Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Kierownik: Prof. dr hab. med. Jacek Nikliński
15-269 Białystok, u. Waszyngtona 13
Tel. (+48)85 748 59 35; Fax: (+48)85 748 59 88

Białystok, 02.01.2019

Ocena osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych dr n. med. Jarosława Daniluka w związku z postępowaniem habilitacyjnym (tytuł osiągnięcia naukowego: „Wpływ wzajemnego oddziaływania czynników środowiskowych i zaburzeń genetycznych na rozwój zapalenia trzustki i raka trzustki")

1. Charakterystyka kandydata i przebieg pracy zawodowej

Dr n. med. Jarosław Daniluk jest absolwentem Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Białymstoku, który ukończył w roku 1998. Po odbyciu stażu podyplomowego habilitant został zatrudniony na stanowisku asystenta, a następnie adiunkta w Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, gdzie pracuje do chwili obecnej. Od roku 2017 dr Jarosław Daniluk pełni funkcję zastępcy kierownika ww. jednostki. W 2005 na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem: „Mechanizm interakcji pomiędzy kaskadami kinaz Map aktywowanymi przez cholecystokininę (CCK) i czynnik wzrostu naskórka (EGF) w izolowanych komórkach pęcherzykowych trzustki" wykonanej pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Dąbrowskiego otrzymał stopień doktora nauk medycznych. W roku 2006 został specjalistą w dziedzinie chorób wewnętrznych.

Zainteresowanie pankreatologią doświadczalną zaowocowało uzyskaniem, w latach 2008-2011, stypendium naukowego na Wydziale Biologii Nowotworu w renomowanym amerykańskim ośrodku MD Anderson Cancer Center w Houston. Pobyt na stypendium umożliwił habilitantowi zdobycie szeregu umiejętności praktycznych, takich jak praca z myszami transgenicznymi, opracowanie zwierzęcych modeli przewlekłego zapalenia trzustki i raka trzustki, prowadzenie hodowli komórkowych, wykonywanie badań immunohistochemicznych, jak również poznanie zaawansowanych technik molekularnych. Efektem 3-letniego stypendium było autorstwo lub współautorstwo w renomowanych czasopismach medycznych takich jak *Journal of Clinical Investigation*, *Gastroenterology*, *Gut*, *Oncogene*.

Po powrocie ze stypendium dr Jarosław Daniluk kontynuował pracę w Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych UMB oraz prowadził dalsze badania naukowe dotyczące patogenezy chorób trzustki oraz nieswoistych chorób zapalnych jelit, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu palenia tytoniu i mikrobioty przewodu pokarmowego na te procesy. W latach 2012, 2013 i 2014 habilitant odbywał miesięczne staże na Wydziale Biologii Nowotworu MD Anderson Cancer Center w USA, co zaowocowało pogłębieniem doświadczenia w pracy naukowej oraz dalszymi publikacjami w renomowanych czasopismach medycznych.

W 2013 roku dr Jarosław Daniluk zdał egzamin specjalizacyjny w dziedzinie gastroenterologii. 2014 roku habilitant został wybrany Przewodniczącym Oddziału Białostockiego Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, natomiast w 2015 roku został nominowany przez Wojewodę Podlaskiego konsultantem wojewódzkim w dziedzinie chorób wewnętrznych. Od 2018 roku z nominacji Centrum Egzaminów Medycznych jest członkiem komisji egzaminacyjnej w dziedzinie chorób wewnętrznych

1. Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy habilitanta obejmuje 13 prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach posiadających Impact Factor. Sumaryczna punktacja IF prac oryginalnych wynosi – 95.574, zaś liczba punktów MNiSW - 386. Ponadto dr Jarosław Daniluk jest współautorem 6 prac poglądowych, 2 opisów przypadków i 1 pracy wieloośrodkowej, o łącznej wartości punktacji IF – 2.864 i liczbie punktów MNiSW - 59. Publikacje z dorobku habilitanta są często cytowane (łączna liczba cytowań na dzień 21.08.2018 wynosiła 533, zaś indeks Hirscha = 8) co świadczy o wysokiej jakości prowadzonych badań oraz o znaczeniu uzyskanych wyników.

Zainteresowania naukowe habilitanta koncentrują się na wpływie określonych mutacji genetycznych oraz ich produktów białkowych na rozwój zapalenia i raka trzustki w obliczu zmieniających się czynników środowiskowych.

2. Ocena przedstawionego osiągnięcia naukowego pt. „Wpływ wzajemnego oddziaływania czynników środowiskowych i zaburzeń genetycznych na rozwój zapalenia trzustki i raka trzustki" stanowiące podstawę postępowania habilitacyjnego

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe habilitanta stanowi cykl czterech tematycznie powiązanych oryginalnych prac opublikowanych w renomowanych czasopismach o wysokim łącznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor) wynoszącym 45.308 i punktacji MNiSW równej 172.

