

# **ADRIAN PAWEŁ DOROSZKO**

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych,  
Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej  
Wydział Lekarski  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

## **AUTOREFERAT**

**Wrocław 2016**

**ADRIAN PAWEŁ DOROSZKO**  
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych,  
Nadciśnienia Tętniczego i Onkologii Klinicznej  
Wydział Lekarski  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

## **AUTOREFERAT**

**Wrocław 2016**

AUTOREFERAT

Adrian Doroszko

## **SPIS TREŚCI:**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. WSTĘP .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. GŁÓWNE KIERUNKI MOICH BADAŃ.....</b>                     | <b>6</b>  |
| <b>3. PRZEDMIOT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ.....</b>               | <b>7</b>  |
| <b>4. POZOSTAŁE PROJEKTY (DOROBEK POZA-HABILITACYJNY).....</b> | <b>20</b> |
| <b>5. KSZTAŁCENIE MŁODEJ KADRY .....</b>                       | <b>35</b> |
| <b>6. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA.....</b>                       | <b>37</b> |

## **1. WSTĘP**

W latach 1999-2005 studiowałem na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej we Wrocławiu, gdzie od 2002 roku zostałem objęty indywidualnym tokiem studiów w Klinice Kardiologii AM pod kierunkiem dr Arkadiusza Derkacza. W roku 2005 uzyskałem Medal im. L. Hirszfelda dla najlepszego absolwenta Akademii Medycznej, a następnie w latach 2005-2006 odbywałem staż podyplomowy w 4 Wojskowym Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu, gdzie pracowałem również jako wolontariusz w Klinice Kardiologii.

W 2006 roku, po zdaniu z drugą lokatą w Polsce Lekarskiego Egzaminu Państwowego, rozpocząłem stacjonarne studia doktoranckie w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego AM we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Szuby oraz szkolenie specjalizacyjne w zakresie chorób wewnętrznych pod kierunkiem dr Rafała Poręby w tamtejszej Klinice. W 2008 roku otrzymałem z wyróżnieniem stopień naukowy doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Udział prostanoidów i tlenku azotu w patogenezie dysfunkcji śródbłonna u osób z nadciśnieniem tętniczym”.

Po obronie rozprawy doktorskiej udałem się na półtoraroczny staż naukowy (postdoctoral fellowship) w University of Saskatchewan w Saskatoon w Kanadzie, gdzie pracowałem w laboratorium farmakoproteomiki pod kierunkiem profesora Grega Sawickiego jako członek Cardiovascular Research Group tworzonej przez pracowników tamtejszego Wydziału Medycznego. Zajmowałem się oceną roli ostrego stresu oksydacyjnego w patogenezie uszkodzenia układu krążenia i oddechowego w różnych modelach zwierzęcych z wykorzystaniem technik proteomiki i farmakoproteomiki.

Po powrocie do Polski w 2010 r. zostałem zatrudniony na stanowisku asystenta, a po uzyskaniu tytułu specjalisty chorób wewnętrznych, adiunkta w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego UM we Wrocławiu. W 2011 r. zorganizowałem tam pracownię farmakoproteomiki chorób układu krążenia celem kontynuacji prac naukowych rozpoczętych zarówno w okresie studiów doktoranckich (dysfunkcja śródbłonna), jak i stażu podoktorskiego. W pracowni tej obecnie realizuję kierowane przeze mnie projekty badawcze.

W czerwcu 2011 roku wyjechałem na kilkutygodniowe stypendium naukowe do University of Alberta w Edmonton w Kanadzie, gdzie pod kierownictwem prof. Paula Jurasza odbyłem szkolenie w zakresie badań czynnościowych płytek krwi. Staż ten miał za zadanie poszerzyć moją wiedzę i umiejętności w związku z prowadzonymi przeze mnie badaniami z zakresu farmakoproteomiki aspirynooporności.

W 2013 r. rozpocząłem trwające obecnie szkolenie specjalizacyjne z kardiologii pod kierunkiem dr Jacka Bezubki w specjalistycznym szpitalu w Wałbrzychu.

Ponadto, po uzyskaniu tytułu specjalisty chorób wewnętrznych, przejąłem obowiązki adiunkta dydaktycznego w zatrudniającej mnie jednostce.

**DOROBEK NAUKOWY**

Mój obecny dorobek obejmuje:

- 24 prace oryginalne
- 12 artykułów przeglądowych
- 60 doniesień zjazdowych (18 na zjazdach krajowych, 39 na zjazdach międzynarodowych)
- 1 rozdział w książce

**Liczba punktów MNiSW za prace pełne wynosi ogółem: 543.0 pkt. Impact Factor: 43.339 pkt.**

**WYKSZTAŁCENIE I DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE:**

- **11.2013-obecnie:** szkolenie specjalizacyjne w zakresie kardiologii- Szpital Specjalistyczny w Wałbrzychu
- **07.2012:** Cambridge University, Judge Business School - IGNITE 2012
- **05.2012:** Quercus Training Group: Project and Team Management Course, Kraków
- **11.2006–12.2012:** specjalizacja w zakresie chorób wewnętrznych - Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego UM,04.2013r. - uzyskanie tytułu specjalisty chorób wewnętrznych
- **06.2011–07.2011:** staż naukowy w Cardiovascular Research Group, University of Alberta, Edmonton, Kanada
- **11.2008–01.2010:** staż podoktorski (postdoctoral fellowship) w zakresie farmakoproteomiki układu sercowo-naczyniowego; University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada
- **10.2005 – 11.2006:** staż podyplomowy; Klinika Kardiologii 4WSKzP we Wrocławiu
- **10.1999 – 06.2005:** Wydział Lekarski Akademii Medycznej we Wrocławiu
- **09.1995 – 06.1999:** Liceum Ogólnokształcące im. K.K. Baczyńskiego w Nowej Soli

**OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE/NAGRODY I WYRÓŻNIENIA:**

- **2013-2016:** Grant naukowy Iuventus Plus na realizację projektu mojego autorstwa: Wykorzystanie proteomiki do poszukiwania biomarkerów udaru niedokrwienego mózgu i punktów uchwytu dla działania nowych leków o działaniu neuroprotektynym
- **2012:** Stypendium Naukowe START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej
- **2012-2014:** Grant naukowy Iuventus Plus na realizację projektu mojego autorstwa: "Farmakoproteomiczna analiza patogenezы aspirynooporności"
- **2011:** List gratulacyjny Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia naukowe
- **2011:** Nominacja do nagrody naukowej tygodnika „Polityka”: „Zostańcie z nami!"
- **2011:** Stypendium Naukowe START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej
- **2009:** Nagroda za pierwsze miejsce na "16<sup>th</sup> annual Life & Health Sciences Research Conference" w kategorii "Cardiovascular/Respiratory Sciences". Kanada, marzec 2009

- **2008:** Nagroda "Young Investigator Award" na 4th International Symposium ADMA. Bregenz, Austria, Sierpień 2008
- **2007/2008:** Stypendium naukowe Urzędu Miasta Wrocławia
- **2006:** Lekarski Egzamin Państwowy zdany z drugą lokatą w Polsce
- **2005:**
  - **Medal im. L. Hirschfelda - Medal dla najlepszego absolwenta Akademii Medycznej**
  - List gratulacyjny wojewody dolnośląskiego za osiągnięcia naukowe w trakcie studiów na AM we Wrocławiu
  - List gratulacyjny prezydenta Wrocławia za osiągnięcia naukowe w trakcie studiów na AM we Wrocławiu
  - List gratulacyjny JM Rektora i Dziekana Wydziału Lekarskiego osiągnięcia naukowe w trakcie studiów na AM we Wrocławiu
- **2002-2005:**
  - Indywidualny Tok Studiów w Katedrze i Klinice Kardiologii AM we Wrocławiu
- **1997/1998:** Stypendium Prezesa Rady Ministrów za osiągnięcia edukacyjne w szkole średniej

#### **WYKŁADY NA ZAPROSZENIE:**

1. Role of the nitric oxide metabolic pathway and prostanoids in pathogenesis of endothelial dysfunction and essential hypertension in young men. 14.12.2009. Cardiovascular Research Group. University of Saskatchewan, Kanada
2. Proteomic approach to studying platelet function and dysfunction. 07.09.2012. Toruń. Advances in antiplatelet therapy.
3. Proteomic approach to studying selected aspects of cardiovascular disease and defining novel drug targets. Wrocław, 06.11.2015. "Advances in multi-omics".

#### **RECENZENT PRAC W CZASOPISMACH NAUKOWYCH z listy filadelfijskiej:**

1. Journal of the American Society of Hypertension (JASH)
2. Photomedicine and Laser Surgery
3. British Medical Journal Online (BMJ online)

#### **CZŁONKOSTWO W TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH:**

1. Polskie Towarzystwo Kardiologiczne
2. Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne
3. Canadian Society of Pharmacology and Therapeutics (2009)

