Załącznik nr 2 do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

Makandjou-Ola Wabi Eusebio

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
II Katedra Chorób Wewnętrznych
Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2015

SPIS TREŚCI

1. Dane osobowe: Imię i Nazwisko *str. 3*

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej *str. 3-4*

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych *str.4-5*

4. Wskazane osiągnięcie 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.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego *str. 6-8*

b) autorzy, tytuł, rok wydania, nazwa wydawnictwa *str. 6-8*

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania *str.9-19*

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

a) Dane bibliometryczne **str. 19**

b) Inne kierunki prowadzonych badań **str.19-22**

c) Udział w projektach badawczych **str.22-23**

d) Nagrody za działalność naukową **str.23**

e) Informacja o osiągnięciach dydaktycznych **str.23**

f) Członkostwo w organizacjach i towarzystwach naukowych **str.23-24**

g) Działalność ekspercka- Recenzowanie publikacji **lub** rozdziałów, książek **str.24**

I. Dane osobowe

1. Imię i nazwisko: Makandjou-Ola Wabi Eusebio

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

- **2011:** Stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie medycyny. Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Tytuł pracy doktorskiej: "Potencjał terapeutyczny regulatorowych limfocytów T, $CD8^+$ u chorych z ciężką astmą oskrzelową", promotor: dr hab. n. med. prof. nadzw. Mirosława Pietruczuk.
- **2009-2011:** Studia doktoranckie, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
- **2009:** dyplom MD i tytuł zawody lekarza uzyskany na Wydziale Wojskowo-Lekarskim, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
- **2008**: Świadectwo ukończenia studiów podyplomowych: Zarządzanie w usługach Medycznych o specjalności Systemy Zdrowotne, Wydział Nauki Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
- **2008:** Master of Public Administration in Health Systems. Clark University, Worcester, Massachusetts, Subdivision in Lodz, Poland.
- **2002:** Bachelor degree in Microbiology, Department of Molecular Biosciences, Section of Molecular Genetics and Microbiology, University of Texas at Austin.
- **1992-1997:** Etudes Doctorat d'Etat en Médecine générale (nie zakonczone), Faculté de Médecine de l'Université de Niamey (obecne Université Abdou Moumouni de Niamey).

- **1990:** Baccalauréat Série D, Office du baccalauréat, Université du Benin (obecne Université de Lomé), Lomé-Togo.

Pozostałe formy kształcenia

- **2003:** Certified Pharmacy Technician, Austin community College.
- **2003:** Registered Public Notary State of Texas.
- **2003:** Certified Guardian Ad Litem- Travis County, State of Texas.
- **1999:** Certified Medication Aide, Austin community College.

Uczestniczyłem również w następujących kursach doskonalących, szkoleniach:

- **2014:** Expert Consensus on Safe Laboratory Test Ordering and Results Management Systems in European Primary Care. NHS Education for Scotland, Glasgow, Scotland, United Kingdom.
- **2012/2013:** "Szkolenia z zakresu metodyki nauczania", Centrum Edukacji Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
- **2011:** Research methodology, University of Basel, Switzerland.
- **2010:** Patient Safety, University of Basel, Switzerland.
- **2009:** VIII Szkoła Cytometrii Przepływowej, Becton Dickinson, Serock.
- **2001:** Methods for synchronizing cells, Austin, Texas, USA.
- **2001:** Confocal microscopy analysis, Austin, Texas, USA.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- **01.10.2013:** adiunkt, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
- **01.10.2011–30.09.2013:** asystent, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.
- **01.09.2009:** młodszy asystent, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. Norberta Barlickiego w Łodzi.
- **01.09.1999–02.02.2002:** Research Engineer/ Scientist Associate: Department of Molecular Biosciences, Section of Immunology and Microbiology, University of Texas at Austin.
- **01.09.1999–02.02.2002**: Tutor/Mentor, Corporation for National and Community Service, Austin, Texas, USA.

Inne zatrudnienia

- **01.01.2004–31.10.2005:** House Supervisor, Texas Department of Aging and Disability Services (DADS), Austin, Texas, USA.
- **01.09.2002–31.12.2003**: Certified medication administrator, Texas Department of Mental Health and Mental Retardation (MHMR) (obecne DADS), Austin, Texas, USA.
- **07-1997-05-2001**: Certified Medication Technician, Garden Terrace Health and Rehabilitation Center, Austin, Texas, USA.

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,):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

"Przydatność oznaczania ekspresji FoxP3 i stężenia FENO jako panelu badań do diagnozowania i monitorowania leczenia astmy."

