



Klinika Pediatrii i Gastroenterologii

III Katedra Pediatrii Uniwersytetu Medycznego

20-093 Lublin, ul. Prof. A.Gębali 6

 (081) 71 85 420

(081) 74 31 353

e-mail: elzbieta.paczuchowska@umlub.pl

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Pac-Kozuchowska

Lublin 28.12.2023 r.

Kierownik III Katedry Pediatrii

Kierownik Kliniki Pediatrii i Gastroenterologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Ocena osiągnięcia naukowego i dorobku naukowego w postępowaniu o nadanie tytułu doktora habilitowanego dr n. med. Janowi Nowakowi w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

W oparciu o pismo Kanclerza Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu informujące mnie o tym, że zostałam powołana na recenzenta w postępowaniu habilitacyjnym dr n. med. Jana Nowaka, dokonałam oceny osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego, dydaktycznego, zawodowego i organizacyjnego Habilitanta. Ocenę przedstawiłam na podstawie dokumentów załączonych w formie elektronicznej.

Dr n. med. Jan Nowak jest absolwentem I Wydziału Lekarskiego UM w Poznaniu, który ukończył w 2011 roku (w tym czasie w latach 2009-2010 studiował na Université de Rennes 1, Francja, w ramach programu Erasmus).

Po odbyciu stażu podyplomowego w Szpitalu Klinicznym im. Heliodora Świącickiego/111 w Szpitalu Wojskowym w Poznaniu, który ukończył Lekarskim Egzaminem Państwowym, rozpoczął szkolenie specjalizacyjne w dziedzinie pediatrii w trybie rezydenckim w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UMP, Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera UMP.

W latach 2012-2016 był uczestnikiem dziennych Studiów Doktoranckich na I Wydziale Lekarskim UMP. Od 2016 do 2020 roku pracował jako asystent, a od 2020 do chwili obecnej pracuje na stanowisku adiunkta w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UMP, w zespole kierowanym przez Prof. Jarosława Walkowiaka. Zainteresowania naukowe dr. Jana Nowaka od początku pracy skupiały się na problematyce schorzeń przewodu pokarmowego.

W 2018 roku uzyskał tytuł specjalisty w dziedzinie pediatrii. W latach 2013-2016 był uczestnikiem Studiów Doktoranckich, które ukończył w terminie. W 2017 roku na I Wydziale Lekarskim WUM obronił pracę doktorską składającą się z cyklu prac nt: Nowe metody diagnostyczne w gastroenterologii dziecięcej. Promotorem pracy był prof. dr hab. n.med. Jarosław Walkowiak. Na wniosek Kapituły Konkursu Decyzją Prezydenta Miasta Poznań praca doktorska dr Jana Nowaka została uznana jak wyróżniająca się.

Ocena osiągnięć naukowo-badawczych

Zgodnie z informacją bibliometryczną według Biblioteki Głównej Uniwersytetu Medycznego im.

K. Marcinkowskiego w Poznaniu z dnia 23.06.2023 r . dorobek naukowy wynosi:

Suma wskaźnika IF poza osiągnięciem naukowym : **265,683**; MEiN = **4921 pkt.**

Według Web of Science liczba cytowań wynosi 613 /bez autocytowań 584.

H-indeks wynosi według Scopus 14, według Web of Science 13.

Liczba streszczeń ze zjazdów międzynarodowych - 9, krajowych 4.

Liczba listów do redakcji czasopism - 3, IF = 42,336; MEiN=400.

Ocena cyklu publikacji stanowiących podstawę do ubiegania się o tytuł naukowy doktora habilitowanego

Osiągnięciem będącym podstawą do wnioskowania o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego jest cykl sześciu zespołowych, oryginalnych publikacji powiązanych tematycznie

„Choroby jelit i dysregulacja immunologiczna w analizach transkryptomicznych”.

Przedstawione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych w latach 2021-2022,

a we wszystkich pracach Habilitant jest pierwszym autorem.

Współczynnik oddziaływania (IF) dla prac włączonych do osiągnięcia naukowego wynosi 48,556, (MNI_{SW}) = 720. Wymienione prace były cytowane 52 razy (Web of Science), co jest bardzo dobrym wynikiem biorąc pod uwagę krótki czas jaki upłynął od ich publikacji. We wszystkich pracach udział Habilitanta był wiodący (od 40% do 85%) i polegał na sformułowaniu koncepcji pracy, wyborze i opracowaniu metod, przeprowadzenie analiz, interpretacji wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin oraz materiałów dodatkowych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawione badania były prowadzone w ramach współpracy wielośrodkowej i międzynarodowej. W dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów,

którzy wyrażają zgodę na wykorzystanie publikacji w których są współautorami w pracy habilitacyjnej dr n. med. Jana Nowaka.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

P1. Nowak Jan K.,* Adams Alex T.,* Kalla Rahul, Lindstrom Jonas C., Vatn Simen, Bergemalm Daniel, Keita Asa V., Gomollon Fernando, Jahnsen Jorgen, Vatn Morten H., Ricanek Petr, Ostrowski Jerzy, Walkowiak Jarosław, Halfvarson Jonas, Satsangi Jack, IBD CHARACTER Consortium. *Characterisation of the Circulating Transcriptomic Landscape in Inflammatory Bowel Disease Provides Evidence for Dysregulation of Multiple Transcription Factors Including NFE2, SPI1, CEBPB, and IRF2.* Journal of Crohn's and Colitis 2022 : Vol. 16, nr 8, s. 1255-1268. **IF: 10.020, Pkt: 140 *** – pierwsi autorzy

Wkład: planowanie i przeprowadzenie analiz z wyborem i opracowaniem metod, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu z rycinami, materiałami dodatkowymi. Udział procentowy: 40%.