## **2. GŁÓWNE KIERUNKI MOICH BADAŃ OBEJMUJĄ NASTĘPUJĄCĄ TEMATYKĘ:**

1. Rola szlaku metabolicznego tlenu azotu i kaskady kwasu arachidonowego w patogenezie dysfunkcji śródbłonka u młodych mężczyzn z nadciśnieniem tętniczym – grant subsydiowany przez NCN (przedmiot rozprawy doktorskiej)
2. Farmakoproteomiczna analiza uszkodzenia wybranych białek aparatu kurczliwego mięśnia serca indukowanego przez stres nitrozacyjny w modelu asfiksji noworodkowej (projekt realizowany podczas stażu podoktorskiego w Cardiovascular Research Group w University of Saskatchewan w Kanadzie)
3. Proteomiczna analiza uszkodzenia mięśnia sercowego przez stres oksydacyjny towarzyszący reperfuzji poprzedzonej okresem niedokrwienia oraz samemu niedokrwieniu (projekt realizowany podczas stażu podoktorskiego w Cardiovascular Research Group w University of Saskatchewan w Kanadzie)
4. Rola metaloproteazy-9 (MMP-9) w patogenezie uszkodzenia płuc przez ostry stres oksydacyjny towarzyszący mechanicznej wentylacji (projekt realizowany podczas stażu podoktorskiego w Cardiovascular Research Group w University of Saskatchewan w Kanadzie)
5. Analiza wybranych czynników ryzyka i markerów uszkodzenia śródbłonka u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną - grant subsydiowany przez MNiSW (NN407 284734) realizowany we współpracy z Katedrą i Kliniką Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej UM we Wrocławiu (współautor projektu i główny badacz)
6. Badania patogenezy zjawiska aspirynooporności w ujęciu proteomicznym i w aspekcie funkcji śródbłonka - badania realizowane w ramach grantu z Unii Europejskiej w projekcie Wrovasc - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej (główny badacz) - POIG.01.01.02-02-001/08
7. Farmakoproteomiczna analiza patogenezy aspirynooporności - kierowany przeze mnie projekt Iuventus Plus mojego autorstwa
8. Wykorzystanie proteomiki do poszukiwania biomarkerów udaru niedokrwienego mózgu i punktów uchwytu dla działania nowych leków o działaniu neuroprotekcyjnym - kierowany przeze mnie projekt Iuventus Plus mojego autorstwa
9. Badania nad wykorzystaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego w terapii śródbłonka naczyniowego i płytek krwi - badania realizowane w ramach grantu z Unii Europejskiej w projekcie Wrovasc - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej (współautor projektu i główny badacz) - POIG.01.01.02-02-001/08

### **3. PRZEDMIOT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ:**

Przedmiot osiągnięcia określonego w 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.) stanowi cykl 5 prac oryginalnych opublikowanych w latach 2009-2013, w czasopismach z listy „Thompson Reuters Master List” posiadających łącznie Impact Factor o wartości 19,759. Uzyskałem zgody od wszystkich żyjących współautorów na wykorzystanie tych prac celem stworzenia rozprawy habilitacyjnej, którą zatytułowałem:

#### **"Wykorzystanie proteomiki do definiowania wybranych aspektów patogenezy oraz projektowania terapii ostrej niewydolności krążeniowo-oddechowej"**

##### **WPROWADZENIE**

Choroby układu sercowo-naczyniowego są obecnie głównym problemem zdrowotnym populacji światowej, zaś zrozumienie ich determinant jest kluczowe dla optymalizacji terapii. Spośród nich niewydolność krążeniowo-oddechowa stanowi główną przyczynę zgonów i chorobowości. Ponieważ postępy medycyny molekularnej umożliwiły poznawanie podłoża patofizjologicznego tych schorzeń, konieczne jest definiowanie nowych strategii terapeutycznych, opartych na faktach wynikających z badań molekularnych.

Białka odgrywają kluczową rolę w regulacji systemów biologicznych. Regulacja ich ekspresji i aktywności biologicznej odbywa się na wielu płaszczyznach, w tym modyfikacji post-translacyjnych, takich jak fosforylacja, nitrowanie, acetylacja, metylacja, a także regulacji ich degradacji przez stres oksydacyjny. Ponieważ modyfikacje te pojawiają się zbiorczo, należy uznać, że powiązane są ze sobą zależnościami typu synergizm lub antagonizm. Ponadto, szlaki sygnałowe prowadzące do tych modyfikacji mogą także wchodzić ze sobą w interakcje, stanowiąc kolejne piętro regulacji. Techniki stosowane przez proteomikę (m.in. elektroforeza dwukierunkowa, spektrometria masowa) są dobrym narzędziem oceniającym modyfikacje białek pojawiające się w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym serca, w uszkodzeniu płuc przez stres oksydacyjny, czy też w przebiegu asfiksji noworodkowej. Farmakoproteomika pozwala na uzyskanie wglądu w molekularne podłoże interwencji terapeutycznych na poziomie modyfikacji białek i ich wzajemnych interakcji. Dlatego też, wyjaśnienie patomechanizmów uszkodzenia układu krążeniowo-oddechowego przez ostry stres oksydacyjny pozwala na zdefiniowanie nowych celów terapeutycznych oraz biomarkerów choroby, lepiej odzwierciedlających dynamikę zmian homeostazy.

Reaktywne formy tlenu są produkowane przez wszystkie rodzaje komórek, zaś w kardiomiocytach mogą być przyczyną utraty kurczliwości przez komórkę. Zgodnie z wynikami ostatnich badań, reaktywne formy tlenu (ROS) mogą odpowiadać za rozwój dysfunkcji skurczowej po zawale serca,

w asfiksji noworodków i w ostrym uszkodzeniu płuc, jednakże dokładna ich rola ROS w patogenezie tych schorzeń pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Ostry stres oksydacyjny początkuje kaskadę modyfikacji posttranslacyjnych białek i reguluje ich degradację, przez co wiele z nich staje się substratami dla aktywowanych proteaz. Stres oksydacyjny powoduje także modyfikacje niektórych enzymów prowadząc do progresji dysfunkcji skurczowej mięśnia sercowego wskutek nasilonej degradacji białek kurczliwych, uprzednio opornych na proteolizę.

Nadtlenoazotyny (ONOO<sup>-</sup>) są wysoce reaktywnymi oksydantami powstającymi wskutek reakcji tlenu azotu II (NO) z anionorodnikiem ponadtlenkowym (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), a ich rola sprawcza w patogenezie uszkodzenia mięśnia serca była przedmiotem licznych badań. Jednakże dokładne mechanizmy oddziaływania ONOO<sup>-</sup> w powstawaniu dysfunkcji skurczowej pozostają nadal przedmiotem dyskusji.

Miozyna jest kluczowym białkiem aparatu kurczliwego serca, a jej interakcje z aktyną są odpowiedzialne za generowanie skurczu. Miozyna składa się z 2 łańcuchów ciężkich oraz tetrameru złożonego z 2 typów łańcuchów lekkich – podstawowego – MLC1 i regulatorowego – MLC2. Oba łańcuchy lekkie odgrywają ważną rolę strukturalną i funkcjonalną, wobec czego jakiegokolwiek zmiany ich struktury/stabilności mogą powodować poważne upośledzenie kurczliwości. Degradacja MLC przez metaloproteazę macierzy 2 (MMP-2) została już udowodniona, jednak wciąż niejasne są mechanizmy regulujące ten proces. Niektóre badania wskazują na istnienie modyfikacji MLC1 przez reaktywne formy tlenu, a także na jego fosforylację przez kinazę łańcuchów lekkich miozyny, MLCK.

Metaloproteazy macierzy są proteazami odgrywającymi ważną rolę w wielu procesach fizjologicznych, zaś zwiększona ich aktywność jest powiązana z patogenezą wielu schorzeń, w tym uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia sercowego, asfiksji noworodkowej i ostrego uszkodzenia płuc przez stres oksydacyjny. Odkrycie nowych wewnątrzkomórkowych substratów dla MMP (m.in. troponina, MLC1) zrodziło pytanie o istnienie wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulujących ich aktywność, które mogłyby być kluczowym elementem w ograniczaniu patologicznych następstw działania ostrego stresu oksydacyjnego w układzie krążenia i oddechowym. MMP-2 wykazują większą ekspresję w układzie krążenia, zaś MMP-9 w oddechowym. W ostrym uszkodzeniu płuc, a zwłaszcza w zespole ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), zwiększona ekspresja MMP-9 w popłuczynach z drzewa oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) uważana jest za czynnik dezintegrujący błonę podstawną w barierze włóscinkowo-pęcherzykowej. Ponadto, badania różnych modeli uszkodzenia płuc wykazały, że MMP są ściśle powiązane z patogenezą tej grupy chorób i że zahamowanie ich aktywności może mieć działanie protekcyjne. Dokładne mechanizmy uszkodzenia płuc indukowanego mechaniczną wentylacją (ang. VILI) są obecnie przedmiotem licznych badań. Jednym spośród tych mechanizmów mogłaby być nasilona degradacja niektórych białek mięszu płucnego, będących proteolitycznymi substratami dla MMP-9. Dokładne ich poznanie powinno umożliwić wprowadzenie nowych strategii terapeutycznych ograniczających zakres VILI, dlatego też zrozumienie regulacji aktywności MMP w



kompartymencie zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym może być kluczowe w badaniach patogenezy VILI, a także asfiksji noworodkowej czy też uszkodzenia niedokrwiennego i niedokrwiennie-reperfuzyjnego.

Zrozumienie molekularnych podstaw farmakodynamiki, w oparciu o patogenezę chorób, jest fundamentalnym krokiem w projektowaniu nowych strategii leczniczych, opartych na faktach. Zaprojektowana w ten sposób terapia powinna charakteryzować się wysoką skutecznością (leczenie etiotropowe) i jednocześnie wąskim spektrum działań niepożądanych.

### **CELE PRACY**

1. Zdefiniowanie na poziomie molekularnym (w oparciu o techniki proteomiki) patomechanizmów dysfunkcji skurczowej serca u resuscytowanych noworodków z asfiksją, a następnie – w oparciu o udokumentowane mechanizmy patogenetyczne – sprecyzowanie punktów uchwytu nowych leków mogących znaleźć zastosowanie w terapii.

2. Poszukiwanie biomarkerów uszkodzenia układu oddechowego przez ostry stres oksydacyjny ze szczególnym uwzględnieniem roli metaloproteaz macierzy, a następnie ocena powiązania ich z patogenezą uszkodzenia płuc indukowanego wentylacją (ang. VILI) oraz ocena efektywności zastosowanej terapii celowanej na zdefiniowany w ten sposób punkt uchwytu.