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuł publikacji, rok wydania , nazwa wydawnictwa):

1. **Eusebio M,** Kuna P, Kraszula L, Kupczyk M, Pietruczuk M. The relative values of $CD8^{+}CD25^{+}FOXP3^{brigh}$ Treg cells correlate with selected lung function parameters in asthma. Int J Immunopathol Pharmacol. 2015; DOI: 10.1177/0394632015584508. (IF= 2,507; 5YIF=2,18; MNiSW=20). Mój wkład pracy oceniam na 70%. Mój wkład pracy obejmuje: pomysł naukowy problemu badawczego, zaplanowanie badania, zebranie grupy pacjentów, zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

2. **Eusebio M**, Kuna P, Kraszula L, Kupczyk M, Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of $CD8^{+}CD25^{+}FoxP3(^{brigh})$ Treg cells and FoxP3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF-beta. J Biol Regul Homeost Agents. 2014; 28(3):461-70. (IF=2,406; 5YIF=3,33; MNiSW=20). Mój wkład pracy oceniam na 70%. Mój wkład pracy obejmuje: pomysł naukowy problemu badawczego, zaplanowanie badania, zebranie grupy pacjentów, zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

3. **Eusebio M,** Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. Comparison of changes in the percentages of $CD8^{+}CD28^{-}TCR^{alpha\text{-}beta+}$ T cell subpopulations in allergic asthma subjects vs. controls before and after anti-CD3/anti-CD28/IL-2 stimulation in vitro. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27(4):969-79. (IF=2,406; 5YIF=3,33; MNiSW). Mój wkład pracy oceniam na 70%. Mój wkład pracy obejmuje: pomysł naukowy problemu badawczego, zaplanowanie badania, zebranie grupy pacjentów, zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

4. **Eusebio M**, Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. The effects of interleukin-10 or TGF-beta on anti-CD3/CD28 induced activation of $CD8^{+}CD28^{-}$ and $CD8^{+}CD28^{+}$ T cells in allergic asthma. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27(3):681-92. (IF=2,406; 5YIF=3,33; MNiSW). Mój wkład pracy oceniam na 70%. Mój wkład pracy obejmuje: pomysł naukowy problemu badawczego, zaplanowanie badania, zebranie grupy pacjentów, zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

5. **Eusebio M,** Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. Low frequency of $CD8^{+}CD25^{+}FOXP3^{BRIGH}$ T cells and FOXP3 mRNA expression in the peripheral blood of allergic asthma patients. J Biol Regul Homeost Agents. 2012; 26(2):211-20. (IF ; 5YIF= 3,33 ; MNiSW=20). Mój wkład pracy oceniam na 70%. Mój wkład pracy obejmuje: pomysł naukowy problemu badawczego, zaplanowanie badania, zebranie grupy pacjentów, zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

6. Pietruczuk M, **Eusebio M**, Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P. Phenotypic characterization of ex vivo $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$ immune regulatory T cells in allergic asthma: pathogenesis relevance of their FoxP3, GITR, CTLA-4 and FAS expressions. J Biol Regul Homeost Agents. 2012; 26(4):627-39. (IF ; 5YIF=3,33; MNiSW=20). Mój wkład pracy oceniam na 40%. Mój wkład pracy obejmuje: zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie pracy do druku.

7. Grzelewski T, Majak P, Jerzyńska J, Stelmach W, Stelmach R, Janas A, Grzelewska A, Witkowski K, **Makandjou-Ola E,** Stelmach I. The interpretation of exhaled nitric oxide values in children with asthma depends on the degree of bronchoconstriction and the levels of asthma severity. Respir Care. 2014; 59(9):1404-11. (IF=1,840; 5YIF=1,98; MNiSW=20). Mój wkład pracy oceniam na 30%. Mój wkład pracy obejmuje: zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie fragmentu manuskryptu do druku.

8. Grzelewski T, Witkowski K, **Makandjou-Ola E,** Grzelewska A, Majak P, Jerzyńska J, Janas A, Stelmach R, Stelmach W, Stelmach I. Diagnostic value of lung function parameters and FeNO for asthma in school children in large. real life population. Pediatr Pulmonol. 2014; 49(7):632-40. (IF=2,297; 5YIF=2,18; MNiSW=25). Mój wkład pracy oceniam na 30%. Mój wkład pracy obejmuje: zebranie danych, opracowanie wyników badań oraz przygotowanie fragmentu manuskryptu do druku.

Łączna punktacja 8 prac zgłaszanych jako osiągnięcie wynosi: IF=13,862; MNiSW=125

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

Z danych Polskiego Towarzystwa Alergologicznego wynika, że w Polsce częstość występowania astmy wynosi 5,4% u dorosłych i około 8,6% u dzieci. Oszacowano, że w Polsce na astmę choruje 2 mln dorosłych i ponad 1 mln dzieci. Zarówno w Polsce jak i na świecie, astma wiąże się ze znacznymi kosztami społecznymi i ekonomicznymi (cierpienie pacjentów, niezdolność do pracy, opuszczone dni w szkole, pobyty w szpitalu, leki, wypłaty zasiłków chorobowych itp).