W pracy **„An NF-κB pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice"** *Journal of Clinical Investigation. 2012, 122(4):1519-28*, (**IF: 12,812**) została oceniona rola mutacji genu *K-Ras* w patogenezie zapalenia i raka trzustki. Wykazano, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa produkt białkowy tego genu - białko Ras. Stwierdzono istotnie zwiększoną i przetrwałą aktywację Ras w odpowiedzi na stymulację cholecystokininą izolowanych komórek pęcherzykowych trzustki, posiadających mutację *K-Ras*. Zjawisko to zostało potwierdzone w badaniach *in vivo* w wyniku ekspozycji zwierząt na ceruleinę, lipopolisacharyd (LPS) lub inhibitor trypsyny – camostat. U myszy posiadających mutację *K-Ras* obserwowano wielokrotny wzrost aktywności białka Ras, podczas gdy u zwierząt bez tej mutacji aktywność Ras utrzymywała się na tym samym, niskim poziomie. Co istotne, wzrost aktywności białka Ras był związany z rozwojem przewlekłego zapalenia trzustki, zmian przednowotworowych, a w konsekwencji raka trzustki. Wykazano ponadto istotny udział czynnika transkrypcyjnego NF-κB w tym procesie, co zostało potwierdzone w badaniach z zastosowaniem zwierząt z zahamowaną i nadmierną ekspresją tego czynnika w trzustce. Stwierdzono również, że zahamowanie aktywności cyklooksygenazy-2 (substratu NF-κB) swoistym inhibitorem, znacznie opóźniło rozwój przewlekłego zapalenia i raka trzustki. Natomiast u myszy z łączną nadekspresją Cox-2 i mutacją *K-Ras*, proces ten ulegał gwałtownemu przyśpieszeniu. Wyniki uzyskane w modelu zwierzęcym, zostały potwierdzone metodami immunohistochemicznymi (zwiększona ekspresja przedstawionych powyżej czynników) w ludzkich preparatach raka trzustki, uzyskanych od pacjentów w trakcie operacji.

Kontynuację badań dotyczących roli mutacji *K-Ras* w patogenezie raka trzuski przedstawiono w pracy **„Oncogenic K-Ras requires activation for enhanced activity".** *Oncogene. 2013, 33:532-5,* (**IF: 8,459**) gdzie oceniono aktywność białka Ras, u myszy z trzustkową mutacją *K-Ras*, w warunkach podstawowych i po pobudzeniu. Wbrew powszechnej opinii, w badaniu wykazano, że onkogenne białko Ras nie jest stale aktywne. W stanie spoczynku, aktywność zmutowanego białka Ras była minimalna i łatwo ulegała wzrostowi w

wyniku stymulacji. Uzyskane w modelu zwierzęcym wyniki zostały potwierdzone w analizie materiału komórkowego raka trzustki lub raka jelita grubego pochodzącego od ludzi.

W kolejnej pracy **„Activation of nuclear factor-κB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice".** *Gastroenterology. 2013, 144(1):202-10,* (**IF: 13,926**) kontynuowano badania nad wpływem NF-κB na rozwój zapalenia trzustki. Wykorzystując transgeniczne modele zwierzęce wykazano, że zwiększona pęcherzykowa aktywność NF-κB korelowała z wyższą ekspresją cytokin prozapalnych oraz cięższym przebiegiem ostrego zapalenia trzustki. Co więcej, przedłużona aktywacja NF-κB prowadziła do rozwoju włóknienia i utraty miąższu trzustki, prowadząc do rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki.

W ostatniej pracy z cyklu pt. **„Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis".** *Gut. 2011, 60(10): 1379-1388* (**IF: 10.111**) kontynuowano badania nad molekularnymi mechanizmami zaangażowanymi w zapalenie trzustki. W tym celu, stosując technikę inżynierii genetycznej, stworzono nowy model zwierzęcy, w którym możliwa była przedwczesna aktywacja trypsynogenu II (PRSSII) w komórkach pęcherzykowych trzustki. Stwierdzono, że wewnątrzpęcherzykowa aktywacja trypsyny powodowała ostre zapalenie trzustki, jedynie u myszy homozygotycznych, a nie heterozygotycznych w stosunku do allelu PRSSII. Ostre zapalenie trzustki u tych myszy wiązało się z nasiloną śmiercią komórki, głównie na drodze apoptozy, która występowała od bardzo wczesnych etapów choroby. Nie stwierdzono natomiast aby wewnątrzpęcherzykowa aktywacja trypsynogenu prowadziła do włóknienia i rozwoju przewlekłego zapalenia trzustki.

