciążowego. Wskazaliśmy na geny i ich zmienności polimorficzne, które mogą odgrywać istotne znaczenie w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych zarówno tych manifestujących się w okresie ciąży jak i w późniejszym czasie. Wśród potencjalnych kandydatów wskazaliśmy między innymi gen kodujący: oksydazę acetylo-CoA (*ACOX2*) i jej polimorfizm rs4681689, hydroksylazę epoksydową typu 1 (*EPHX1*) i jej polimorfizm Tyr113His, syntazy tlenku azotu (*eNOS*) i jej dwie zmienności polimorficzne 894G/T i 4a4bVNTR, oraz gen kodujący angiotensynogen (*AGT*) oraz receptor dla estrogenu typu 1 (*ESR1*) i ich zmienności polimorficzne Met235Thr i -401T/C. Dodatkowo w pracy został poruszony wątek zaburzeń epigenetycznych, które poprzez wpływ m.in. na regulację ekspresji genów uczestniczących w procesach

zapalnych i modulujących odpowiedź immunologiczną organizmu mogą przyczyniać się do rozwoju chorób układu krążenia również tych, które związane są tylko z okresem ciąży.

Komórki łożyska w odpowiedzi na niedożywienie i niedotlenienie wynikające z zburzonego procesu implantacji zaczynają wydzielać szereg mediatorów których zadaniem jest m.in. pobudzenie angiogenezy. Związek wybranych czynników angiogennych z patomechanizmem rozwoju zjawiska preeklampsji został badany w pracy „*Angiogenic factor screening in women with mild preeclampsia - New and significant proteins in plasma*”. W grupie 48 kobiet (21 z PE, 27 kontroli) w oparciu o technikę macierzy białkowych sprawdziliśmy, które z 60 wytypowanych, czynników angiogennych jest związanych z wystąpieniem stanu przedzucawkowego. Dodatkowo stężenia tych czynników angiogennych, które w oparciu o wyniki uzyskane z macierzy różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupą badaną a kontrolną, były weryfikowane komercyjnie dostępnymi testami ELISA. Analiza statystyczna wykazała iż stężenia: interferonu gamma (INF- $\gamma$ ), czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), chemokiny 10 z rodziny CXC (IP-10), leptyny (LEP) były znamienne podniesione we krwi kobiet których ciąża przebiegała ze stanem przedzucawkowym, natomiast stężenia: czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF), czynnika wzrostu łożyska (PIGF) oraz folistatyny były obniżone w stosunku do kontroli. Dodatkowo jako pierwsi zaobserwowaliśmy, iż trzy niezależne czynniki których stężenie było wyższe w populacji kobiet, których ciąża była powikłana stanem przedzucawkowym: czynnik hamujący białaczkę (LIF), czynnik wzrostu wiążący heparynę podobny do EGF (HB-EGF), czynnik BB wzrostu pochodzenia płytkowego (PDGF-BB) mogą odgrywać znaczącą rolę w patomechanizmie zjawiska PE.

W kolejnej pracy „*Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia - Mass spectrometry analysis*” badaliśmy związek pomiędzy składem sfingolipidowym osocza i elementów morfotycznych krwi a rozwojem stanu przedzucawkowego. W oparciu o analizę składu sfingolipidowego matczyne pełnego osocza, osocza ubogopłytkowego oraz erytrocytów i płytek wykazaliśmy, iż pełne osocze kobiet, których ciąża przebiegała ze stanem przedzucawkowym cechuje się znamienne wyższymi stężeniami: sfingozyny (Sph), fosforanu-1-sfingozyny (S1P) oraz ceramidów zawierających kwas palmitynowy (C16:0 Cer), kwas oleinowy (C18:1 Cer), kwas stearynowy (C18:0 Cer), kwas arachidonowy (C20:0 Cer), kwas behenowy (C22:0 Cer) oraz kwas nerwonowy (C24:1 Cer). Nie zaobserwowaliśmy różnic w składzie sfingolipidowym osocza ubogopłytkowego, erytrocytów i płytek krwi pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Wydaje się, iż sfingolipidy poprzez udział w szlakach komórkowych związanych z proliferacją, wzrostem komórek, apoptozą, migracją a także regulacją stanu zapalnego i angiogenezy mogą istotnie modulować procesy, które leżą u podłoża patomechanizmu PE.

- [1] Charkiewicz K, Goscik J, Blachnio-Zabielska A, Raba G, **Sakowicz A**, Kalinka J, Chabowski A, Laudanski P. Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia - Mass spectrometry analysis. *PLoS One*. 2017;12(5). doi:10.1371/journal.pone.0177601

- [2] Charkiewicz K, Jasinska E, Goscik J, Koc-Zorawska E, Zorawski M, Kuc P, Raba G, Kluz T, Kalinka J, **Sakowicz A**, Laudanski P. Angiogenic factor screening in women with mild preeclampsia – New and significant proteins in plasma. *Cytokine*. 2018;106(February):125-130. doi:10.1016/j.cyto.2017.10.020
- [3] **Sakowicz A**, Lisowska M, Biesiada L, Rybak-Krzyszowska M, Gach A, Sakowicz B, Grzesiak M, Huras H, Pietrucha T. Association of Maternal and Fetal Single-Nucleotide Polymorphisms in Metalloproteinase (MMP1, MMP2, MMP3, and MMP9) Genes with Preeclampsia. *Dis Markers*. 2018;2018:1-10. doi:10.1155/2018/1371425
- [4] Lisowska M, Pietrucha T, **Sakowicz A**. Preeclampsia and Related Cardiovascular Risk: Common Genetic Background. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(8). doi:10.1007/s11906-018-0869-8