Początkowo hipoteza zakładała, że ograniczenia wydechowego przepływu powietrza występujące w zaostrzeniu astmy, dotyczą tylko centralnych dróg układu oddechowego. Obecnie uważa się, że ten proces dotyczy także drobnych dróg oddechowych. Do oceny zaburzeń funkcji płuc, powszechnie stosuje się spirometrię oraz monitorowanie szczytowego przepływu powietrza. W ostatnich kilku dekadach ewidentne dowody pokazały, że większość parametrów oceniających funkcję płuc, takich jak szczytowy przepływ wydechowy (PEF), natężona objętość wydechowa pierwszo sekundowa (FEV_1), nie są niezawodne i nie gwarantują oceny zaburzenia funkcji mniejszych dróg układu oddechowego i nie uwzględniają różnorodności osobniczej. Te ograniczenia są przyczyną około 30% fałszywie zdiagnozowanych i 54% nie zdiagnozowanych pacjentów z astmą.

Dodatkowo u pacjentów z umiarkowaną i źle kontrolowana astmą, często występują normalne parametry oddechowe. Ponadto, PEF nie zawsze wskazuje na stopień ciężkości astmy a szczytowy przepływ wydechowy niedokładnie odzwierciedla niewielkie zmiany zapalne układu oddechowego.

Oczekiwania kliniczne oraz fakty dotyczące stosowanych metod diagnostycznych w astmie, motywują do poszukiwań lepszych strategii oceny ograniczenia przepływu powietrza w drogach oddechowych. Jako próbę rozwiązania tego problemu, oznacza się kilka nieinwazyjnych markerów procesu zapalnego w drogach oddechowych, takich jak stężenie w surowicy eozynofilowego kationowego białka (ECP) oraz zawartość gazów w wydychanym powietrzu. Nie ma jednak złotego standardu, do oceny ograniczeń przepływu w małych drogach układu oddechowego.

Dotychczasowe doniesienia dotyczące regulatorowych limfocytów T (Treg), w zachowaniu równowagi i tolerancji immunologicznej, okazały się obiecujące w astmie ze względu na ich wartość diagnostyczną. Głównym problemem w badaniach nad tymi komórkami jest mała ich liczba u ludzi w porównaniu np. do szczurów i utrata markerów jednoznacznie opisujących wszystkie komórki regulatorowe. Dlatego w pierwszej publikacji z serii dotyczącej regulatorowych limfocytów T, ocenialiśmy przydatność wielokolorowej (8) kolorowej cytometrii przepływowej do oceny regulatorowych limfocytów T (*Pietruczuk M, **Eusebio M**, Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P. Phenotypic characterization of ex vivo $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$ immune regulatory T cells in allergic asthma: Pathogenesis relevance of their FoxP3, GITR, CTLA-4 and FAS expressions. J Biol Regul Homeost Agents. 2012; 26 (4): 627-39).*

Nasze badania pokazały, że 8 kolorowa cytometria przepływowa jest bardzo dobrą techniką do oceny populacji tych komórek. Aby potwierdzić, że mamy do czynienia z limfocytami regulatorowymi, dodatkowo oznaczano *mRNA* czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w limfocytach T, $CD4^{+}$, metodą *RT-PCR*. Wyniki naszych badań pokazały, że liczba całkowita oraz odsetki $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ komórek Treg, były znamiennie niższe w astmie w porównaniu do grupy kontrolnej.

U pacjentów z ciężką postacią astmy oskrzelowej stwierdzono w regulatorowych limfocytach T $CD4^+$, obniżone stężenie mRNA dla czynnika transkrypcyjnego FOXP3, w porównaniu do pacjentów z umiarkowaną postacią tej choroby. Należy podkreślić, że głównym osiągnięciem w przeprowadzonych badaniach nad regulatorowymi limfocytami T, była możliwość ich oceny ze stosunkowo małej objętości krwi. Wieloparametrowa analiza przy użyciu monoklonalnych przeciwciał znakowanych fluorochromami, pozwoliła na jednoczesną ocenę wielu markerów regulatorowych limfocytów T, zarówno na ich powierzchni, jak i w cytoplazmie i jądrze. Zastosowanie znakowanych fluorochromami przeciwciał monoklonalnych, do wykrywania markerów wewnątrz cytoplazmy i jądra, jak FoxP3 oraz na powierzchni komórek (CD4, CD25, CD127, GITR, CTLA-4, Fas, CD69), pozwoliło za pomocą 8 kolorowej cytometrii przepływowej, na zróżnicowanie tych komórek z innymi subpopulacjami limfocytów T, prezentującymi podobne antygeny różnicowania. W przedstawionej pracy opisaliśmy szybką i efektywną metodę analizy regulatorowych limfocytów T.