P2. Nowak Jan K., Lindstrom Jonas Christoffer, Kalla Rahul, Ricanek Petr, Halfvarson Jonas, Satsangi Jack. *Age, Inflammation, and Disease Location Are Critical Determinants of Intestinal Expression of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and TMPRSS2 in Inflammatory Bowel Disease.* Gastroenterology 2020 : Vol. 159, nr 3, s. 1151-1154.e2. **IF: 22.682, Pkt: 200.**

Wkład: koncepcja badania, wybór metod, przeprowadzenie analiz, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin, materiałów dodatkowych. Udział procentowy: 60%.

P3. Nowak Jan K.,* Szymańska Cyntia J.,* Glapa-Nowak Aleksandra, Duclaux-Loras Remi, Dybska Emilia, Ostrowski Jerzy, Walkowiak Jarosław, Adams Alex T. *Unexpected Actors in Inflammatory Bowel Disease Revealed by Machine Learning from Whole-Blood Transcriptomic Data.* Genes 2022 Sep 1;13(9):1570, doi: 10.3390/genes13091570. **IF: 4.141, Pkt 100 *** – pierwsi autorzy

Wkład: koncepcja pracy, wybór i opracowanie metod, przeprowadzenie analiz, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin, materiałów dodatkowych. Udział procentowy: 70%.

P4. Nowak Jan K., Dybska Emilia, Adams Alex, Walkowiak Jarosław. *Immune cell-specific smoking-related expression characteristics are revealed by re-analysis of transcriptomes from the*

alg

CEDAR cohort. Central European Journal of Immunology 2022 : Vol. 47, nr 3, s. 246-259. **IF: 1.634, Pkt: 70**

Wkład: koncepcja pracy, wybór i opracowanie metody, przeprowadzenie analiz, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin, materiałów dodatkowych. Udział procentowy: 80%.

P5. Nowak Jan K., Dworacka Marzena, Gubaj Nazgul, Dossimov Arystan, Dossimov Zhumabek, Walkowiak Jarosław. *Expression profiling of ileal mucosa in asthma reveals upregulation of innate immunity and genes characteristic of Paneth and goblet cells*. Allergy, Asthma & Clinical Immunology 2021 : Vol. 17, art. 82 [s. 1-11], id. art. 82. **IF: 3.373, Pkt: 70**

Wkład: zaproponowanie badania, przeprowadzenie analiz, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin, materiałów dodatkowych. Udział procentowy: 85%.

P6. Nowak Jan K., Dybska Emilia, Dworacka Marzena, Tsikhan Natallia, Kononets Victoria, Bermagambetova Saule, Walkowiak Jarosław. *Ileal Lactase Expression Associates with Lactase Persistence Genotypes*. Nutrients 2021 : Vol. 13, nr 4, art. 1340 [s. 1-12], id. art. 1340. **IF: 6.706, Pkt: 140.**

Wkład: koncepcja pracy, wybór metod, przeprowadzenie analiz, interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu, rycin, materiałów dodatkowych. Udział procentowy: 75%.

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ) to grupa przewlekłych zapalnych schorzeń przewodu pokarmowego o wieloczynnikowej i złożonej etiopatogenezie, obejmująca wrzodziejące zapalenie jelita grubego, chorobę Leśniowskiego–Crohna i niesklasyfikowane nieswoiste zapalenie jelit. W ciągu ostatnich lat na całym świecie obserwuje się wzrost zapadalności na NChZJ, a w szczególności to zjawisko jest zauważalne w wieku rozwojowym. W Polsce na NChZJ choruje około 100 000 osób. Na podkreślenie zasługuje fakt, że około 15 do 25% przypadków NChZJ jest rozpoznawana w okresie dzieciństwa, a 4 do 10% jest diagnozowanych już poniżej 6. roku życia.

Do chwili obecnej dokładna etiopatogeneza NChZJ nie została w pełni wyjaśniona. Na podstawie prowadzonych badań stwierdzono, że dziedziczenie polimorfizmów genetycznych jest odpowiedzialne za ryzyko choroby w dość ograniczonym stopniu, a kluczowe mogą być czynniki środowiskowe, mikrobiota i modyfikacje epigenetyczne. U podłoża choroby najprawdopodobniej leżą zaburzenia odpowiedzi immunologicznej ustroju w stosunku do komensalnych drobnoustrojów przewodu pokarmowego u osób predysponowanych genetycznie. Na znaczenie immunologii w NZJ wskazywały również badania form tej choroby o bardzo wczesnym początku, które częściej mają charakter monogenowy. Rozszerzenie dostępności sekwencjonowania eksomowego pozwoliło