3. Proteomiczna analiza patogenezy uszkodzenia niedokrwiennego i niedokrwiennie-reperfuzyjnego mięśnia sercowego ze szczególnym uwzględnieniem roli stresu nitrozacyjnego, metaloproteaz macierzy i łańcuchów lekkich miozyny; Wyodrębnienie patomechanizmów uszkodzenia występującego w fazie wyłącznie niedokrwienia od patomechanizmów uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego;

4. Zaprojektowanie oraz wstępna ocena efektywności terapii celowanej na stabilizację sarkomeru i metabolizmu kardiomiocytów, zdefiniowanej w oparciu o patomechanizmy sprecyzowane wcześniej za pomocą proteomiki

### **WYKAZ PRAC WŁASNYCH STANOWIĄCYCH MATERIAŁ ROZPRAWY HABILITACYJNEJ:**

1. **Adrian Doroszko**, Dorota Polewicz, Jolanta Sawicka, J. Steven Richardson, Po-Yin Cheung, Grzegorz Sawicki.: Cardiac dysfunction in an animal model of neonatal asphyxia is associated with increased degradation of MLC1 by MMP-2. *Basic Res.Cardiol.* 2009 Vol.104 no.6; s.669-679.

IF: 5.973

2. **Adrian Doroszko**, Dorota Polewicz, Virgilio J.J. Cadete, Jolanta Sawicka, Michelle Jones, Danuta Szczęśna-Cordary, Po-Yin Cheung, Grzegorz Sawicki.: Neonatal asphyxia induces the nitration of cardiac myosin light chain 2 that is associated with cardiac systolic dysfunction. *Shock* 2010 Vol.34 no.6; s.592-600.

IF: 2.871

3. **Adrian Doroszko**, Thomas S. Hurst, Dorota Polewicz, Jolanta Sawicka, Justyna Fert-Bober, David H. Johnson, Grzegorz Sawicki.: Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury. *Proteome Sci.* 2010 Vol.8; poz.3.

IF: 2.564

4. Virgilio J.J. Cadete, Steven A. Arcand, Bradley M. Chaharyn, **Adrian Doroszko**, Jolanta Sawicka, Darrell D. Mousseau, Grzegorz Sawicki.: Matrix metalloproteinase-2 is activated during ischemia/reperfusion in a model of myocardial infarction *Can.J.Cardiol.* 2013 Vol.29 no.11; s.1495-1503

IF: 3.940

5. Polewicz Dorota, Cadete Virgilio J.J., **Doroszko Adrian**, Hunter Beth E, Sawicka Jolanta, Szczesna-Cordary Danuta, Light Peter E, Sawicki Grzegorz. Ischemia induced peroxynitrite dependent modifications of cardiomyocyte MLC1 increases its degradation by MMP-2 leading to contractile dysfunction. *JCMM* 2011 Vol.15 no.5; s.1136-1147

IF: 5.228

## OMÓWIENIE PRAC WŁASNYCH

### Uszkodzenie mięśnia sercowego w przebiegu asfiksji noworodkowej (praca nr 1 i nr 2)

Pierwsze dwie prace: *Doroszko et al. Basic Res. Cardiol.* 2009 oraz *Doroszko et al. Shock* 2010 stanowią proteomiczną analizę skutków ostrego uszkodzenia układu krążenia u noworodków z asfiksją (model zwierzęcy – świnia). Prace te, wykorzystując techniki proteomiki pozwalające na wgląd w zmiany wzorca ekspresji białek na poziomie fenotypu w odpowiedzi na proces patologiczny, jak i na wskazanie nowych punktów uchwytu działania leków (celów terapeutycznych), umożliwiają zaprojektowanie udoskonalonej terapii noworodków z asfiksją.

Projekt ten był realizowany przeze mnie we współpracy z profesorami PY Cheungiem z University of Alberta (Kanada), G. Sawickim z University of Saskatchewan (Kanada) i D. Szczesna-Cordary z University of Miami (USA). Miał on za zadanie scharakteryzować patofizjologię indukowanego przez stres oksydacyjny uszkodzenia mięśnia sercowego towarzyszącego asfiksji noworodkowej na modelu zwierzęcym (świnia).

Wyniki uzyskane podczas realizacji tego projektu prezentowane były przeze mnie na konferencjach międzynarodowych:

1. **Doroszko A**, Polewicz D, Sawicka J, Cheung PY, Sawicki G. Cardiac dysfunction in animal model of neonatal asphyxia is associated with increased degradation of MLC1 by MMP-2. 16<sup>th</sup> annual Life & Health Sciences Research Conference; Saskatoon, Canada, March 11-13, 2009
2. **Doroszko A**, Polewicz D, Sawicka J, Cheung PY, Sawicki G. Increased degradation of myosin light chain 1 by matrix metalloproteinase-2 results in cardiac dysfunction in an animal model of neonatal asphyxia. *Can J Clin Pharmacol* 2009; Vol 16 (2): 312

3. **Doroszko A**, Polewicz, Sawicka J, Cheung PY, Sawicki G Hypoxia-reoxygenation in neonatal pigs is associated with degradation of MLC1 by MMP-2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2009), 46: S52-S53

4. D. Polewicz, **A. Doroszko**, J. Sawicka, P. Cheung, G. Sawicki.: Cardiac MLC1 degradation by MMP-2 is associated with cardiac dysfunction in an animal model of neonatal asphyxia. *Can.J.Cardiol.* 2009 Vol.25 suppl.B; s.146B poz.392. 62nd Annual Meeting of the Canadian Cardiovascular Society. Edmonton, October 24-28, 2009.

Uzyskane wyniki są pierwszymi danymi w literaturze wskazującymi na ścisłe związki pomiędzy aktywnością sercowej MMP-2, poziomem MLC1, MLC2 i funkcją skurczową lewej komory w warunkach fizjologicznych oraz ich zaniku w warunkach reoksygenacji poprzedzonej hipoksją. Przeprowadzone badania wykazują również, że nasilona degradacja MLC1 jest skorelowana ze wzrostem aktywności MMP-2, a także, że uprzednie modyfikacje potranslacyjne MLC1 indukowane stresem oksydacyjnym (nitrowanie, S-nitrozylacja) zwiększają powinowactwo substratu do enzymu, sprzyjając nasilonej proteolizie. Obserwacje te, w połączeniu z odnotowanym, zwiększonym w warunkach patologicznych generowaniem nadtlenoazotynów (odpowiedzialnych między innymi za aktywację MMP-2 oraz za nitrowanie i nitrozylację MLC1), wskazują na istotną rolę powyżej przedstawionego mechanizmu w powstawaniu skurczowej niewydolności serca. Potwierdzają to wykonane badania *in vitro*, wykazujące kluczowe znaczenie nitrowania i nitrozylacji reszt aminokwasów MLC1 zlokalizowanych w bezpośredniej bliskości miejsca proteolitycznego dla MMP-2 (nitrowana tyrozyna (Y141) zlokalizowana w pozycji P1' i S-nitrozylowana cysteina (C138) w pozycji P3 miejsca katalitycznej proteolizy).

Obserwowane w warunkach fizjologicznych ścisłe korelacje pomiędzy poziomem MLC1 a ocenioną zymograficznie aktywnością MMP-2 mogą stanowić element ważnego, nieopisywanego dotąd mechanizmu regulatorowego odpowiedzialnego za regulację inotropową w warunkach fizjologicznych.

Nitrowanie MLC1 w kardiomiocytach i miocytach mięśni poprzecznie prążkowanych było już uprzednio prezentowane w piśmiennictwie i zjawisko to wiązano głównie z procesami starzenia się. Przedstawione w niniejszej rozprawie prace (nr 1 i 2) wykazują, że nitrowanie białek nie jest wyłącznie powiązane ze zjawiskiem określanym jako *deconditioning*, ale również ma doniosłe znaczenie w pośredniczeniu negatywnych następstw jednego z pięter stresu oksydacyjnego, jakim jest stres nitrozacyjny.

Zaburzenia hemodynamiczne obserwowane były podczas przeprowadzania eksperymentów zaprezentowanych w pracach nr 1 i 2 natychmiast po odnotowaniu hipoksji, podobnie jak ma to miejsce w przypadku ludzkich noworodków z ciężką asfiksją. Pomimo, że współczesne standardy postępowania w resuscytacji noworodków z asfiksją zalecają stosowanie 100% tlenu, należy mieć na uwadze potencjalnie szkodliwe następstwa zbyt szybkiej reoksygenacji i zbyt dużych (gwałtownych) wahań tkankowego potencjału redoks. W przedstawionym w niniejszych pracach modelu zwierzęcym, warunki reoksygenacji są zbliżone do tych, jakie towarzyszą scenariuszowi klinicznemu realizowanemu podczas resuscytacji noworodka.

Ponieważ wzmożona degradacja MLC1 przez MMP-2 jest także obserwowana podczas uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego, może to być wspólny patomechanizm uszkodzenia mięśnia serca przez ostry stres oksydacyjny. W związku z tym, obok antyoksydantów i związków zmiatających nadtlenoazotyny, farmakologiczne zastosowanie inhibitorów MMP-2 oraz inhibitorów nitrowania/nitrozytacji MLC1, stanowić może nową strategię terapeutyczną zmniejszającą zakres uszkodzenia serca przez stres oksydacyjny.

Prezentowane w niniejszej rozprawie wyniki badań są również pierwszymi danymi literaturowymi wykazującymi, że noworodkowa asfiksja poprzez zwiększoną produkcję nadtlenoazotynów powoduje nitrowanie innego białka tworzącego aparat kurczliwy kardiomiocyta, jakim jest MLC2. Prowadzi to także do progresji skurczowej dysfunkcji mięśnia sercowego. Badania, wykorzystując techniki proteomiki, charakteryzują nową, funkcjonalnie istotną modyfikację potranslacyjną MLC2, nasilającą jego następczą degradację. Celem potwierdzenia znaczenia nasilonej produkcji nadtlenoazotynów w patogenezie dysfunkcji skurczowej mięśnia serca, przeprowadziliśmy analizę MS peptydów powstałych po strawieniu trypsyną białka MLC2. Udało się w efekcie wykazać nitrowanie dwóch reszt tyrozynowych. W przeprowadzonym równocześnie eksperymencie *in vitro* z nitrowaniem MLC2 przez nadtlenoazotyny wykazałem obecność znitrowanych homologicznych reszt tyrozyny, ale także wykazaliśmy wzrost podatności znitrowanego w ten sposób MLC2 na proteolityczne działanie MMP-2. Dodatkowo, substytucja tyrozyny przez fenyloalaninę w zsyntezowanym ludzkim mutancie MLC2 chroniła MLC2 przed nitrowaniem *in vitro*, co znajdowało przełożenie na spadek podatności na proteolizę przez MMP-2.