Limfocytom regulatorowym, $CD8^+$, poświęcono znacznie mniej uwagi niż limfocytom regulatorowym $CD4^+$. Należy podkreślić, że dane literaturowe dotyczące regulatorowych limfocytów T, w chorobach alergicznych i procesach zapalnych są nieliczne. Doniesień dotyczących regulatorowych limfocytów T, $CD8^+$, jest niewiele i często są one kontrowersyjne. W odróżnieniu od naturalnych limfocytów regulatorowych (Treg), $CD4^+$, pochodzących z grasicy, doniesienia dotyczące $CD8^+$ nTregs są sprzeczne. Część badaczy uważa, że Tregs, $CD8^+$ są indukowane na obwodzie poprzez stymulację środowiska. Inni badacze uważają, że regulatorowe limfocyty T, $CD8^+$, pochodzą z naturalnych tymocytowych regulatorowych limfocytów $CD8^+$ lub też są indukowane we krwi obwodowej z dziewiczych lub efektorowych (adaptywnych)

limfocytów. Uważa się również, że tak jak limfocyty Treg, regulatorowe $CD4^+$, limfocyty T, $CD8^+$, wykazują ekspresję FoxP3, CTLA-4, a ich funkcja supresyjna jest zależna od bezpośredniego kontaktu komórka-komórka. Największym wyzwaniem w badaniach nad tymi komórkami, jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, jak tak mała subpopulacja komórek jest w stanie kontrolować znacznie większą populację limfocytów zarówno we krwi obwodowej jak i w tkankach. Uważa się, że determinuje to pik aktywności komórek efektorowych, w odpowiedzi immunologicznej. Nieliczne badania dotyczące limfocytów Treg, $CD8^+$, sugerują ich specyficzność narządową, a ich funkcja ma być zależna od rodzaju patogenu (wirusy, bakterie), oraz rodzaju choroby (alergie, choroby autoimmunologiczne, nowotwory). Te koncepcje wymagały potwierdzenia w modelach badawczych, ze względu na sugerowany duży potencjał limfocytów Treg $CD8^+$ w kontroli odpowiedzi immunologicznej.

Dlatego w swoich badaniach, przy użyciu 8-kolorowej cytometrii przepływowej oceniłem czy populacja limfocytów T, $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ oraz ekspresja mRNA dla czynnika transkrypcyjnego FoxP3 zależą od stopnia ciężkości astmy. Wykazałem, że subpopulacja limfocytów T, $CD8^+CD25^+FoxP3^+$ jest znamiennie obniżona u chorych na astmę, w tym ekspresja mRNA dla czynnika transkrypcyjnego FOXP3 była znamiennie niższa u chorych z astmą ciężką. Wykazałem również dodatnią korelację pomiędzy ekspresją FoxP3 w regulatorowych limfocytach T, $CD8^+$ i FEV_1, co z kolei wskazuje, że ocena ekspresji FoxP3 jest dobrym parametrem do monitorowania przebiegu i leczenia astmy, *(**Eusebio M,** Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. Low frequency of $CD8^+CD25^+FOXP3^{BRIGH}$ T cells and FOXP3 mRNA expression in the peripheral blood of allergic asthma patients. J Biol Regul Homeost Agents. 2012; 26(2):211-20).*

Zaburzenia regulatorowych limfocytów T, zarówno ilościowe jak i funkcjonalne, prowadzą do chorób immunonologicznych. Poznanie mechanizmów działania populacji tych komórek wydaje się być w przyszłości dobrym celem diagnostyki i oceny potencjału terapeutycznego tych komórek w astmie.

Dlatego opracowaliśmy eksperymentalny protokół, pozwalający na izolację z ludzkiej krwi obwodowej, limfocytów T, $CD8^+$ oraz ich hodowlę *in vitro* po stymulacji przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3 i anti-CD28 w obecności egzogennej IL-2. *(**Eusebio M**, Kraszula L Kupczyk M, Kuna P Pietruczuk M. Comparison of changes in the Percentages of $CD8^+CD28^-TCR^{alpha/beta}$ T cell subpopulations in subjects allergic asthma vs. controls before and after anti-CD3 / anti-CD28 / IL-2 stimulation in vitro. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27 (4): 969-79) (**Eusebio M**, Kuna P Kraszula L Kupczyk M, Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of $CD8^+CD25^+$ FoxP3 (^{brigh}) Treg cells and expression of FoxP3 mRNA in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF-beta. J Biol Regul Homeost Agents. 28 (3): 461-70).*

W przeprowadzonych badaniach oceniałem subpopulacje limfocytów T, $CD8^+CD28^+$ i $CD8^+CD28^-$, ponieważ te populacje limfocytów $CD8^+$ są istotne zarówno w procesie tolerancji immunologicznej jak i w chorobach alergicznych. W swoich badaniach wykazałem, że u chorych z astmą oskrzelową dominują limfocyty $CD8^+CD28^-$, zaś obniżona jest subpopulacja limfocytów $CD8^+CD28^+$. Wykazałem również, że stymulacja hodowli tych komórek za pomocą IL-10 prowadzi do obniżenia subpopulacji limfocytów $CD8^+CD28^-$ u chorych z astmą ciężką. Populacja ta wzrasta u chorych z astmą łagodną. Wykazałem również, że stymulacja hodowli tych komórek za pomocą TGF-β prowadzi do obniżenia subpopulacji $CD8^+CD28^-$, *(**Eusebio M**, Kraszula*

L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. The effects of interleukin-10 or TGF-beta on anti-CD3/CD28 induced activation of $CD8^+CD28^-$ and $CD8^+CD28^+$ T cells in allergic asthma. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27(3):681-92).