identyfikować kluczowe geny układu odpornościowego i bariery jelitowej, czemu zazwyczaj towarzyszyły pogłębione analizy funkcjonalne z oceną potencjału terapeutycznego. Jednak w dalszym ciągu istnieje znaczna luka pomiędzy skłonnością do dziedziczenia NZJ a częścią zmienności występowania NZJ. Uważa się, że wypełnią ją badania oddziaływań między genotypem i środowiskiem, genotypem i ekspresją genów lub białek oraz epigenomu, rozumianego jako całość poddających się modyfikacji zmian wpływających na ekspresję genów. Jednym z nowszych trendów w analizie NZJ, a także w biomedycynie ogólnie, jest profilowanie ekspresji genów. Jest to możliwe dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji. RNA jest przepisywany na cDNA, którego nie służy jako wzorec do syntezy nici komplementarnej, przy czym optycznie śledzone jest zużycie nukleotydów oznaczonych fluorescencyjnymi znacznikami. Możliwe jest analizowanie całości transkryptomu, który zawiera duże ilości RNA niekodujących białek, a także analiza transkryptów kodujących białka (mRNA/polyA-RNA), czy samych mikroRNA oraz analizowanie RNA pojedynczych komórek, które jednak ogranicza niewielka liczba odczytów na komórkę. W profilowaniu ekspresji genów coraz rzadziej stosuje się mikromacierze hybrydizacyjne, a coraz częściej bezpośrednio sekwencjonowanie całych transkryptów. Analiza danych transkryptomicznych wymaga zastosowania narzędzi matematycznych, które uwzględniają cechy rozkładu transkryptów i normalizują profile różnymi metodami.

W przedstawionych pracach wykorzystano najnowsze trendy biologii molekularnej. Istotnym osiągnięciem jest zgłębienie transkryptomów leukocytarnych w NZJ przy pomocy rozszerzonego zestawu narzędzi, który oprócz analizy różnicowej ekspresji z oceną ontologii obejmował też budowę sieci koekspresji, regresję z penalizacją i lasy losowe z walidacją krzyżową czy w testowym zestawie danych. Należy podkreślić, że samodzielnie opracowano metody, które polegają na identyfikacji binarnych biomarkerów prognostycznych i wykorzystaniu proporcji transkryptów wraz z danymi o interakcjach międzybiałkowych do wskazania potencjalnie istotnych genów. Dzięki dostępowi do danych zewnętrznych udało się również uzyskać nową wiedzę o czynnikach ryzyka powiązanych z NZJ.

Przedstawione przez Habilitanta prace do osiągnięcia naukowego jak najbardziej wpisują się w tematykę nowoczesnych metod stosowanych w aktualnie prowadzonych badaniach. Rozwój technik i generacja dużej ilości danych w tym transkryptomicznych, doprowadziła do połączenia nauk biologicznych takich jak biologia molekularna, genomika, transkryptomika, z matematyką i informatyką, prowadząc do powstania interdyscyplinarnej dziedziny nauki – bioinformatyki.

Wyniki badań uzyskane przez Habilitanta zostały przedstawione w pracach tworzących cykl

publikacji, a powstały w tym celu, aby w maksymalnym stopniu wykorzystać istniejące możliwości analityczne dla uzyskania nowej wiedzy na temat chorób jelit i dysregulacji immunologicznej.

Prace składające się na cykl powiązanych tematycznie publikacji:

„Choroby jelit i dysregulacja immunologiczna w analizach transkryptomicznych”.

Celem pierwszej pracy było kompleksowe zbadanie pełnego profilu ekspresji genów (mRNA) we krwi pacjentów z NZJ. Badanie przeprowadzono w ramach międzynarodowego projektu IBD-Character finansowanego ze środków 7. programu ramowego Unii Europejskiej, co umożliwiło diagnostykę pacjentów z różnych państw po rozpoznaniu NZJ oraz osoby, u których diagnostyka w tym kierunku dała wynik ujemny, jak również zdrowe młode osoby dorosłe. Po izolacji i ocenie jakości RNA przygotowano biblioteki, które umożliwiły sekwencjonowanie transkryptów genów kodujących białka. Uzyskane odczyty były mapowane i zliczane, a następnie znormalizowane przed dalszą analizą. Oprócz badania IBD-Character źródłem danych była praca zespołu Pana Prof. Jerzego Ostrowskiego przedstawiająca wyniki wieloośrodkowego badania polskiego (obejmującego także Klinikę Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych UMP). Połączenie badań z kilku ośrodków pozwoliło na zbadanie dużej grupy pacjentów. W artykule tym opisano pierwszą na świecie analizę transkryptomu leukocytarnego w NZJ w tak dużej skali. Przeprowadzono także analizę różnicową ekspresji genów, która wykazała w większości przypadków w NZJ nadmierną ekspresję. Najsilniejszą nadekspresję w NZJ wykazał gen *CD177 (Human Neutrophil Alloantigen 2a)* łączony z neutrofilią, jak również *OLFM4 (Olfactomedin 4)* odgrywający ważną rolę w stanie zapalnym i odnowie błony śluzowej przewodu pokarmowego. Kolejnymi badanymi genami były defensyny A, geny metaloproteinaz, a także geny kanałów 9 jonowych jak również integryna beta 4. Należy podkreślić, że wyniki różnicowej ekspresji genów, wskazały kluczowe geny zaangażowane w stan zapalny związany z ChLC oraz WZJG, ale nie udzieliły Habilitantowi odpowiedzi na istotne pytania o różnicowanie podtypów NZJ, związków przyczynowo-skutkowych w ich etiopatogenezie, a także podtrzymywaniu i nawracaniu zapalenia.

Analiza sieci koekspresji miała wykorzystać zjawisko wysokiego stopnia skorelowania części genów dla wskazania ich grup ważnych w kontekście choroby.