W niniejszym badaniu oceniałem indukowane przez asfiksję modyfikacje MLC2, które prowadziły do spadku jej poziomu i powodowały rozwój skurczowej niewydolności serca. Udało się wykazać, że wzrost produkcji ONOOpowodowany przez globalną hipoksję i reoksygnację skutkuje potranslacyjnymi modyfikacjami MLC2 (nitrowanie, nitrozyłacja) oraz że modyfikacje te są związane ze zwiększoną degradacją MLC2. Stwierdzono także istotne znaczenie tych zdarzeń patofizjologicznych poprzez ocenę ich skutków w aspekcie hemodynamicznej funkcji serca. Modyfikacje potranslacyjne odnotowane w niniejszych eksperymentach są wtórne do działania ostrego stresu oksydacyjnego, co podkreśla jedynie terapeutyczne znaczenie ograniczenia wahań tkankowego potencjału redoks w utrzymaniu prawidłowej homeostazy metabolicznej i funkcji hemodynamicznej serca.

Projekt ten stanowił jedno z prowadzonych badań mających na celu identyfikację czynników związanych z dysfunkcją serca po noworodkowej asfiksji oraz rozwinięcie nowych strategii terapeutycznych celem jej skutecznego leczenia. Potwierdzenie w niniejszych badaniach hipotezy, że dysfunkcja skurczowa mięśnia serca jest związana z degradacją tych białek kurczliwych przez MMP-2 powinno doprowadzić do rozwinięcia nowych strategii terapeutycznych obejmujących zastosowanie swoistych inhibitorów sercowej MMP-2 jako dodatku do konwencjonalnej terapii płynami i środkami

inotropowymi, które nie wykazują istotnego wpływu na efekt końcowy terapii u krytycznie chorych noworodków.

Podsumowując, prace te jako pierwsze dowodzą, że dysfunkcja skurczowa mięśnia sercowego u noworodków poddanych reoksyganacji poprzedzonej asfiksją jest związana z nasiloną degradacją łańcuchów lekkich miozyny (MLC1 i MLC2) przez MMP-2 wtórną do ich uprzedniego nitrowania. Ponieważ umiejętność podtrzymania prawidłowej funkcji skurczowej mięśnia sercowego jest istotną determinantą długofalowości sukcesu terapeutycznego, omówione powyżej patomechanizmy i zdefiniowane cele terapeutyczne mogą być istotnym krokiem na drodze zmniejszania śmiertelności i poprawy odległego rokowania u reanimowanych noworodków.

### **Uszkodzenie płuc indukowane przez stres oksydacyjny towarzyszący mechanicznej wentylacji (praca nr 3)**

Ponieważ pierwsze dwie prace wykazały istotną rolę nadaktywności metaloproteaz macierzy w patogenezie ostrego uszkodzenia układu krążenia, postanowiłem zbadać ich udział w patogenezie uszkodzenia miąższu płuc przez ostry stres oksydacyjny towarzyszący mechanicznej wentylacji. Projekt ten realizowałem w ścisłej współpracy z profesorem Thomasem S. Hurstem podczas mojego stażu podoktorskiego w Kanadzie. Wykorzystując zdobyte przeze mnie umiejętności wykonywania badań z zakresu proteomiki, badaliśmy wpływ ostrego stresu oksydacyjnego towarzyszącego mechanicznej wentylacji na proteom płuc, ze szczególnym uwzględnieniem roli metaloproteazy macierzy-9 (MMP-9) jako enzymu o postulowanej istotnej roli patogenetycznej w ostrym uszkodzeniu płuc. W modelu zwierzęcym mechanicznej wentylacji (szczur) generowano ostre uszkodzenie miąższu płuc, potwierdzone badaniami czynnościowymi (mechanika wentylacji i efektywność wymiany gazowej), a następnie pozyskiwano miąższ płuc do dalszych analiz biochemicznych. Chcąc całościowo ocenić zmiany w proteomie płuc, przeprowadziłem dwukierunkową elektroforezę z następczą analizą różnic w proteomie płuc poddanych wentylacji uszkodzającej miąższ vs. grupa kontrolna (za pomocą spektrometrii masowej), a następnie zidentyfikowałem białka-kandydatów biorących udział w patogenezie VILI i będących jednocześnie potencjalnym celem proteolitycznym dla MMP-9. Kolejny eksperyment pozwolił na ocenę wpływu zahamowania MMP-9 przez doksycyklinę na zakres uszkodzenia płuc - zarówno czynnościowego, jak i biochemicznego. W toku przeprowadzonych badań udało się wykazać, że wentylacja mechaniczna wiąże się z aktywacją MMP-9, co w efekcie prowadzić może do degradacji wielu białek będących jej proteolitycznymi substratami i w efekcie do niewydolności oddechowej. Wykazałem także, że farmakologiczna blokada metaloproteazy macierzy przez doksycyklinę jest skuteczną interwencją terapeutyczną, mającą za zadanie zminimalizować zakres uszkodzenia płuc podczas stosowania mechanicznej wentylacji. Ponieważ projekt ten stanowił kontynuację badań nad patogenetyczną rolą nadmiernej aktywacji metaloproteaz macierzy w warunkach ostrego stresu

oksydacyjnego i w jego realizacji wykorzystałem opanowane przeze mnie metody badawcze z zakresu proteomiki, postanowiłem włączyć go do swojej rozprawy habilitacyjnej, po wcześniejszym uzyskaniu zgody wszystkich współautorów (prof. David J. Johnson zmarł w okresie realizacji projektu).

Projekt ten został zwieńczony publikacją w *Proteome Science*:

**Doroszko A**, Hurst TS, Polewicz D, Sawicka J, Fert-Bober J, Johnson DH, Sawicki G. Effects of MMP-9 inhibition by doxycycline on proteome of lungs in high tidal volume mechanical ventilation-induced acute lung injury. *Proteome Sci.* 2010 Jan 29;8:3.

Praca ta została włączona jako trzeci manuskrypt do mojej rozprawy habilitacyjnej. W oparciu o techniki farmakoproteomiki – stosując lek działający na predefiniowany punkt uchwytu, oceniano jego modulującą rolę na przebieg kaskady zdarzeń patofizjologicznych prowadzących do nieodwracalnego uszkodzenia płuc poprzez mechaniczną wentylację. Badając pracę płuc na poziomie molekularnym i czynnościowym (mechanika oraz sprawność wymiany gazowej), oceniano możliwość zmniejszenia zakresu ich uszkodzenia i wykazano, że proteomiczne definiowanie celów terapeutycznych może być dobrym molekularnym wstępem do wprowadzania terapii zgodnej z zasadami EBM (evidence based medicine).

Indukowane wentylacją uszkodzenie płuc (VILI) jest związane ze zmianami w zakresie wielu białek w płucach. W pracy stanowiącej część niniejszej rozprawy wykazałem, że zastosowanie doksycykliny skutecznie niweluje zmiany funkcjonalne w płucach wentylowanych mechanicznie oraz zmniejsza aktywność MMP-9 w tkance płucnej. Ponadto terapia doksycykliną powoduje up-regulację kilku białek, co potencjalnie mogłoby wyjaśnić obserwowane zmniejszenie podatności tkanki płucnej na VILI. W niniejszej pracy wykazano także wzrost poziomu białek, które odgrywają ochronną rolę w uszkodzeniu płuc w różnych warunkach patologicznych. Wykazano istotne zmiany stężeń 9 białek zidentyfikowanych przez analizę spektrometrii masowej (MS) (rozpuszczalny receptor dla zaawansowanych końcowych produktów glikacji (sRAGE), apolipoproteinę A-I (apoA-I), peroksyredoksynę II (Prx II), 4 molekularne formy albumin i 2 białka bezimienne. Pomimo że rozpoznane białka biorą udział w różnych mechanizmach regulacyjnych, może istnieć wspólny mechanizm prowadzący do ich zmian w stanie patologii, o czym świadczą mogą obserwowane pozytywne korelacje. Ponieważ zahamowanie MMP-9 przez doksycyklinę zapobiega zmianom poziomów białek podczas wentylacji – możliwym jest, że białka te degradowane są przez MMP-9. Dlatego też terapia doksycykliną mogłaby stanowić skuteczną interwencję farmakologiczną ograniczającą to zjawisko, prowadząc w efekcie do zmniejszenia zakresu uszkodzenia płuc podczas wentylacji mechanicznej. Jednakże konieczne są dalsze badania celem weryfikacji tej hipotezy oraz określenia dokładnych implikacji klinicznych.