W kolejnych badaniach oceniałem subpopulację limfocytów $CD8^+CD28^-$, z ekspresją receptora TCR $^{alfa/beta}$ oraz CD62L i FoxP3. W badaniach tych wykazałem, że u pacjentów z astmą ciężką, występuje wzrost odsetka limfocytów $CD8^+CD28^+TCR^{alfa/beta+}CD62L^+FoxP3^+$. Stymulacja tych komórek w obecności IL-10 lub TGF-β, wpływa na obniżenie odsetka tych komórek u chorych z astmą ciężką. Wyniki moich badań sugerują również, że ekspresja zarówno CD62L jak i FoxP3 jest istotna dla funkcjonowania populacji limfocytów $CD8^+CD28^+$ *(**Eusebio M,** Kraszula L, Kupczyk M, Kuna P, Pietruczuk M. Comparison of changes in the percentages of $CD8^+CD28^-$ $TCR^{alpha-beta+}$ T cell subpopulations in allergic asthma subjects vs controls before and after anti-CD3/anti-CD28/IL-2 stimulation in vitro. J Biol Regul Homeost Agents. 2013; 27(4):969-79).*

W swoich badaniach wykazałem, że kostymulacja populacji wysortowanych limfocytów $CD8^+CD25^+$ za pomocą IL-10 i TGF-β, prowadzi do wzrostu ekspresji *mRNA* dla FoxP3 i populacji limfocytów regulatorowych $CD8^+CD25^+FoxP3^+$. Uzyskane wyniki badań sugerują, że zarówno IL-10 jak i TGF-β, mają modulujący wpływ na ekspresję *mRNA* czynnika transkrypcyjnego FOXP3 w regulatorowych limfocytach T, $CD8^+$, co może być użyteczne w strategii wykorzystania tych komórek w celu diagnostyki i monitorowania leczenia astmy, *(**Eusebio M**, Kuna P, Kraszula L, Kupczyk M, Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of $CD8^+CD25^+FoxP3^{(brigh)}$ Treg cells and FoxP3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF-beta. J Biol Regul Homeost Agents. 28(3):461-70).*

W kolejnych przeprowadzonych badaniach wykazałem zależność pomiędzy subpopulacją limfocytów regulatorowych $CD8^+CD25^+FoxP3^+$, a wybranymi parametrami oceniającymi funkcję płuc. W badaniach tych wykazałem, że odsetek regulatorowych limfocytów T, $CD8^+$ koreluje z PEF (szczytową objętością wydechową), zarówno w ciężkiej jak i łagodnej postaci astmy. Uzyskane wyniki badań sugerują, że subpopulacja regulatorowych limfocytów T, $CD8^+$, $FoxP3^+$ jest również potencjalnym markerem do oceny zaburzeń funkcji płuc, w tym zaburzeń przepływu powietrza, *(**Eusebio M,** Kuna P, Kraszula L, Kupczyk M, Pietruczuk M. The relative values of $CD8^+CD25^+FOXP3^{brigh}$ Treg cells correlate with selected lung function parameters in asthma. Int J Immunopathol Pharmacol. 2015, DOI: 10.1177/0394632015584508).*

Pomimo coraz lepszego poznania patomechanizmów powstawania chorób alergicznych i astmy oraz wprowadzania coraz doskonalszego leczenia, w ciągu ostatnich lat częstość występowania ciężkiej postaci astmy wyraźnie wzrasta.

Monitorowanie leczenia astmy, szczególnie w grupie niemowląt i małych dzieci jest wyzwaniem, ze względu na brak możliwości uzyskania informacji bezpośrednio od małego pacjenta oraz występowanie działań niepożądanych stosowanej terapii sterydowej. Dlatego stale poszukuje się zarówno nowych możliwości wykrywania jak i leczenia i monitorowania astmy, szczególnie u małych dzieci. Przegląd współczesnych możliwości, został omówiony w pracy: *(**Eusebio M,** Grzelewski T, Pietruczuk M, Lewandowska B, Stelmach I. The patents on glucocorticosteroids and selected new therapies for the management of asthma in children. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2011;5(1):57-65).*

Astma jest przewlekłą chorobą zapalną, charakteryzującą się nadwrażliwością dróg oddechowych, procesem zapalnym oraz obecnością komórek zapalnych w

drogach oddechowych. Faktem jest wzrost zainteresowania prostymi metodami do oceny procesu zapalnego w drogach oddechowych. Do tej pory proponowanych jest kilka testów, w tym oznaczanie eozynofilowego białka kationowego (ECP) w surowicy i plwocinie, ocenę kondensatu powietrza wydychanego i frakcji wydychanego tlenku azotu (FENO). Od kilku lat oznaczanie stężenia tlenku azotu w powietrzu wydychanym jest traktowane jako najbardziej zasadne, w monitorowaniu przebiegu astmy.