Wykorzystując dane transkryptomiczne z dwóch różnych badań wieloośrodkowych oraz trzy różne a zarazem wzajemnie komplementarne narzędzia inferencji aktywności ekspresji genów, a także kilkuetapową selekcję, wskazano cztery czynniki transkrypcyjne zaangażowane w proces zapalny u pacjentów z NZJ: NFE2 (*Nuclear Factor, Erythroid 2*), SPI1, CEBPB (*CCAAT Enhancer Binding Protein Beta*) i IRF2 (*Interferon 10 Regulatory Factor 2*). Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie



dla ponownego wykorzystania w NZJ leków zarejestrowanych w innych wskazaniach (np. enokizumab, przeciwciało monoklonalne przeciwko interleukinie 9).

Habilitant konsekwentnie prowadził badania poszukując przyczyn stanu zapalnego i opracował nową metodę identyfikacji genów istotnych dla analizowanego stanu (np. NZJ vs. grupa kontrolna), ale nieulegających różnicowej ekspresji.

W kolejnej analizie opracowano transkryptomiczne biomarkery przewidujące eskalację leczenia w NZJ. Eskalację zdefiniowano jako włączenie leczenia biologicznego, zabieg chirurgiczny czy zastosowanie cefalosporyny.

Habilitanta cały czas nurtowało pytanie, czy problemu prognozowania w NZJ nie da się rozwiązać znacznie prościej. Wykorzystał w tym celu porównanie metodą *bootstrap* wszystkich możliwych proporcji dwóch genów. Wyniki wskazują na związek między narażeniem na ciężki przebieg WZJG a polaryzacją makrofagów (monocytów) – co daje wgląd w mechanizmy choroby i pozwala wierzyć, że ta nowa wiedza może posłużyć zarówno do przewidywania postępu WZJG, jak i wskazania celów terapeutycznych. Pomimo ograniczeń badania, Habilitant uważa, że prezentowane wyniki są istotne biorąc pod uwagę wielkość grupy i wykorzystanie w wielu analizach zupełnie niezależnej kohorty walidacyjnej.

W drugiej publikacji przeanalizowano dane z wielośrodkowego badania IBD-Character, aby zrozumieć zależność między ciężkością przebiegu NZJ a ekspresją *ACE2* (*Angiotensin Converting Enzyme 2*) i *TMPRSS2* (*Transmembrane Serine Protease 2*), dwóch kluczowych genów związanych z zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrom coronavirus 2*). Stwierdzono, że *ACE2* ulega znacznie większej ekspresji w jelicie cienkim niż w jelicie grubym, zależy od obecności i rozległości zmian zapalnych. Ekspresja *ACE2* w jelicie grubym była także pozytywnie skorelowana z wiekiem, płcią, paleniem tytoniu, CRP i niedoborem albumin. Wyniki sugerowały, że pacjenci z NZJ będą bardziej podatni na zakażenie SARS-CoV-2 i wskazywały na możliwość wywołania zaostrzenia choroby przez COVID-19. Dostępne dane wskazywały na potrzebę ścisłej kontroli choroby w okresie pandemii, aby zminimalizować ryzyko zaostrzeń, a także minimalizować ryzyko ciężkiego przebiegu zakażenia SARS-CoV-2. Doświadczenia kliniczne i wiedza z przeprowadzonych badań stały się podstawą do wydania zaleceń przez towarzystwa naukowe, a dotyczące szczepień w NZJ i wyższą motywację pacjentów z NZJ do ich przyjmowania w porównaniu do populacji ogólnej.

Kolejne wyniki badań przedstawiono na łamach „*Gastroenterology*”. Stwierdzono związek ekspresji neuropiliny 1 (*NRP1*) z zakażeniem SARS-CoV-2 (23). Wykazano, że jelitowa ekspresja *NRP1* koreluje ze stanem zapalnym w NZJ. Oprócz tego postawiono hipotezę dotyczącą związku leków typu 5-ASA z cięższym przebiegiem NZJ, którą Habilitant oparł na analogii z płucną

nadwrażliwością na salicylany, w której pośredniczą leukotrieny cysteinylowe. Autor wnioskuje, że jeśli hipoteza ta była trafna, montelukast mógłby być pomocny nie tylko w leczeniu COVID-19 u pacjentów z NZJ przyjmujących 5-ASA, a także w szerszym kontekście. Badanie randomizowane przeprowadzone w 2022 r. u pacjentów z COVID-19 potwierdziło, że montelukast zmniejsza stan zapalny w COVID-19.

W trzeciej pracy wykorzystano uczenie maszynowe w analizie danych transkryptomicznych. W artykule opisano zastosowanie lasów losowych i regresji lasso (*least absolute shrinkage and selection operator*) dla wskazania genów w najsilniejszym stopniu związanych z rozpoznaniem NZJ. Prace te były oparte na ponownej analizie danych z badania prowadzonego przez zespół Pana Prof. Jerzego Ostrowskiego i wsp. w całej Polsce.