#### **Uszkodzenie niedokrwienne i niedokrwienno-reperfuzyjne mięśnia sercowego (prace nr 4 i 5)**

Kolejnym krokiem w prowadzonych badaniach była proteomiczna ocena skutków działania ostrego stresu oksydacyjnego towarzyszącego reperfuzji mięśnia sercowego poprzedzonej okresem niedokrwienia. Prace nad tym projektem stanowiły kontynuację prowadzonych przez mnie badań w Cardiovascular Research Group pod kierunkiem prof. G. Sawickiego. Ponieważ rola metaloproteaz macierzy w patogenezie niedokrwienno-reperfuzyjnego mięśnia sercowego została już częściowo poznana oraz została potwierdzona przeze mnie w modelu uszkodzenia mięśnia sercowego opartym na hipoksji-reoksygenacji, zbadaliśmy również rolę modyfikacji potranslacyjnych białek będących ich substratami na ich podatność na następczą proteolizę przez MMP. Ponieważ projekt nr 1 (opisany w pracach nr 1 i 2) wykazał kluczową rolę modyfikacji post-translacyjnych łańcuchów lekkich miozyny w regulowaniu ich następczej interakcji z metaloproteazą macierzy, postanowiliśmy zbadać, czy modyfikacje te mają miejsce podczas wzrostu potencjału redoks towarzyszącego reperfuzji/reoksygenacji, czy też występują już podczas izolowanego niedokrwienia/niedotlenienia, jako efekt np. rozprężenia mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej prowadzącej do nasilonego cytozolowego stresu oksydacyjnego. W projekcie pierwszym wykazałem, że modyfikacje indukowane stresem oksydacyjnym w obrębie łańcucha polipeptydowego MLC1 i MLC2 są kluczowe dla jego stabilności, ponieważ występują w miejscu proteolitycznym dla metaloproteazy macierzy, zwiększając w efekcie jej powinowactwo do substratu (potwierdzone badaniem ko-lokalizacji metodą immunoprecypitacji w następczym immunoblotem, a także z następczą zymografią wykazując dodatkowo aktywację skolokalizowanego białka MMP-2). Ponadto stwierdziliśmy zwiększoną aktywację MMP-2 (zymografia), zarówno całkowitej, jak i związanej z sercowymi izoformami łańcuchów lekkich miozyny w przypadku wahań potencjału redoks towarzyszącemu hipoksji z następczą reoksygenacją lub reperfuzji poprzedzonej niedokrwieniem.

Naturalnym krokiem było zatem zbadanie oddzielnie procesu niedokrwienia oraz reperfuzji, co praktycznie mogłoby się przełożyć na wskazanie momentu rozpoczęcia ewentualnej terapii celowanej (przed epizodem ostrego niedokrwienia – np. w grupie wysokiego ryzyka okluzji tętnicy, czy też dopiero w momencie rozpoczęcia reperfuzji obszaru dotkniętego niedokrwieniem). Ponieważ zarówno fosforylacja, jak i modyfikacje indukowane reaktywnymi formami azotu (nitrowanie i nitrozyllacja) zwiększały podatność na proteolizę, wykonano dwukierunkowe badania:

1. Dokonano analizy mechanizmów zwiększenia właściwości proteolitycznych metaloproteazy macierzy (oceniając zmiany ekspresji białka enzymatycznego, jak i jego aktywności) w modelu *ex vivo* niedokrwienno-uszkodzenia mięśnia serca (praca nr 4)
2. Dokonano farmakoproteomicznej analizy roli stresu nitrozacyjnego w patogenezie niedokrwienno-uszkodzenia mięśnia serca, ze szczególnym uwzględnieniem interakcji metaloproteaza macierzy – białka aparatu kurczliwego (łańcuchy lekkie miozyny, MLC) (praca nr 5). Praca ta – wykorzystując techniki proteomiki – definiuje nowe efektywne punkty uchwytu leków zapobiegających degradacji aparatu kurczliwego kardiomiocytów w odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Wykonane badania na izolowanych *ex vivo* świeżych kardiomiocytach szczurzych wykazały, że wzmożona synteza nadtlenoazotynów występuje już w okresie niedokrwienia, przed rozpoczęciem fazy reperfuzji i prowadzi do nitrowania łańcucha lekkiego miozyny 1 w obrębie miejsca katalitycznego dla MMP-2, prowadząc do następczej degradacji białka kurczliwego, co zauważalnie przekładało się na obserwowaną utratę kurczliwości przez wyizolowane kardiomiocyty. Potencjalne cele terapeutyczne mogą dotyczyć zatem zahamowania nitrowania/S-nitrozylacji, jak również zahamowania MMP-2, zaś zastosowanie leczenia dwukierunkowego może wiązać się z uzyskaniem efektu synergistycznego w zakresie protekcji kardiomiocytów przed uszkodzeniem w ostrej fazie niedokrwienia. Kolejnym krokiem było zbadanie mechanizmów obserwowanej nasilonej aktywności proteolitycznej metaloproteazy macierzy-2 (MMP-2) w warunkach dynamicznie zachodzących zmian tkankowego potencjału redoks, jakie występują w okresie reperfuzji poprzedzonej ostrym niedokrwieniem.

Badania te mają istotne znaczenie praktyczne, bowiem ich wyniki mogą w sposób znaczący i bezpośredni przyczynić się do optymalizacji terapii chorób układu sercowo-naczyniowego.

Projekt ten zaowocował kilkoma publikacjami, z których dwie – po uzyskaniu zgody wszystkich współautorów – postanowiłem włączyć do rozprawy habilitacyjnej (jako manuskrypty nr 4 i 5).

Ponadto wyniki z tego projektu zaprezentowaliśmy na międzynarodowych konferencjach naukowych (CCS, CSPT):

1. V. Cadete, D. Polewicz, **A. Doroszko**, J. Sawicka, B.E. Hunter, P.E. Light, D. Szczesna-Cordary, G. Sawicki.: Ischemia induced ONOO-dependent modifications of cardiomyocyte MLC1 increase MMP-2 dependent MLC1 degradation. *Can.J.Cardiol.* 2009 Vol.25 suppl.B; s.226B-227B poz.666. 62nd Annual Meeting of the Canadian Cardiovascular Society. Edmonton, October 24-28, 2009.
2. D. Polewicz, **A. Doroszko**, J. Sawicka, G. Sawicki.: Ischemia-reperfusion induced phosphorylation of cardiac MLC1 increases its degradation by MMP-2. *Can.J.Cardiol.* 2009 Vol.25 suppl.B; s.105B poz.256. 62nd Annual Meeting of the Canadian Cardiovascular Society. Edmonton, October 24-28, 2009.
3. Polewicz D, Cadete V, **Doroszko A**, Sawicka J, Szczesna-Cordary D, Light PE, Sawicki G. Ischemia-induced nitration and nitrosylation of myosin light chain 1 increase its matrix metalloproteinase-2 dependent degradation in cardiomyocytes. 16<sup>th</sup> annual Life & Health Sciences Research Conference; Canada, March 11-13, 2009
4. Polewicz D, **Doroszko A**, Sawicka J, Sawicki G. Inhibition MLC1 phosphorylation decreases its degradation by MMP-2 and protects contractile function of the heart from ischemia-reperfusion injury. *Can J Clin Pharmacol* 2009; Vol 16 (2): 302-303.
5. Polewicz D, Cadete V, **Doroszko A**, Hunter B, Sawicka J, Szczesna-Cordary D, Light PE, Sawicki G Increased degradation of MLC1 by MMP-2 in cardiomyocytes subjected to ischemia is associated with nitration and nitrosylation of MLC1 molecule. *Can J Clin Pharmacol* Vol 16 (2) 2009:307-308.
6. **Doroszko A**, Polewicz D, Cadete V, Sawicka J, Szczesna-Cordary D, Light PE, Sawicki G. Modifications of cardiac Myosin light chain 1 by peroxynitrite during ischemia increases its degradation by matrix metalloproteinase-2. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2009); 46: S40.



Aby zbadać dokładnie, kiedy dochodzi do zwiększenia proteolitycznych właściwości enzymu i jaki jest jej bezpośredni powód (wzrost ekspresji białka, aktywacja, zmiana ilości inhibitora kompetycyjnego, modyfikacja substratu), opracowałem model zamknięcia gałęzi zstępującej lewej tętnicy wieńcowej (LAD) *in situ* w modelu perfuzji *ex vivo*, na którym prowadziliśmy dalsze badania. Chcąc określić mechanizmy aktywacji metaloproteazy macierzy w opracowanym układzie eksperymentalnym, dokonałem analizy ilościowej enzymu (analiza western blot homogenatów tkankowych mięśnia serca) oraz pomiaru jego aktywacji (zymografia) z uwzględnieniem zmian dystrybucji aktywacji w obrębie serca - obszar zawału, obszar perfundowany przez tętnicę dozawalającą, ale żywotny i obszar unaczyniany przez prawą, niezamykaną tętnicę wieńcową. W modelu tym udało się wykazać, że wskutek ostrego niedokrwienia wzrasta ekspresja białka MMP-2, którego aktywacja jest początkowo ograniczona dzięki mechanizmowi komensacyjnemu, jakim jest równoczesny wzrost ekspresji jej naturalnego tkankowego inhibitora TIMP-4 (tissue matrix metalloproteinase inhibitor -4). Jednakże, po rozpoczęciu reperfuzji dochodzi do utraty TIMP-4, co w efekcie nasila właściwości proteolityczne MMP-2 wobec MLC1, prowadząc w konsekwencji do utraty kurczliwości kardiomiocytu i rozwoju dysfunkcji skurczowej mięśnia lewej komory w ujęciu globalnym.