Brak było badań dotyczących klinicznego znaczenia pomiaru poziomu tlenku azotu w wydychanym powietrzu u dzieci chorych na astmę. Aby ocenić wartość kliniczną oznaczeń poziomu tlenku azotu w wydychanym powietrzu u dzieci chorych na astmę, przeprowadziliśmy retrospektywne badania w grupie 405 dzieci, w wieku 6-18 lat, w oparciu o dokumentację medyczną.

Stwierdziliśmy, że poziom wydychanego tlenku azotu (FENO), wzrastał wraz z wiekiem chorego dziecka. Zaobserwowaliśmy również, niższe wartości FEV_1 u dzieci z wyższym poziomem FENO, ale tylko do jego stężenia 35,4 ppb. Zauważyliśmy, że u dzieci o wyższym poziomie FENO w wydychanym powietrzu (> 35,4 ppb), natężona objętość wydechowa pierwszo sekundowa, również wzrastała. Wykazaliśmy również, że u dzieci z astmą łagodną, występował liniowy wzrost pomiędzy działaniem, salbutamolu (400 µg) a wzrostem FEV_1, odwrotnei do poziomu wydychanego FENO.

Przeprowadzona analiza wykazała użyteczność i konieczność oznaczania poziomu FENO, zarówno przed jak i po badaniu spirometrycznym. Wykazaliśmy również, że u dzieci chorych na astmę z obturacją oskrzeli, wskazane jest oznaczenie poziomu FENO, także po zastosowaniu krótko działających beta (β) mimetyków *(Grzelewski T, Majak P, Jerzyńska J, Stelmach W, Stelmach R, Janas A, Grzelewska A, Witkowski K,* ***Makandjou-Ola E****, Stelmach T. The interpretation of exhaled nitric oxide*

values in children with asthma depends on the degree of bronchoconstriction and the levels of asthma severity. Respir Care. 2014;59(9):1404-11).

W kolejnych przeprowadzonych badaniach retrospektywnych, w oparciu o dokumentację medyczną 3612 dzieci, w wieku 6-18 lat, z objawami astmy, przeprowadziliśmy analizę takich parametrów jak: poziom FENO w wydychanym powietrzu, opór okluzji dróg oddechowych (Rint), swoisty opór dróg oddechowych (sRAW).

W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy zależność pomiędzy stężeniem tlenku azotu w powietrzu wydychanym (FENO) i oporem okluzji dróg oddechowych Rint u dzieci chorych na astmę. Wykazaliśmy również, że płeć męska, starszy wiek dziecka, uczulenie na alergeny sezonowe i całoroczne skutkują wyższymi poziomami FENO i niższym wskaźnikiem natężonej objętości pierwszo sekundowej do pojemności życiowej płuc FEV_1/FVC (<80%) i wyższym ryzykiem rozwoju astmy w tej grupie. Wyniki badań wykazały również zależność pomiędzy wzrostem oporu okluzji dróg oddechowych (Rint) (>175,4%) i poziomem FENO w wydychanym powietrzu (>15,8 ppb) oraz zachorowaniem na astmę.

W przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, użyteczność oznaczeń oporu okluzji dróg oddechowych (Rint) oraz poziomu FENO w wydychanym powietrzu jako testów predykcyjnych do wykluczenia astmy u dzieci w wieku szkolnym. Optymalny cutoff do różnicowania dzieci z astmą od dzieci bez astmy wyniósł : Rint >175,4% i FENO > 15, 8 ppb, przy wyższej predykcji dla Rint niż FENO. Nasze badania wykazały również, konieczność przy ocenie funkcji układu oddechowego, uwzględnienia takich parametrów jak wiek dziecka, płeć, typ alergii oraz współistnienie innych chorób *(Grzelewski T, Witkowski K, **Makandjou-Ola E**, Grzelewska A, Majak P, Jerzyńska J,*

Janas A, Stelmach R, Stelmach W, Stelmach I. Diagnostic value of lung function parameters and FeNO for asthma in schoolchildren in large, real-life population. Pediatr Pulmonol. 2014;49(7):632-40).

Za najważniejsze osiągnięcia w ocenie algorytm do diagnozowania i monitorowania leczenia astmy za pomocą nowego markerów, uważam:

1. Opracowanie modelu hodowli i oceny populacji limfocytów regulatorowych T, $CD4^+$ i $CD8^+$ przy użyciu wielokolorowej cytometrii przepływowej.

2. Potwierdzenie obecności i ocena immunofenotypu limfocytów regulatorowych T, $CD8^+CD25^+FoxP3^+$, we krwi obwodowej u chorych na astmę.

3. Wykazanie, że subpopulacje limfocytów regulatorowych $CD4^+$ i $CD8^+$ prezentują znamiennie niższą ekspresję FoxP3, u chorych z ciężką postacią astmy.

4. Wykazanie korelacji pomiędzy niską ekspresją FoxP3 w regulatorowych limfocytach T, $CD8^+$ i FEV_1 oraz możliwość wykorzystania ekspresji FoxP3 do oceny zaawansowania procesu chorobowego w astmie.