Wyniki badań w odniesieniu do tematyki **Ciąża wysokiego ryzyka w aspekcie badań genetycznych, proteomicznych i lipidowych** były prezentowane w czasie międzynarodowych konferencji:

- [K1] **Sakowicz A**, Biesiada L, Krajewski P, Stępnia D, Hejduk P, Krasomski G, Pietrucha T. Chromosome 9p21 rs2383207 polymorphism is associated with the risk of pre-eclampsia 3rd International Congress on Cardiac Problems in Pregnancy (CPP 2014). 20-23.02.2014, Italy.
- [K2] **Sakowicz A**, Gach A, Rybak-Krzyszowska M, Hejduk P, Pietrucha T, Martuzalska M, Grzelak S, Sakowicz B, Krasomski G, Biesiada L Association between two regulators of NFκB: IKKα and IκBα and the development of preeclampsia The 4th International Congress on Cardiac Problems in Pregnancy (CPP2016), 27 Feb-1 March 2016, Las Vegas

## 6. Literatura

1. Laivuori H. Genetic aspects of preeclampsia. *Front Biosci*. 2007;12:2372-2382. doi:10.1016/S0002-8223(05)01189-2
2. Dekker G, Robillard PY, Roberts C. The etiology of preeclampsia: The role of the father. *J Reprod Immunol*. 2011;89(2):126-132. doi:10.1016/j.jri.2010.12.010
3. Elsmén E, Källén K, Maršál K, Hellström-Westas L. Fetal gender and gestational-age-related incidence of pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(11):1285-1291. doi:10.1080/00016340600578274
4. Lamarca BD, Ryan MJ, Granger JP. Pathophysiology of Hypertension Inflammatory Cytokines During Preeclampsia: Role of Inflammatory Cytokines. *Curr Hypertens Rev*. 2007:69-74.
5. Wang Y, Alexander JS. Placental pathophysiology in preeclampsia. *Pathophysiology*. 2000;6(4):261-270. doi:10.1016/S0928-4680(99)00026-7
6. Benyo DF, Smarason A, Redman CWG, et al. Expression of Inflammatory Cytokines in Placentas from Women with Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2505-2512. doi:10.1210/jc.86.6.2505

7. Jonsson Y, Rub M, Nieminen K, Sharma S, Ernerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. 2006;70:83-91. doi:10.1016/j.jri.2005.10.007
8. Aban M, Cinel L, Arslan M, et al. Expression of nuclear factor-kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: an immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med.* 2004;204(3):195-202. doi:10.1620/tjem.204.195
9. Vaughan, J.E.; Walsh SW. Activation of NF- $\kappa$ B in Placentas of Women with Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2012;31(2):243-251. doi:10.1080/10810730902873927. Testing
10. Fusco F, Paciolla M, Napolitano F, et al. Genomic architecture at the incontinentia pigmenti locus favours de novo pathological alleles through different mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2012;21(6):1260-1271. doi:10.1093/hmg/ddr556
11. Zamora-Chávez A, Escobar-Sánchez A, Sadowinski-Pine S, Saucedo-Ramírez O J, Delgado-Barrera P E-QCG. Incontinentia pigmenti with defect in cellular immunity. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2015;72(5):325-332. doi:10.1016/j.bmhmx.2015.01.001.4.
12. Mooster JL, Cancrini C, Simonetti A, Rossi P, Di Matteo G, Romiti M L, Di Cesare S, Notarangelo L, Geha R S MDR. Immune deficiency caused by impaired expression of nuclear factor- $\kappa$ B essential modifier (NEMO) because of a mutation in the 5' untranslated region of the NEMO gene. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(1):127-132. doi:110.1016/j.jaci.2010.04.026.
13. Woffendin H, Shuttleworth G, Bardaro T, et al. Survival of Male Patients with Incontinentia Pigmenti Carrying a Lethal Mutation Can Be Explained by Somatic Mosaicism or Klinefelter Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;69(6):1210-1217. doi:10.1086/324591
14. Hypertension in Pregnancy Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy Executive. *Obstet Gynecol.* 2013;122(5):1122-1131. doi:10.1056/NEJM199204023261405
15. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014;4(2):97-104. doi:10.1016/j.preghy.2014.02.001
16. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine.* 2002;19(1):103-111. doi:10.1385/ENDO:19:1:103
17. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853-6866.
18. Iacobelli S, Bonsante F, Robillard PY. Comparison of risk factors and perinatal outcomes in early onset and late onset preeclampsia: A cohort based study in Reunion Island. *J Reprod Immunol.* 2017;123(August):12-16. doi:10.1016/j.jri.2017.08.005
19. Treloar SA, Cooper DW, Brennecke SP, Grehan MM, Martin NG. An Australian twin study of the genetic basis of preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(3):374-381.

doi:10.1067/mob.2001.109400

20. Skjærven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Rønning T, Irgens LM, Lie RT. Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *Br Med J*. 2005;331(7521):877-879. doi:10.1136/bmj.38555.462685.8F
21. Rahardjo B, Widjajanto E, Sujuti H, Keman K. Different levels of IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and PPAR- $\gamma$  in monocyte cultures exposed by plasma preeclampsia and normotensive pregnancy. *Pregnancy Hypertens*. 2014;4(3):187-193. doi:10.1016/j.preghy.2014.03.001
22. Shah TJ, Walsh SW. Activation of NF- $\kappa$ B and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(1):48.e1-48.e8. doi:10.1016/j.ajog.2006.08.038
23. Khodzhaeva ZS, Kogan YA, Shmakov RG, et al. Clinical and pathogenetic features of early- and late-onset pre-eclampsia. *J Matern Neonatal Med*. 2016;29(18):2980-2986. doi:10.3109/14767058.2015.1111332

Salwika