Uszkodzenie białek aparatu kurczliwego podczas niedokrwienia i następczej reperfuzji jest pośredniczone przez reaktywne formy tlenu, w tym nadtlenoazotyny i prowadzi do progresji skurczowej niewydolności mięśnia serca. Jednakże mechanizmy wyłącznie niedokrwienne uszkodzenia mięśnia serca (brak reperfuzji) pozostają wciąż nie w pełni wyjaśnione. Dlatego też, w pracy nr 5 podjęto próbę weryfikacji hipotezy, że samo niedokrwienie prowadzi już wskutek rozprężenia fosforylacji oksydacyjnej do nasilenia stresu oksydacyjnego (w tym nitrozacyjnego), skutkując nasiloną degradacją już podczas niedokrwienia, a nie jak dotychczas było uważane, wyłącznie podczas reperfuzji i związanego z nią gwałtownym wzrostem potencjału redoks. Znaczenie zmian poziomu MLC1 w kardiomiocytach i aktywności MMP-2 były oceniane w izolowanych *ex vivo* komórkach. Umożliwiło to dodatkowo zbadanie zjawisk patofizjologicznych bezpośrednio na poziomie komórki kurczliwej (kardiomiocyt), z pominięciem komórek śródbłonna naczyniowego oraz tkanki łącznej, mogących zakłócać interpretację obserwowanych zjawisk na poziomie komórki. W badaniach demonstrowanych w pracy nr 5 udało się wykazać, że już samo niedokrwienie nasila degradację MLC1 przez MMP-2, co jest skutkiem zachodzącej uprzednio nitracji i nitrozytacji reszt aminokwasowych MLC1 przez reaktywne formy azotu. Jest to zatem pierwsze badanie wykazujące patofizjologiczne znaczenie osi „ONOO<sup>-</sup> - MLC1 - MMP-2” w regulacji siły skurczu podczas ostrego niedokrwienia. Zademonstrowano po raz pierwszy, że nasilona synteza nadtlenoazotynów ma miejsce w fazie niedokrwienia, a także, że odgrywa ona rolę podobną jak podczas reperfuzji w modyfikowaniu i degradacji białka sarkomeru i tym samym regulacji siły skurczu. Badania te zostały także potwierdzone w modelu *in vitro* na ludzkim MLC1. Wykazano po raz kolejny, że modyfikacja substratu jest kluczowym elementem regulacji działania MMP-2 wewnątrz komórki. Mechanizm ten może

stanowiąc ponadto istotne podłoże patogenetyczne niedokrwienne uszkodzenia mięśnia sercowego. Analiza potranslacyjnych modyfikacji indukowanych poprzez stres nitrozacyjny wykazała w modelu *ex vivo* nitrowanie reszt tyrozyn, Y190 i Y78, a także S-nitrozylację cysteiny, C81, w obrębie peptydu szczurzego MLC1, które występowały także w homologicznych miejscach w ludzkim MLC1 zastosowanym do eksperymentu *in vitro*. Lokalizacja zmodyfikowanej tyrozyny 190 w obrębie miejsca proteolitycznego MLC1 dla MMP-2 wskazuje na mechanizm „uwrażliwienia” MLC1 na proteolizę. Rola pozostałych modyfikacji wymaga dalszych badań.

Badanie potranslacyjnych modyfikacji MLC1 w kontekście ich roli w modulacji podatności na proteolizę przez MMP-2 jest istotne, bowiem wiązać się może z dodatkowymi informacjami dotyczącymi indukowanej przez niedokrwienie degradacji sarkomeru. Potencjalne cele terapeutyczne mogą dotyczyć zahamowania nitracji/S-nitrozylacji, jak również inhibicji MMP-2, zaś zastosowanie leczenia dwukierunkowego może wiązać się z uzyskaniem efektu synergistycznego w zakresie protekcji kardiomiocytów przed uszkodzeniem w ostrej fazie niedokrwienia. W istocie, w badaniu tym zweryfikowano wpływ zmiatania nadtlenoazotynów (stresu nitrozacyjnego) przez FeTPPS (5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenylo)porfirinato-żelazo(III)). Wykazano, że preinkubacja kardiomiocytów w środowisku zawierającym związek zmiatający reaktywne formy azotu chroni przed degradacją MLC1, co znacząco przekłada się na zachowanie przez komórkę siły skurczu. Ponadto, w niniejszym badaniu zweryfikowano zasadność hipotezy dotyczącej roli zahamowania MMP-2, stosując o-fenantrolinę, nieselektywnego inhibitora MMP, stwierdzając wystąpienie znacznego efektu protekcyjnego. Koniecznym jest jednak zweryfikowanie efektywności przytoczonych powyżej strategii terapeutycznych w praktyce klinicznej przed sformułowaniem ostatecznych wniosków dotyczących efektywności tej terapii.

## WNIOSKI

Wyniki zaprezentowane w pracach przedstawionych i omówionych w niniejszej rozprawie pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Dysfunkcja skurczowa mięśnia sercowego u noworodków poddanych reoksygenacji poprzedzonej asfiksją jest związana z nasiloną degradacją łańcuchów lekkich miozyny (MLC1 i MLC2) przez MMP-2, wtórną do ich uprzedniego nitrowania. Ponieważ umiejętność podtrzymania prawidłowej funkcji skurczowej mięśnia sercowego jest istotną determinantą długofalowości sukcesu terapeutycznego, omówione w niniejszych pracach (nr 1 i nr 2) patomechanizmy i zdefiniowane cele terapeutyczne mogą być istotnym krokiem na drodze zmniejszania śmiertelności i poprawy odległego rokowania u reanimowanych noworodków. Konieczne są dalsze badania nowych strategii terapeutycznych obejmujących zastosowanie swoistych inhibitorów sercowej MMP-2 jako dodatku do konwencjonalnej terapii płynami i środkami inotropowymi, które nie wykazują istotnego wpływu na efekt końcowy terapii u krytycznie chorych noworodków.

2. Terapia doksycykliną, jako nieselektywnym inhibitorem metaloproteazy macierzy, zapobiega modyfikacjom białek odgrywających ochronną rolę w uszkodzeniu płuc. Rozpoznane białka mogłyby być proteolitycznym celem dla MMP-9, dlatego zastosowanie doksycykliny może zapobiegać ich degradacji podczas mechanicznej wentylacji, stanowiąc istotny element terapii chroniącej przed uszkodzeniem płuc indukowanym przez mechaniczną wentylację.

3. Ostre niedokrwienie mięśnia serca zwiększa ekspresję metaloproteazy macierzy w kardiomiocytach, która początkowo kompensacyjnie hamowana jest dzięki zwiększającej się równocześnie ekspresji jej naturalnego tkankowego inhibitora (TIMP-4). Okres reperfuzji wiąże się z utratą TIMP-4, a pozostawieniem aktywowanej metaloproteazy macierzy i nasileniem degradacji MLC1 przez MMP-2. Dlatego też farmakologiczne zahamowanie MMP-2 w momencie rozpoczęcia terapii reperfuzyjnej powinno być dobrą opcją terapeutyczną hamującą rozkład białek sarkomeru i tym samym zapobiegającą utracie funkcji skurczowej przez mięsień sercowy.

4. Ostre niedokrwienie mięśnia sercowego w okresie przedreperfuzyjnym powoduje nasiloną produkcję nadtlenoazotynów w kardiomiocytach. Prowadzi do nitrowania i nitrozylacji łańcucha lekkiego miozyny, usposabiając go w ten sposób do nasilonej degradacji przez MMP-2 i utraty kurczliwości przez komórkę. Zahamowanie indukowanych stresem nitrozacyjnym modyfikacji MLC1 oraz inhibicję MMP-2 należy rozważyć jako nową, efektywną strategię terapeutyczną minimalizującą zakres uszkodzenia mięśnia serca przez ostre niedokrwienie. Ponieważ zmiany te obserwowane są jeszcze przed rozpoczęciem reperfuzji, terapia taka mogłaby być rozważona w grupach z wyjściowo dużym ryzykiem niedokrwienych incydentów sercowo-naczyniowych (np. dławica piersiowa niestabilna i/lub pacjenci z zaawansowaną chorobą trójnaczyńową bez opcji bezpiecznej rewaskularyzacji).

Przeprowadzane badania będące treścią publikacji stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy dostarczają wiele nowych, istotnych informacji dotyczących molekularnych mechanizmów uszkodzenia układów krążenia i oddechowego w warunkach ostrego stresu oksydacyjnego. Definiują one przez to precyzyjnie nowe punkty uchwytu działania leków i tym samym pozwalają na stworzenie nowych koncepcji terapeutycznych, wspierających znacząco istniejące dotychczas i powszechnie stosowane w praktyce klinicznej. Jakkolwiek, konieczne są dalsze, kliniczne badania weryfikujące zgodnie z zasadami EBM ich efektywność w praktyce.

#### **4. POZOSTAŁE PROJEKTY (DOROBEK POZA-HABILITACYJNY):**

##### **1. Udział prostanoidów i tlenu azotu w patogenezie dysfunkcji śródbłonka i nadciśnienia tętniczego**

*subsydiowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) - projekt doktorancki, którego byłem autorem i głównym wykonawcą*

Celem projektu było wyjaśnienie roli zaburzeń metabolizmu tlenu azotu oraz szlaku metabolicznego cyklooksigenazy w patogenezie dysfunkcji śródbłonka u osób zdrowych, jak i z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Projekt ten stanowił treść mojego doktoratu. Mechanizmy dysfunkcji śródbłonka w dalszym ciągu pozostają przedmiotem badań i dyskusji, a ich wyjaśnienie u osób z nadciśnieniem tętniczym i bez niego umożliwi zarówno poprawę skuteczności leczenia, jak i profilaktykę dysfunkcji śródbłonka, która jest obecnie uznawanym istotnym ogniwem patogenetycznym i czynnikiem ryzyka w większości chorób układu krążenia.

W oparciu o liczne dowody przyjmuje się, że śródbłonek naczyniowy odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu odpowiedniego napięcia i struktury ściany naczynia, zaś zaburzenia inicjujące rozwój i propagujące progresję miażdżycy obejmują pierwotnie właśnie te komórki. Obecnie uważa się, że podstawowe funkcje śródbłonka, będącego największym, również pod względem powierzchni, organem o krytycznej lokalizacji pomiędzy krwią a ścianą naczynia i tkankami, wiążą się w szerokim zakresie z utrzymaniem homeostazy układu krążenia i całego organizmu. W warunkach fizjologicznych jest on integralnym elementem warunkującym utrzymywanie homeostazy naczyniowej poprzez uwalnianie wielu mediatorów o działaniu auto- i parakrynnym, przy czym dominujący udział przypada mechanizmom torującym wazodylatację, hamującym odczyn zapalny, agregację płytek i proliferację miocytów ściany naczynia. Dysfunkcja śródbłonka, w ogólnym ujęciu, charakteryzuje się zmniejszeniem potencjału wazodylatacyjnego, wzrostem aktywności prozapalnej i proagregacyjnej. Mechanizmy współuczestniczące w obniżeniu zdolności wywoływania rozkurczu ściany naczynia przez śródbłonek obejmują m.in. zmniejszenie syntezy tlenu azotu (NO), stres oksydacyjny, zaburzenia regulacji biotransformacji metabolitów kaskady kwasu arachidonowego.