5. Wykazanie, że płeć męska, starszy wiek dziecka, uczulenie na alergeny sezonowe i całoroczne, skutkują wyższymi poziomami FENO i niższym wskaźnikiem natężoną objętości pierwszo sekundowej do pojemności życiowej.

6. Wykazanie użyteczności oznaczeń oporu okluzji dróg oddechowych (Rint) oraz poziomu FENO w wydychanym powietrzu jako testów predykcyjnych do wykluczenia astmy u dzieci w wieku szkolnym.

5) Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

a) Skrócona analiza biblio metryczna.

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 32 doniesienia naukowe – 25 prac oryginalnych, 5 prac poglądowych, 2 referaty zjazdowe prezentowane na konferencjach naukowych za granicą.

Suma punktów impact factor (IF) za prace oryginalne; wynosi 21,897, w tym 9,725 przypada na prace, w których jestem pierwszym autorem.

Łącznie 49 cytowań, indeks Hirscha wynosi 3 (Źródło: ISI Web of Science Core Collection).

Łącznie 23 cytowań, indeks Hirscha wynosi 3 (Źródło: Scopus).

Łącznie cytowań 85, indeks Hirscha wynosi 5 (Źrodło: Google scholar).

b) Inne kierunki prowadzonych badań

W roku 1992 zacząłem studia na Wydziale Lekarskim Faculté de Médecine de l' Université de Niamey. Działalność naukową rozpoczęłam jako student III roku Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Nigrze, gdzie warunkiem uzyskania dyplomu "Docteur en Médecine" i tytułu lekarza, jest ukończenie studiów na uczelni medycznej i obrona pracy doktorskiej. W czasie mojego pobytu w Faculté de Médecine de l' Université de Niamey byłem aktywnie zaangażowany w badania naukowe. Moje zainteresowania naukowe koncentrowały się przede wszystkim na zaburzeniach

immunologicznych występujących u dzieci. Na cwartym roku studiów medycyny, z powodu wojny domowej w moim kraju, musiałem emigrować do Stanów Zjednoczonych Ameryki. Nigdy jednak nie porzuciłem marzeń o skończeniu medycyny i pracy naukowej. Dalszą naukę kontynuowałem w Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics (Molecular Biosciences Department), The University of Texas at Austin. W trakcie studiów w Department of Microbiology, Immunology and Molecular Biology, The University of Texas at Austin, USA, zakwalifikowany zostałem do grantu badawczego UT research fellowships, przeznaczonego dla osób aspirujących do kontynuacji pracy naukowowej. Projekt badawczy w grupie prof. Philipa Tuckera, wybitnego, światowego naukowca, dotyczył metod zahamowania rozwoju raka. Badania te, prowadzone na modelu in vitro (z wykorzystaniem hodowli pierwszej stałej linii komórkowej Hela), koncentrowały się nad oceną wpływu wybranych ścieżek sygnałowych na proces różnicowania i dojrzewania komórek pluripotencjalnych. Po zaprezentowaniu wyników badań, zostałem zakwalifikowany na studia doktoranckie. W tym samym Instytucie w latach 1999–2002, pracowałem w Laboratorium prof. Philipa Tuckera, Marie Betzner Morrow Centennial Chair. Najpierw przez trzy lata jako Undergraduate research Asystent, a następnie jako research Engineer/Scientist associate. W swojej pracy naukowo-badawczej, skupiłem się przede wszystkim na analizie roli czynników transkrypcyjnych we wczesnych etapach rozwoju embrionalnego, a także w utrzymaniu pluripotencji komórek macierzystych i ich znaczenia w procesach nowotworzenia, w celu stworzenia w przyszłości terapii genowej. Pracowałem również w Sekcji Patogenów Bakteryjnych, nad czynnikami warunkującymi antybiotykoporność bakterii, wykorzystując najnowsze techniki biologii

molekularnej, np: amplifikację plazmidów, lizę bakterii, oczyszczanie plazmidowego DNA, oraz podstawowe techniki inżynierii genetycznej.

W roku 2005 zaczęłam studia na Wydziale Wojskowo-Lekarskim, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W trakcie studiów współpracowałem z profesorem Szemrajem z Zakładu Biochemii Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Wynikiem tej współpracy była następujące opublikowane prace:

1. Michał Kowalski, Anna Bielecka-Kowalska, Katarzyna Oszajca, **Eusebio Makandjou-Ola,** Piotr Jaworski, Jacek Bartkowiak, Janusz Szemraj. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene (Ala-9Val, Ile58Thr) polymorphism in patients with age-related macular degeneration (AMD). Med. Sci. Monit. 2010;16(4):190-196.

2. Michał Kowalski, George Brown, Magdalena Bieniasz, Katarzyna Oszajca, Ewa Chabielska, Tadeusz Pietras, Zofia Szemraj, **Eusebio Makandjou-Ola**, Jacek Bartkowiak, Janusz Szemraj. Cloning and expression of a new recombinant thrombolytic and anthithrombotic agent - a staphylokinase variant. Acta Biochim. Pol. 2009;56(1):41-53.