Celem badań było zdobycie takiej wiedzy o NZJ, która nie jest dostępna przy stosowaniu innych metod. Ważnym wstępnym potwierdzeniem wartości zastosowanej metody była identyfikacja ponad 100 genów, które już wcześniej powiązano z NZJ. Z pracy wynika kilka wniosków odnośnie biologii NZJ i metod analizy danych. Uzyskane wartości różnicowania były wysokie tylko w chorobie, która jest rozpoznana na podstawie obrazu klinicznego. Odnalezienie czułych i swoistych transkryptomicznych markerów NZJ w remisji okazało się niemożliwe. Niemniej, analiza regresją lasso pozwoliła zidentyfikować zarówno typowe geny, jak i takie, które nie są zwykle wymieniane w kontekście NZJ, a mogą mieć istotne znaczenie. Habilitant wnioskuje, że metody uczenia maszynowego z danych transkryptomicznych nawet bez istotnego treningu w danych zewnętrznych mogą dostarczyć nowego, oryginalnego spojrzenia na różnice między osobami zdrowymi i chorymi. Istotną cechą zastosowanej metody jest jednak ogromna wrażliwość na zmiany, co oznacza, że przy nawet nieznacznie odmiennych danych wejściowych geny wybrane przez algorytm mogłyby być zupełnie inne.

W kolejnej pracy Habilitant skupia się na paleniu tytoniu jako czynnika środowiskowego o najlepiej udokumentowanym związku z NZJ. Uważa że zrozumienie mechanizmów, które leżą u podłoża wpływu palenia tytoniu na NZJ może doprowadzić do odkrycia nowych terapii i sposobów prewencji. W tym opracowaniu wykorzystano zestaw danych z badania CEDAR (*Correlated Expression and Disease Association Research*) przeprowadzonego przez Yukihide Momozawę i wsp., do którego przy okazji skriningowej kolonoskopii włączono 323 zdrowe osoby. W badaniu CEDAR analizowano profile ekspresji genów w biopsjach jelita cienkiego, poprzecznicy i odbytnicy oraz izolowanych immunomagnetycznie komórkach CD4+, CD8+, CD14+, CD15+ i CD19+. Celem badania CEDAR było zrozumienie genetycznej regulacji ekspresji genów w kontekście NZJ. Analizowano dane dotyczące komórek odpornościowych osób zdrowych, porównując profile ekspresji osób palących i niepalących.

Największe różnice w profilach ekspresji genów stwierdzono w komórkach CD4+ i CD8+, podczas gdy w komórkach CD15+ takich różnic nie wykazano. Najsilniejsze różnice między palaczami i grupą kontrolną stwierdzono w limfocytach CD8+, gdzie różnicowej ekspresji ulegało 58 genów. Komórki CD4+ wskutek palenia mogą wykazywać bardziej prozapalne właściwości poprzez zwiększoną ekspresję IL-18 oraz interferonów. Spośród nich najsilniejszej wyrażona była wysoka ekspresja *LRRN3*. Rola *LRRN3* pozostaje nieznana i jest to atrakcyjny temat badawczy biologii molekularnej. Szczególną uwagę należy ponadto zwrócić na rolę lektyn (31): palenie było negatywnie związane z *KLRB1* i zaburzało ekspresję *CLEC4A* oraz *CLEC10A*. Można postawić hipotezę, że palenie zmniejsza odsetek komórek CD4+ o własnościach NK. Komórki CD4+ wskutek palenia mogą wykazywać bardziej prozapalne właściwości poprzez zwiększoną ekspresję IL-18 oraz interferonów. Na podkreślenie zasługuje rola *LRRN3* w limfocytach CD4+ i CD8+ oraz lektyn typu C jako ogniwa łączących palenie z etiopatogenezą NZJ.

Kontynuując swoje zainteresowania Habilitant skupił się na badaniach dotyczących stanu zapalnego jelit w astmie. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę procesu zapalnego w jelicie krętym u pacjentów z astmą. Interpretacja profilów ekspresji sugeruje, że w astmie są one podobne jak w ChLC, ale ze szczególnie wzmożoną aktywnością odporności wrodzonej, w tym produkcji mucyny 2. Być może jest to kluczowa zmiana, która sprawia, że proces zapalny jelita w astmie nie daje silnych objawów klinicznych i nie nawraca w postaci zaostrzeń. Uzyskane nowe wyniki są w wielu względach komplementarne z dotychczasową wiedzą o mechanizmach występowania patologii, zarówno w astmie, jak i w NZJ.

W kolejnej pracy Habilitant prowadził badania, które miały być odpowiedzią na pytanie czy polimorfizmy w *locus* genu *LCT* wpływają na jego ekspresję. Badanie wykonano ponownie w kohorcie CEDAR. Badanie było pierwszym, które w takiej skali zbadało zależność między genotypami i ekspresją *LCT* w jelicie cienkim. Potwierdzona została większa ekspresja *LCT* u osób z genotypem AA rs4988235, co odpowiada wynikom uzyskanym dzięki analizie ekspresji białka *LCT*. Natomiast znaczenie polimorfizmu rs3754689 nie jest dobrze zbadane, a wydaje się, że mógłby być on przydatny w uszczegóławianiu diagnostyki genetycznej hipolaktazji typu dorosłych w populacji europejskiej. Ciekawym i niezgłębionym problemem jest regulacja epigenetyczna genu *LCT*. Ze względu na dobrze opisaną interakcję między predyspozycją genetyczną a czynnikiem środowiskowym (regularna ekspozycja na laktozę lub jej brak) stanowi to potencjalny przedmiot dalszych badań.

Przeprowadzona analiza stanowi aktualnie najbogatsze dostępne źródło informacji o zależności między genotypem genu *LCT* a jego ekspresją w jelicie cienkim. Ponadto, zależność między

ekspresją *LCT* a *CD14* dostarcza nowych hipotez, które mogą rzucić światło na interakcje między genotypem i dietą.