Do badań włączyłem 70 mężczyzn w wieku 18-40 lat, którzy zakwalifikowani zostali do jednej z 2 grup: - 1.- zdrowi lub 2.- z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. Wykluczono z badania: chorych z cukrzycą, z wtórnym nadciśnieniem, chorobami przebiegającymi z przewlekłymi stanami zapalnymi, wykrytymi nowotworami, zaburzeniami psychicznymi i innymi problemami zdrowotnymi mogącymi zakłócać interpretację uzyskanych wyników. Następnie porównałem wyjściowe stężenia intermediatów szlaków tlenu azotu i prostanoidów oraz markery stresu oksydacyjnego; Jednocześnie porównano zdolność rozkurczową tętnicy ramiennej po bodźcu niedokrwinnym (FMD) w warunkach wyjściowych, następnie po dożylnym wlewie L-Argininy, jako substratu dla syntazy tlenu azotu, po czym porównałem

ww. parametry pomiędzy grupami po podaży inhibitora nieselektywnego cyklooksygenazy (indometacyny).

W badaniach tych wykazałem, że dysfunkcja śródbłonna u młodych osób bez nadciśnienia jest zależna przede wszystkim od niedoboru tlenu azotu, wskutek zmniejszonej jego syntezy, natomiast u młodych mężczyzn z nadciśnieniem - dysfunkcja śródbłonna jest spowodowana nadmiernym zmiataniem tlenu azotu przez wolne rodniki generowane w kaskadzie kwasu arachidonowego z wytworzeniem nadtlenoazotynów (ONOO<sup>-</sup>). Farmakologiczna blokada cyklooksygenazy wiązała się ze zwiększeniem biodostępności NO oraz ze spadkiem syntezy nadtlenoazotynów i zmniejszeniem stresu oksydacyjnego (m.in. lipoperoksydacji) oraz wzrostem potencjału antyoksydacyjnego (współczynnik tiolowy) u osób z jednoczesną dysfunkcją śródbłonna i z nadciśnieniem tętniczym.

Nadciśnienie tętnicze i dysfunkcja śródbłonna okazały się być w pewnym zakresie od siebie niezależne i charakteryzuje je odmienny wzorzec regulacji mechanizmów kontrolujących napięcie ściany naczynia. Dysfunkcja śródbłonna, zarówno w grupie kontrolnej jak i badanej jest zależna od stresu oksydacyjnego, jakkolwiek istotna rola szlaku cyklooksygenazy zauważalna była wyłącznie w grupie nadciśnienia tętniczego, Grupa osób z jednoczesnym nadciśnieniem tętniczym i dysfunkcją rozkurczową śródbłonna wydaje się być grupą dobrych kandydatów do włączenia profilaktycznie leków blokujących COX,

Badania te mają istotne implikacje praktyczne, ponieważ definiują grupę osób z nadciśnieniem tętniczym i równoczesną dysfunkcją śródbłonna, jako kandydatów do terapeutycznej blokady cyklooksygenazy nie tylko ze względu na działanie antyagregacyjne w prewencji ostrych zdarzeń sercowo-naczyniowych, ale także ze względu na niwelację stresu oksydacyjnego prowadzącego do dysfunkcji śródbłonna, a następnie inicjacji i propagacji procesów aterogenezy.

Dotychczas projekt ten zaowocował moją rozprawą doktorską oraz manuskryptem opublikowanym w Hypertension Research:

*Doroszko A, Andrzejak R, Szuba A. Role of the nitric oxide metabolic pathway and prostanoids in pathogenesis of essential hypertension and endothelial dysfunction in young men. Hypertens Res. 2011 Jan;34(1):79-86.*

Ponadto zostałem nagrodzony "Young Investigator Award" na 4 Międzynarodowym Sympozjum ADMA. Bregenz, Austria, Sierpień 2008:

*Doroszko A, Szuba A. Role of metabolic pathway of nitric oxide and of arachidonic acid's cascade in pathogenesis of endothelial dysfunction (ED) and arterial hypertension (HTN) in young men. ADMA 2008 - 4th International Symposium on ADMA. Bregenz (Austria), August 28-29, 2008.*

Wyniki tego projektu były także prezentowane przez studentów kierowanego przeze mnie koła naukowego na międzynarodowej studenckiej konferencji w Berlinie:

1. *Maciej Jakubowski, Bartosz Sieczkowski, Julita Porwolik, Andrzej Szuba, Adrian Doroszko. Nitric oxide metabolic pathway and cascade of arachidonic acid in pathogenesis of Essential hypertension and endothelial dysfunction in young men. 20th ESC (European Students' Conference). Berlin. 4-7 Oct. 2009*

2. Bartosz Sieczkowski, Maciej Jakubowski, Julita Porwolik, Andrzej Szuba, **Adrian Doroszko**. *Prostanoids and nitric oxide's metabolic pathway in pathogenesis of essential hypertension in young men. 20th ESC (European Students' Conference). Berlin. 4-7 Oct. 2009*

Z uwagi na relatywnie wysoką częstość występowania zjawiska aspirynooporności w populacji ogólnej, do swojego projektu doktorskiego stosowałem indometacynę, aby mieć pewność uzyskania zahamowania cyklooksygenazy (w piśmiennictwie nie znalazłem wówczas danych sugerujących oporność COX na indometacynę). Ponieważ farmakologiczna blokada cyklooksygenazy w ramach prewencji sercowo-naczyniowej przeprowadzana jest obecnie wyłącznie z zastosowaniem kwasu acetylosalicylowego, postanowiłem kontynuować dotychczasowe badania – stosując opracowany przeze mnie w pracy doktorskiej protokół badawczy śródbłonna do analizy przyczyn aspirynooporności, chcąc w ten sposób połączyć swoje zainteresowania z okresu studiów doktoranckich z umiejętnościami w zakresie technik proteomiki nabytymi podczas mojego stażu podoktorskiego w Kanadzie.

Udało mi się uzyskać finansowanie dalszych projektów w ramach dotacji z Unii Europejskiej w programie Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej oraz w ramach programów Iuventus Plus - dwa projekty (p. niżej pkt 2, 3. i 4.).

## **2. Badania patogenezy aspirynooporności w aspekcie powiązań z funkcją śródbłonna naczyniowego**

*Projekt dotowany ze środków UE w ramach projektu Wrovasc – Zintegrowane centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej - byłem autorem tego projektu i pełniłem w nim rolę głównego badacza*

Oporność na kwas acetylosalicylowy jest definiowana na podstawie objawów klinicznych (incydent zakrzepowy podczas stosowania ASA), jak również za pomocą szeregu markerów świadczących o właściwościach agregacyjnych płytek. Badania kliniczne jednoznacznie wskazują na wysoką skuteczność ASA w profilaktyce pierwotnej i wtórnej incydentów sercowo-naczyniowych, jednakże oporność na ASA wynosi, wg różnych szacunków 5-45%. Jednym z pierwszych doniesień wskazujących na kliniczne znaczenie oporności na ASA było kohortowe badanie przeprowadzone na grupie chorych z udarem mózgu, gdzie wykazano występowanie oporności u 30% badanych. W kolejnych badaniach wykazano z kolei znamienne częstsze występowanie oporności w grupie osób z klinicznie jawnym niedokrwieniem OUN w porównaniu do grupy z asymptotyczną chorobą naczyń OUN. Analogicznie, wysoką częstością występowania oporności na ASA charakteryzowali się chorzy z chromaniem przestankowym w przebiegu miażdżycy zarostowej tętnic kończyn dolnych, a w obserwacji półtorarocznej stwierdzano u nich 87% większe ryzyko okluzji tętnicy. Wykazano istnienie związku pomiędzy występowaniem aspirynooporności a zwyżką CK-MB u chorych poddawanych koronaroplastyce. Wyniki badania HOPE także wskazują na znamienne wzrost ryzyka zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie chorych, u których stwierdzono większe ilości 11-dehydrotromboksanu B2 w

moczu pomimo stosowania ASA. Większy odsetek aspirynooporności wykazano w grupie chorych ze stwierdzona zakrzepicą w stencie.

Dotychczas otwartą pozostaje kwestia znaczenia ASA w optymalizacji kardiologicznej farmakoterapii, zwłaszcza w świetle do niesień o braku skuteczności w profilaktyce pierwotnej incydentów sercowo-naczyniowych u pacjentów z cukrzycą typu 2, a pełniejsze poznanie jej zarówno korzystnych jak i negatywnych wpływów na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego i zależności od dawki, powinny przyczynić się do bardziej klarownego wyłonienia grup chorych, w których korzyści z zastosowania ASA znamienne przewyższają ryzyko powikłań.

Korzystny efekt stosowania ASA w chorobach układu sercowo-naczyniowego często sprowadzany jest do jego działania antyagregacyjnego, zaś niemal zupełnie pomijany jest wpływ ASA i innych niesterydowych leków przeciwzapalnych na funkcję śródbłonna. Dokładny mechanizm tych interakcji nie został poznany, sporo danych wskazuje jednak na możliwość modulowania lokalnej aktywności układu adrenergicznego, odpowiedzialnego za regulację uwalniania reniny z układu przykłębuszkowego.