3. Magdalena Bieniasz, Katarzyna Oszajca, **Mak Eusebio**, Jacek Kordiak, Jacek Bartkowiak, Janusz Szemraj. The positive correlation between gene expression of the two angiogenic factors: VEGF and BMP-2 lung cancer patients. Lung Cancer. 2009;66(3):319-26.

W ostatnim roku studiów w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi odbyłem staże zawodowe w Klinice Ortopedii i Ortopedii Dziecięcej. W trakcie stażu, przygotowałem pracę poglądową opublikowaną jako artykuł:

Marcin Sibiński, **Makandjou-Ola Eusebio**, Himanshu Sharma, Marek Synder. Obstetrical brachial plexus palsy. Czasopismo: Adv. Orthop. 2009; 1(4):135-142.

Poza tym, we współpracy z Oddziale Klinicznym Interny Dziecięcej i Alergologii, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im M, Kopernika w Łodzi, opublikowałem pracę poglądową dotyczą rozpoznania i leczenia astmy oskrzelowej:

Eusebio M, Grzelewski T, Pietruczuk M, Lewandowska B, Stelmach I. The patents on glucocorticosteroids and selected new therapies for the management of asthma in children. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2011;5(1):57-65.

C) Udział w projektach badawczych

- NN402 517339: "Potencjał terapeutyczny limfocytów T, $CD8^+$ u chorych z ciężką astmą oskrzelową" (grant promotorski).
- 502-03/1-095-05/502-14-123: " Ocena ekspresji cząstek sygnałowych i aktywatorów transkrypcji białek STAT w limfocytach nTreg $CD8^+$ " (kierownik grantu).
- NN4021882235– "Charakterystyka naturalnych i przystosowanych regulatorowych limfocytów T u chorych z ciężką astmą oskrzelową" (wykonawca grantu).
- NN402592240: "Ocena wpływu wybranych adipocytokin na regulatorowe limfocyty T (Treg) u chorych z ciężką astmą oskrzelową" (wykonawca grantu).

- 502-03/1-095-05/502-14-112: "Ocena potencjału chemotaktycznego limfocytów regulatorowych T $CD4^+$ u chorychna astmę oskrzelową." grant Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (wykonawca).
- 502-03/1-095-05/502-14-027: "Ocena potencjału chemotaktycznego limfocytów regulatorowych T $CD4^+$ u chorych na astmę oskrzelową." grant Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (wykonawca).
- 502-03/1-095-05/502-14-028: "Ocena ekspresji mRNA czynnika transkrypcyjnego FOXP3 i białka FOXP3 w limfocytach regulatorowych T u chorych na astmę oskrzelową". grant Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (wykonawca).
- 502-03/1-095-05/502-14-113: "Ocena ekspresji cząstek sygnałowych pSTAT3 i pSTAT5 w naturalnych limfocytach regulatorowych T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ u chorych na astmę oskrzelową". grant Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (wykonawca).

d) Nagrody i wyróżnienia.

- 2013: Nagroda zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
- 2013: Nagroda 2 miejsce Redaktora Naczelnego Pneumonologii i Alergologii Polskiej na najlepszą pracę oryginalną
- 2012: Nagroda Zespołowa I stopnia Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

e) Informacja o osiągnięciach dydaktycznych

W USA prowadziłem kursy z biologi i matematyki. Od czasu zatrudnienia na stanowisku asystenta, obecnie adiunkta, w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi, prowadzę zajęcia, seminaria oraz wykłady z diagnostyki laboratoryjnej dla studentów Wydziału Lekarskiego, polsko i anglojęzycznego, Oddziału Medycyny Laboratoryjnej, Studiów Podyplomowych Prowadzę także zajęcia fakultatywne "Wykorzystanie cytometrii przepływowej w alergologii", dla studentów anglojęzycznych.

f) Działalność organizacyjna

Jestem członkiem następujących towarzystw naukowych:

- American Association of Immunologists (AAI).
- American Society for Clinical Pathology (ASCP).
- American Society for Microbiology (ASM).
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)
- National Pharmacy Technician Association (NPTA).

g) Działalność ekspercka - recenzje dla czasopism naukowych i w konkursach.

-Wykonuję recenzje publikacji dla redakcji czasopism medycznych o zasięgu międzynarodowym . Poniżej znajduje się lista czasopism z impact factor:

- Current Drug Targets IF_{2014} =3 ,597.
- Cytokine -IF_{2014} =1 ,9121.
- Journal of immunological Investigations-IF2014 =1 ,903.
- Respiratory Care– IF_{2014} =1 ,84.

-Tłumaczyłem rozdziały z języka angielskiego do polskich wydań następujących podręczników:

- T. Pagana, K. Pagana. "Mosby Testy laboratoryjne i badania diagnostyczne w medycynie". Wydawca: Elsevier Urban & Partner (2013). ISBN: 978-83-7609-886-9
- J. Wallach "Interpretacja badań laboratoryjnych" Medipage, (2011), ISBN 9788361104384.

Jak wyżej