Cykl pracy stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe został podsumowany przez habilitanta 9 wnioskami, które precyzyjnie odpowiadają na sformułowane w poszczególnych pracach cele badawcze. Przedstawione publikacje stanowią spójny cykl, którego tematem przewodnim są badania dotyczące molekularnych mechanizmów zapalenia i raka trzustki u transgenicznych myszy laboratoryjnych.

Istotnym osiągnięciem pracy naukowej habilitanta jest wykazanie, że w patogenezie chorób trzustki kluczową rolę odgrywa nie tyle obecność mutacji *K-Ras*, co wydłużona aktywność jego produktu białkowego - białka Ras w odpowiedzi na czynniki zapalne lub nawet fizjologiczne. Przedłużona aktywność Ras pobudza NF-κB i wytwarzanie mediatorów zapalnych (np.. Cox-2), które z kolei powodują dalszy, patologiczny wzrost

aktywności Ras, tworząc pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego. Biorąc pod uwagę fakt, że nawet 25% dorosłej populacji jest nosicielem mutacji *K-Ras*, ingerencja i zablokowanie tej pętli może być istotnym elementem strategii zapobiegania rozwojowi raka.

Kolejnym, niezmiernie ważnym odkryciem badań dr Jarosława Daniluka jest wykazanie, że wbrew temu co jest powszechnie przyjęte, zmutowane białko Ras nie jest stale aktywne ale charakteryzuje się opóźnioną kinetyką powrotu do stanu spoczynkowego. Powyższa obserwacja może mieć również poważne implikacje kliniczne.

Wykazanie korelacji pomiędzy poziomem aktywacji NF-κB a stopniem ciężkości ostrego zapalenia trzustki, stanowi istotny głos w dyskusji dotyczącej roli tego czynnika transkrypcyjnego w inicjowaniu i progresji stanu zapalnego.

Na postawie przeprowadzonych badań dr Jarosław Daniluk potwierdził, że wewnątrz-trzustkowa aktywacja trypsynogenu jest czynnikiem inicjującym ostre zapalenie trzustki. Co więcej, w toku dalszych badań habilitant wykazał, że odpowiedzią trzustki na wewnątrzpęcherzykową aktywację trypsyny jest gwałtowna śmierć komórki na drodze apoptozy. Proces ten pomaga w ograniczeniu ostrego zapalenia i zapobiega rozwojowi przewlekłego zapalenia trzustki.

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe opierają się na nowoczesnym warsztacie badawczym. W eksperymentach wykorzystano liczne modele zwierząt podwójnie i potrójnie transgenicznych ze zmienioną trzustkową ekspresją genów, takich jak K-Ras, NF-κB, Cox-2, PRSSII. Stosując techniki molekularne zbadano ekspresją cytokin prozapalnych oraz stężenie i aktywność określonych białek. Oprócz klasycznej oceny patomorfologicznej preparatów trzustkowych, analizę pogłębiono o zaawansowane techniki immunohistochemiczne, mikroskopii fluorescencyjnej i elektronowej.

Pozostały dorobek naukowy dr Jarosław Daniluka w dużym stopniu nadal koncentruje się na patogenezie chorób trzustki, co wynika z kontynuacji doskonałej współpracy a ośrodkiem amerykańskim MD Anderson Cancer Center. Habilitant wykazał m.in., że zastosowanie diety bogatotłuszczowej u myszy predysponowanych genetycznie (mutacja *K-Ras*) prowadziło do powstania zmian przednowotworoych i raka trzustki. Wykorzystując modele transgeniczne dr Jarosław Daniluk analizował wpływ różnorodnej ekspresji K-Ras, Cox-2, p53 oraz przewlekłego zapalenia na rozwój raka trzustki.

W ostatnim czasie zainteresowania naukowe dr Jarosława Daniluk objęły również mechanizmy wewnątrzwątrobowe odpowiedzialne za rozwój insulinooporności indukowanej dietą wysokotłuszczową. Analizie został również poddany wpływ wczesnego podawania antybiotyków (penicyliny) na skład mikrobioty jelitowej oraz funkcję układu immunologicznego.

Kolejnym punktem zainteresowań habilitanta są nieswoiste choroby zapalne jelit. Na przykładzie modelu zwierzęcego dr Jarosław Daniluk wykazał korzystny wpływ palenia papierosów na przebieg wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Potencjalnym mechanizmem odpowiedzialnym za to zjawisko może być modyfikacja odpowiedzi immunologicznej. Klinicznym przejawem badań nad nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit była analiza potencjalnych markerów prognostycznych pozwalających na wczesną identyfikację pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. Biorąc pod uwagę fakt, iż w tej chorobie obserwuje się zwykle znaczne opóźnienie w ustaleniu prawidłowej diagnozy, badanie to może mieć duże znaczenie praktyczne.