Podsumowanie cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Przedstawione przez dr Jana Nowaka wyniki prowadzonych badań dostarczają nowej wiedzy na temat NZJ i ich czynnikach ryzyka poprzez zastosowanie analiz transkryptomicznych. Opracowano i zastosowano po raz pierwszy nowy algorytm, który uzupełnia analizę różnicową ekspresji genów (DRAIMI). Użyteczność tej metody potwierdziło uzyskanie wyników zgodnych z wiedzą o etiopatogenezie NZJ. Wykorzystano także nowy sposób identyfikacji prostych, binarnych biomarkerów transkryptomicznych, mających istotny potencjał zastosowania praktycznego. Wykazały one dobrą wartość prognostyczną w NZJ w sprawdzianie krzyżowym oraz podczas walidacji w testowym zestawie danych. Są to nowe podejścia analityczne, które wobec rosnącej dostępności danych mogą okazać się przydatne w przyszłości.

Wskazano czynniki transkrypcyjne o istotnym znaczeniu w NZJ: NFE2, SPI1, CEBPB i IRF2. Opisano nowe wskaźniki prognostyczne w NZJ, w tym wykorzystujący dwa transkrypty predyktor (*CLEC5A / CDH2*) mający wysoką dokładność we WZJG (AUC = 0,85 w zestawie testowym). Opisano kliniczne korelaty ekspresji genów kodujących związane z infekcją SARS-CoV-2 białka *ACE2* i *TMPRSS2* w jelicie zajęтым przez NZJ, takie jak wiek i intensywność zapalenia. Wykorzystano regresję z penalizacją do przeprowadzenia nowego typu analizy danych transkryptomicznych, która wskazała na zaangażowanie szeregu genów związanych z działaniem przeciwciał i glikozylacją. Określono swoistość komórkową głównych zmian transkryptomicznych indukowanych przez palenie w układzie odpornościowym: odkryto, że gen *LRRN3* ulega zwiększonej wskutek palenia ekspresji przede wszystkim w limfocytach CD8+ i CD4+. W kohorcie CEDAR wskazano na potencjalny związek wynikających z palenia zmian ekspresji z prognozą we WZJG poprzez białka C-lektynowe – jest to wynik pozostający w ścisłym związku markerem prognostycznym, który opracowałem w badaniu IBD-CHARACTER (*CLEC5A / CDH2*). Przeanalizowano po raz pierwszy na świecie transkryptomy błony śluzowej jelita cienkiego u pacjentów z astmą, wskazując na wykładniki zapalne i mechanizmy kompensacyjne, a także identyfikując liczne podobieństwa z ChLC. Wykonano ponadto pierwsze szczegółowe analizy korelacji genotypu i ekspresji laktazy w jelicie cienkim u osób zdrowych, wskazując słabo poznany polimorfizm rs3754689, który może uzupełniać diagnostykę genetyczną hipolaktazji dorosłych.

Uzyskane przez Habilitanta wyniki mogą być tematem do prowadzenia dalszych prac badawczych. Analizy transkryptomiczne w NZJ mogą pozwolić zidentyfikować przyczynowe oddziaływanie czynników środowiskowych w konkretnych typach komórek odpornościowych. W ten nurt wpisuje

się trwający grant SONATA pt. „Wpływ menachinonu-7 na transkryptomy leukocytarne i komórek CD4+ we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego: badanie randomizowane”. Zidentyfikowany marker transkryptomiczny ciężkości przebiegu WZJG powinien zostać prospektywnie zwalidowany metodą qPCR w niezależnej grupie pacjentów. Potrzebne są dalsze badania polaryzacji makrofagów, a także roli eozynofików i limfocytów CD4+ o własnościach komórek NK oraz innych komórek cytotoksycznych. Ważnym tematem badawczym jest związek receptorów C-lektynowych z etiopatogenezą WZJG oraz zależności między wspomnianymi receptorami, paleniem i innymi chorobami autoimmunologicznymi. Wyjaśnienia wymaga rola *LRRN3* w komórkach CD8+ i CD4+. Na podstawie analiz transkryptomicznych można też postawić konkretne pytania o stan jelita cienkiego w astmie: o intensywność zapalenia i zdolność komórek Panetha do znoszenia stresu wynikającego z przypuszczalnie intensywniejszej pracy, a także o kliniczne znaczenie tych zagadnień. Tematem osobnych analiz mogą być też wartość zaproponowanej metody analitycznej DRAIMI oraz binarnych biomarkerów transkryptomicznych w ogólności. Przeprowadzone z udziałem Habilitanta analizy przyniosły nową wiedzę i pozwoliły zadać szereg nowych pytań badawczych, szczególnie w obszarze chorób przewodu pokarmowego i zaburzeń funkcji układu odpornościowego.

Reasumując stwierdzam, że oceniany cykl publikacji pt: „**Choroby jelit i dysregulacja immunologiczna w analizach transkryptomicznych**” wskazany przez Habilitanta dr Jana Nowaka jako osiągnięcie naukowe, spełnia ustawowe kryteria będące podstawą rozpraw naukowych na stopień doktora habilitowanego. Pionierskie badania dostarczają nowej wiedzy na temat NZJ i ich czynnikach ryzyka poprzez zastosowanie analiz transkryptomicznych.

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale również praktyczne. Uważam, że mogą się przyczynić do udoskonalenia metod diagnozowania oraz leczenia pacjentów z chorobami jelit.

Należy podkreślić, że Habilitanta cechuje duża konsekwencja w pracy naukowej oraz umiejętność współpracy zespołowej. Umiejętności te nabył pracując w Zespole pod kierownictwem Prof. Jarosława Walkowiaka, uznanego eksperta w dziedzinie diagnostyki i leczenia schorzeń przewodu pokarmowego.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo- badawczych

Zainteresowania naukowe Habilitanta skupiają się głównie na takich zagadnieniach jak: genetyka, prognozowanie i markery diagnostyczne NZJ, niedobór witaminy K i rola genu *RUNX3* (*RUNX Family Transcription Factor 3*) w NZJ, badania nowych form suplementacji witamin i

charakteru miażdżycy przedklinicznej w mukowiscydozie, zastosowanie cholangiopankreatografii rezonansu magnetycznego i profilowania ekspresji genów, a także badania wykładników stanu zapalnego i odżywienia w mukowiscydozie, badania precyzji diagnostycznej badań krwi włósniczkowej w ostrej bieguncie, aktywności akustycznej przewodu pokarmowego, choroby refluksowej przełyku, próby nowatorskiego użycia optycznej tomografii koherencyjnej w szeregu chorób, jak również badania dotyczące żywienia i analizy publicznie dostępnych zestawów danych w medycynie.

W ramach wyjazdu do Institut IMAGINE w Paryżu (NCN ETIUDA) dr Nowak pracował pod kierownictwem Prof. Nadine Cerf-Bensussan i Prof. Franka Rueemmele nad genetycznymi uwarunkowaniami NZJ o bardzo wczesnym początku. Natomiast przeprowadzone później badania molekularne potwierdziły, że zmiana ta była odpowiedzialna za chorobę. W wyniku tej współpracy powstały publikacje w wysoko punktowanych pismach, w których Habilitant był współautorem.

We współpracy z zespołem z Uniwersytetu w Oksfordzie oraz Uniwersytetu w Edynburgu i w oparciu o kohortę IBD-Character Habilitant uczestniczył w analizowaniu danych z sekwencjonowania miRNA, aby opracować marker prognostyczny i zrozumieć biologiczne znaczenie głównych wyników uzyskiwanych w analizie miRNA.. Dr J. Nowak uczestniczył w badaniach prowadzonych w Klinice Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych, które wykazały, że nosicielstwo HLA-DQA1*05 jest związane z poważniejszym obrazem NZJ już przy rozpoznaniu. Sugeruje to, że pacjenci z HLA-DQA1*05 mają cięższy przebieg choroby, z czego przypuszczalnie wynika łatwość tworzenia przeciwciał przeciwko infliksymabowi. W zespole Kliniki prowadzone były również prace nad genem *RUNX3*, który, został wskazany jako szczególnie ciekawy w metylacji w NZJ oraz badania biomarkerów kałowych w bieguncie i NZJ. Wiodącym tematem zainteresowań Kierownika Kliniki Prof. J. Walkowiaka jest problematyka mukowiscydozy. Habilitant aktywnie uczestniczył w pracach prowadzonych przez Zespół. Brał udział w badaniach oceniających występowanie niedoboru witaminy K oraz innych witamin rozpuszczalnych w tłuszczach u dzieci z mukowiscydozą oraz z NZJ. W ramach prowadzonego przez Prof. Jarosława Walkowiaka grantu NCN OPUS badano wykładniki przedklinicznej miażdżycy w mukowiscydozie. Habilitant był współautorem w trzech pracach, w których wykazano, że dyslipidemia związana z mukowiscydozą jest heterogenna oraz udowodniono występowanie przedklinicznej miażdżycy w mukowiscydozie.

Ponadto uczestniczył w prowadzonych w Klinice badaniach nad wartością podania sekretyny w trakcie cholangiopankreatografii wstecznej u pacjentów z mukowiscydozą, oznaczanie ekspresji genów, badania nad korelatami klinicznymi stężeń białek związanych ze stanem zapalnym i stanem odżywienia w mukowiscydozie.

Od kilku lat Habilitanta interesuje także rejestracja i automatyczna analiza dźwięków jelitowych, co doprowadziło do uzyskania grantu uczelnianego (UMP), a następnie wstępnych prac badawczo-rozwojowych samodzielnych i we współpracy w firmą EPS z Poznania.

Habilitant wykorzystując publiczną dostępność danych, próbował odpowiedzieć na pytanie o preferencje wyboru specjalizacji przez młodych lekarzy w Polsce. W kolejnych latach wraz z zainteresowanymi studentami sprawdzali, jakie są cechy najbardziej popularnych artykułów naukowych w medycynie.

Granty naukowe

Dwa zakończone granty (po doktoracie)

1. Wykorzystanie metod *omics* dla zrozumienia nieswoistych zapaleń jelit. Kierownik, grant UMP dla wybitnych młodych naukowców „ProScience” (2020-2022)
2. Aktywność akustyczna przewodu pokarmowego jako parametr życiowy. Kierownik (2018-2019)

Aktualnie Kierownik 2 grantów (od 2021r)

1. Wpływ menachinonu-7 na transkrypty leukocytarne i komórek CD4+ we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego: badania randomizowane. SONATA.
2. Ocena zmian mikrobioty jelitowej dzieci z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego pod wpływem glutaminy metodą sekwencjonowania nanoporowego – badania randomizowane. Biocodex Microbiota Foundation (Francja).