3. Działalność dydaktyczna

Od momentu zatrudnienia do chwili obecnej dr Jarosław Daniluk prowadzi ćwiczenia oraz seminaria ze studentami IV i VI roku z przedmiotu „choroby wewnętrzne – gastroenterologia" na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii, a od 2011 r. również na Oddziale Nauczania w Języku Angielskim. Dodatkowo habilitant prowadzi zajęcia ze studentami III roku Technik Dentystycznych (propedeutyka medycyny), Oddziału Stomatologii (choroby wewnętrzne – gastroenterologia), a także studentami V roku Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego (propedeutyka chorób wewnętrznych) i studentami III roku Dietetyki Wydziału Nauk o Zdrowiu (żywienie w gastroenterologii). Od 2016 r. dr Jarosław Daniluk jest prelegentem podczas kursu przygotowującego do Lekarskiego Egzaminu Końcowego organizowanego przez Uniwersytet Medyczny w Białymstoku. Dr Jarosław Daniluk był lub jest aktualnie opiekunem łącznie 4 specjalizantów w dziedzinie chorób wewnętrznych i gastroenterologii. Jest recenzentem pomocniczym rozprawy doktorskiej realizowanej na Politechnice Białostockiej. Od 2018 r., z nominacji Centrum Egzaminów Medycznych, habilitant jest członkiem komisji egzaminacyjnej w dziedzinie chorób wewnętrznych.

4. Udział w projektach badawczych i działalność organizacyjna

Aktualnie dr Jarosław Daniluk jest głównym wykonawcą projektu Narodowego Centrum Nauki, pt. „Wpływ mikrobiota przewodu pokarmowego i subpopulacji komórek dendrytycznych na rozwój raka trzustki u myszy predysponowanych genetycznie". Ponadto habilitant wielokrotnie pełnił rolę kierownika oraz wykonawcy projektów prac statutowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Za działalność naukową dr Jarosław Daniluk został pięciokrotnie wyróżniony nagrodami naukowymi Rektora Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Habilitant uzyskał też dwie nagrody międzynarodowe w trakcie konferencji pankreatologicznych.

Umiejętność współpracy z zespołami międzynarodowymi potwierdza uzyskanie przez habilitanta stypendium w MD Anderson Cancer Center w Houston USA, a następnie 3-krotne pobyty w ww. ośrodku, celem kontynuacji kooperacji naukowej.

Od 2012 r. jest opiekunem koła naukowego działającego przy Klinice Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych, uzyskując w roku akademickim 2012/2013 II miejsce w Rankingu Studenckich Kół Naukowych w kategorii Choroby Wewnętrzne.

Od 2014 dr Jarosław Daniluk jest przewodniczącym Oddziału Białostockiego Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii. W tym czasie zorganizował 6 konferencji naukowych o tematyce gastroenterologicznej.

Od 2015 habilitant jest konsultantem wojewódzkim w dziedzinie chorób wewnętrznych w województwie podlaskim.

Dr Jarosław Daniluk był recenzentem prac w renomowanych czasopismach naukowych, takich jak Plos One, Advances in Medical Sciences.

5. Podsumowanie

Dr Jarosław Daniluk posiada istotny dorobek naukowy o łącznej wartości wyrażonej współczynnikiem **IF = 99,438**. Spójny cykl prac pt.: **„Wzajemne oddziaływanie czynników środowiskowych i zaburzeń genetycznych w procesie rozwoju zapalenia trzustki i raka trzustki"**, stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe habilitanta, opartych na nowoczesnych metodach badawczych, stanowi istotny wkład w badaniach molekularnych mechanizmów leżących u podłoża zapalenia i raka trzustki, ze szczególnym uwzględnieniem roli zmutowanego białka Ras. Przedstawione do oceny

osiągnięcie naukowe dr Jarosława Daniluka uważam za niezmiernie interesujące, wartościowe i ważne ze względu na znaczenie poznawcze oraz na potencjalne implikacje kliniczne. Habilitant wykazał, że jest dojrzałym naukowcem, który opanował nowoczesny warsztat badawczy oraz umiejętności kierowania zespołem naukowym.

Biorąc pod uwagę nowatorstwo prowadzonych przez habilitanta badań, wartość naukową jego dorobku oraz możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników uważam, iż zarówno przedstawiony przez pana dr n. med. Jarosława Daniluk cykl prac, stanowiący główne osiągnięcie naukowe, jak i pozostały dorobek naukowy, jak również zaangażowanie w pracę dydaktyczną i organizacyjną spełniają warunki ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym do uzyskania stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych.

Mam zaszczyt wystąpić do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie dr n. med. Jarosława Daniluka do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Prof. dr hab. med. Jacek Nikliński