Aktywność naukowa realizowana w innej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

W 2019 roku odbył 3-miesięczny pobyt w Translational Gastroenterology Unit, University of Oxford, Wielka Brytania – opiekun Dr Alex Adams. Pracował w grupie Prof. Jacka Satsangi – przeprowadzono analizy danych multi-omicznych w nieswoistych zapaleniach jelit, z głównym naciskiem na transkryptom.

W 2018 roku był na miesięcznym szkoleniu w zakresie manometrii wysokiej rozdzielczości w Hôpital Édouard-Herriot, Université Claude Bernard Lyon 1, Francja – Prof. François Mion i Dr Sabine Roman – European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) International Exchange Award.

Przed Doktoratem w 2016 roku odbył 4.5-miesięczny staż w IMAGINE Institute/Hôpital Necker-Enfants Malades w Paryżu, pod opieką Prof. Nadine Cerf-Bensussan i Prof. Franka Ruemmele

pracował nad genetycznymi uwarunkowaniami NZJ o wczesnym początku. Przeprowadzał analizę eksomu i danych z sekwencjonowania nowej generacji w gastroenterologii dziecięcej. Otrzymał stypendium ETIUDA NCN (przedłużony ze środków statutowych Kliniki).

Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne oraz popularyzujące naukę

Habilitant od początku pracy w UMP prowadzi zajęcia z pediatrii w ramach przedmiotu pediatria dla studentów III i V r. kierunku lekarskiego. Od roku akademickiego 2021/2022 pełni funkcję jednego z koordynatorów zajęć anglojęzycznych z pediatrii w Instytucie Pediatrii UMP. Prowadził fakultet z metodologii badań naukowych w medycynie oraz aktualnie prowadzi zajęcia z metodyki badań naukowych na I r. kierunku lekarskiego. Jest opiekunem studenckiego koła naukowego gastroenterologii dziecięcej. W latach 2008-2011 był członkiem Senatu UMP, a w latach 2007-2009 pełnił funkcję Zastępcy Przewodniczącego Rady Uczelnianej Samorządu Studenckiego UMP.

W latach 2007-2015 przygotował ponad 400 notatek o medycznych aktualnościach naukowych – początkowo dla gazety studentów „Puls UM”, a następnie dla portali internetowych wydawnictwa Termedia. Współpracował też z Termedia w zakresie identyfikacji medycznych książek zagranicznych do wydania na rynku polskim.

Promotor pomocniczy: w dwóch realizowanych doktoratach.

Recenzowanie prac dla czasopism naukowych: Habilitant recenzował bardzo dużo różnych prac, także w pismach z wysokim IF i tak np.: Gastroenterology (IF = 33.883), IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics (IF = 7.021), International Journal of Molecular Sciences (IF = 6.208), International Journal of Molecular Sciences (IF = 6.208), Journal of Cystic Fibrosis (IF = 5.527), Nutrients (IF = 6.706), Polish Archives of Internal Medicine (IF = 5.218), World Journal of Pediatrics (IF = 9.186).

Nagrody i wyróżnienia:

Z Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci otrzymał w 2023 r. indywidualną nagrodę za oryginalną publikację (za lata 2020-2021), a w 2014 roku wyróżnienie za prezentację gastroenterologiczną.

Dwukrotnie otrzymał indywidualną nagrodę naukową JM Rektora UM w Poznaniu (w 2023 i 2017 r.).

W 2020 i 2017 roku - nagroda dla młodych naukowców ESPGHAN, a w 2015 r. nagroda dla młodych naukowców Europejskiego Towarzystwa Mukowiscydozy. W 2018 roku nagroda dla naukowców Europejskiego Towarzystwa Mukowiscydozy oraz w 2022 roku zespołowa nagroda dla

Polskiego Towarzystwa Mukowiscydozy. W 2018 roku otrzymał indywidualną nagrodę drugiego stopnia Ministra Zdrowia. Otrzymał stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców oraz stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów. Był także wyróżniony przez władze miasta nagrodą miasta Poznania dla młodych badaczy ze środowiska poznańskiego.

Członkostwo w towarzystwach naukowych

2019- Polskie Towarzystwo Bioinformatyczne

2018- European Society of Neurogastroenterology and Motility

2017- Polskie Towarzystwo Pediatryczne

2015- European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (EPSGHAN)

2014- Polskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci (od 2023 r. członek Zarządu Głównego)

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że zarówno cały dorobek naukowy, jak i cykl publikacji stanowiących podstawę do ubiegania się o tytuł naukowy doktora habilitowanego, a także działalność dydaktyczna, organizacyjna oraz duża umiejętność współpracy naukowej, jak najbardziej spełniają kryteria pozytywnej oceny w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego dr n. med. Janowi Krzysztofowi Nowakowi w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne i są zgodne z wymaganiami określonymi w art. 219 ust.1 pkt.2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. z 2021 poz 478 ze zm.

W związku z tym mam wielki zaszczyt i przyjemność przedstawić Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wniosek o dopuszczenie dr n.med. Jana Nowaka do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Pac-Kozuchowska



Kierownik
Kliniki Pediatrii i Gastroenterologii
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Pac-Kozuchowska