Realizując założenia projektu dokonałem analizy zjawiska aspirynooporności na poziomie interakcji płytek ze śródbłonkiem u młodych osób zarówno zdrowych, jak i z nadciśnieniem tętniczym (ale bez innych schorzeń przewlekłych), u których możliwe jest zastosowanie *lege artis* terapii działającej na układ RAA (włączenie do leczenia sartanów). Grupy osób aspirynoopornych i wrażliwych na aspirynę selekcionowano w oparciu o wyniki agregacji płytek w krwi pełnej w teście aspirynooporności po zastosowaniu terapii kwasem acetylosalicylowym w dawce kardioprotekcyjnej. W celu bardziej kompleksowej oceny procesów aterogenezy w obu podgrupach, porównano sztywność naczyń (oceniając szybkość propagacji fali tętna) oraz zbadano wazodylatacyjną funkcję śródbłonna metodą dopplerowskiej oceny FMD (wczesne rewelatory miażdżycy). O ile nie stwierdzono znamiennych różnic w zakresie szybkości propagacji fali tętna pomiędzy badanymi podgrupami, zauważono jednak, że grupa osób aspirynoopornych charakteryzowała się występowaniem wazodylatacyjnej dysfunkcji śródbłonna, co dotychczas nie było opisane w literaturze. Ponieważ dysfunkcja śródbłonna jest uznawana za istotny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, konieczne jest dokładne zbadanie jej związków z opornością na kwas acetylosalicylowy.

Chcąc określić przyczyny zmniejszonej biodostępności NO, warunkującego prawidłową wazodylatacyjną odpowiedź naczyń na zwiększone oddziaływanie sił ścinających w okresie reperfuzji poprzedzonej niedokrwieniem, brano pod uwagę zmniejszoną syntezę NO lub jego nasiloną degradację, co badano opracowanym wcześniej i opublikowanym protokołem stosowanym w mojej rozprawie doktorskiej. Podaż dożylna L-Argininy, substratu dla syntazy tlenku azotu (NOS), niwelowała te różnice, podobnie jak zastosowanie aspiryny. Obie interwencje farmakologiczne zastosowane równocześnie nie wykazywały efektu synergistycznego. Z uwagi na porównywalne poziomy endogennej L-Arg oraz inhibitora kompetycyjnego dla NOS (asymetrycznej dimetyloargininy – ADMA) i współczynnika L-

Arg/ADMA – można przypuszczać, że biodostępność substratu dla NOS w obu grupach jest porównywalna, zaś obserwowana różnica w wartościach FMD mogła wynikać z nasilonej degradacji NO u osób aspirynoopornych wskutek nasilonego stresu oksydacyjnego, co potwierdzają wyniki MDA odzwierciedlającej lipoperoksydację (wyższe w grupie osób aspirynoopornych) oraz współczynnika tiolowego będącego wskaźnikiem potencjału antyoksydacyjnego (niższy u osób aspirynoopornych). Nie wykazano znamienych różnic w zakresie stężeń cytokin prozapalnych między badanymi podgrupami. ASA oporni charakteryzowali się zwiększoną syntezą tromboksanu.

Interesującą obserwacją jest fakt, że osoby aspirynooporne charakteryzowały się zwiększoną odpowiedzią agregacyjną na dwóch pozostałych agonistów (pre-aktywacja), co wskazywać może na potencjalnie wyższe wyjściowe ryzyko incydentów zakrzepowo-zatorowych w tej subpopulacji, nawet bez istotnych schorzeń współistniejących. Jednocześnie brak jest w obecnej literaturze prospektywnych badań oceniających znaczenie zjawiska pierwotnej oporności na kwas acetylosalicylowy w grupie osób potencjalnie zdrowych, zaś wyniki naszej pracy wskazują na potrzebę obserwacji tej populacji. Kolejną interesującą obserwacją jest odnotowany wyższy wskaźnik aldosteron/aktywność reninowa osocza (ARO) i jednocześnie niższe wartości ARO w grupie osób ze stwierdzoną opornością na kwas acetylosalicylowy.

Podsumowując, aspirynooporność jest zjawiskiem występującym wśród młodych potencjalnie zdrowych osób i wykazuje związek z dysfunkcją śródbłonna będącą czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego i jednym z etapów aterogenezy. Płytki osób aspirynoopornych charakteryzują się zwiększoną odpowiedzią agregacyjną na pozostałych agonistów, co wskazywać może na potencjalnie wyższe wyjściowe ryzyko incydentów zakrzepowo-zatorowych w tej subpopulacji, nawet bez istotnych schorzeń współistniejących. Płytki odporne na aspirynę cechują się nadprodukcją tromboksanu. Antagoniści receptora 1 angiotensyny II (sartany), poza działaniem hipotensyjnym, wykazują także właściwości modulujące hemostazę płytkową. Zwiększają w ilościach zależnych od stężenia syntezę tlenku azotu, który z kolei swoje silne działanie przeciwplatekcyjne wywiera m.in. poprzez bezpośrednie zahamowanie agregacji płytek indukowanej tromboksanem. Dotychczas brak jest danych w literaturze dotyczących roli sartanów w modulowaniu odpowiedzi płytek na farmakoterapię kwasem acetylosalicylowym.

Realizacja tego projektu zaowocowała dotychczas jedną pracą oryginalną:



**Doroszko A**, Szahidewicz-Krupska E, Janus A, Jakubowski M, Turek A, Ilnicka P, Szuba A, Mazur G, Derkacz A. Endothelial dysfunction in young healthy men is associated with aspirin resistance. *Vascul Pharmacol.* 2015 Feb 17 IF=3,620

Efektem tego projektu są też dwie rozprawy doktorskie, w których jestem promotorem pomocniczym:

1. dr n. med. K. Podgórska: "Wpływ regularnej aktywności fizycznej na funkcję śródbłonna i wybrane parametry aktywności płytek krwi" (postępowanie ukończone w 11.2014r., promotor: dr hab. A. Derkacz)
2. dr n. med. A. Janus: "Wpływ insulinooporności i hiperinsulinemii na funkcje śródbłonna naczyniowego i płytek krwi u młodych mężczyzn" (postępowanie ukończone w 11.2015r. promotor: prof. dr hab. G. Mazur)

oraz dwiema pracami magisterskimi (sprawowałem opiekę nad magistrantami jako promotor pomocniczy):

1. Badanie elastyczności tętnic i wybranych aspektów funkcji śródbłonna u piłkarzy ręcznych. Autor: S. Suwiczak - Wydział Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, promotor – prof. dr hab. A. Szuba, 2010 r.
2. Elastyczność tętnic i wybrane parametry funkcji śródbłonna u graczy w Futbolu Amerykańskim. Autor: M. Job - Wydział Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, promotor – prof. dr hab. A. Szuba, 2010 r.

### **3. Farmakoproteomiczna analiza patogenezы aspirynooporności**

*kierowany przeze mnie projekt w ramach grantu Iuventus Plus subsydiowanego przez MNiSW mojego autorstwa*

Pomimo systematycznie powiększającego się arsenału leków przeciwplatek, incydenty zakrzepowo-zatorowe i ich powikłania są zjawiskiem częstym w praktyce klinicznej. Kwas acetylosalicylowy (ASA) okazuje się być w wielu przypadkach nieskuteczny. Aspirynooporność jest poważnym problemem w praktyce klinicznej, którego patogenezа pozostaje wciąż przedmiotem licznych badań i kontrowersji. Dotychczas nie udało się jednoznacznie ustalić jej patogenezы ani też wykazać, czy jest ona zjawiskiem potencjalnie odwracalnym poprzez określone interwencje terapeutyczne.

Odkąd płytki krwi okazały się być jednymi z głównych wyznaczników patologicznych modyfikacji procesów naprawy naczyń, zastosowanie technik analizy proteomu w powiązaniu z oceną ich funkcji powinno umożliwić ocenę czynników determinujących indywidualną zmienność ich czynności. Analizując proteom płytek u pacjentów aspirynoopornych i aspirynowrażliwych, poszukiwałem patomechanizmów oporności (zmniejszonej odpowiedzi) na ASA i możliwości jej przełamania, ale także oceniamy parakryny wpływ funkcji śródbłonna na funkcję płytek. Wiadomym jest, że aktywacja śródbłonna prowadzi do aktywacji płytek, ale także, że leki przeciwplatekowe poprawiają funkcję śródbłonna.

Celem projektu było poddanie próbie falsyfikacji hipotez o braku różnic w zakresie fenotypu funkcji śródbłonna oraz o braku różnic w proteomie płytek krwi w zależności od wrażliwości na kwas

acetylosalicylowy. Poszerzenie wiedzy z zakresu patogenezы aspirynooporności powinno w dalszej perspektywie znaleźć przełożenie praktyczne w postaci redukcji ryzyka zgonów z powodu powikłań zakrzepowo-zatorowych w populacji stosującej ASA w farmakoprofilaktyce.

Do badania włączono 61 zdrowych ochotników w wieku 18-60 lat z udokumentowanym brakiem schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Wykluczano z badania osoby z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, chorobami przebiegającymi z przewlekłymi stanami zapalnymi, zaburzeniami psychicznymi, wykrytymi nowotworami, uczulone na niesterydowe leki przeciwzapalne, biorące przewlekle ASA lub inne niesterydowe leki przeciwzapalne. Kwalifikacja nastąpiła w oparciu o wyniki badań agregometrycznych oczyszczonych płytek krwi (ocena agregacji indukowanej przez agonistów i stopnia jej zahamowania po pre-inkubacji z kwasem acetylosalicylowym).

Następnie porównano obie grupy na poziomie fenotypu funkcji śródbłónka, aktywności płytek krwi, a w dalszej kolejności na poziomie analizy proteomu płytek. W oparciu o uzyskany materiał od osób wrażliwych i niewrażliwych na supresję agregacji przez ASA, dokonano powiązania aspirynooporności z oszacowanym ryzykiem sercowo-naczyniowym, w oparciu o jego konwencjonalne markery biochemiczne, ale przede wszystkim z fenotypem śródbłónka ocenionym na podstawie badań czynnościowych (EndoPad, Laser Doppler – badanie zmian przepływu w mikrokrążeniu w odpowiedzi na jontoforezę pilokarpinową) oraz biochemicznych odzwierciedlających ryzyko sercowo-naczyniowe i badań markerów aktywacji śródbłónka i płytek krwi. Następnie porównano proteom pomiędzy grupami wrażliwymi i niewrażliwymi na ASA. Wykonano elektroforezy 2D, a także badania LC/MS próbek materiału biologicznego porównując ze sobą badane grupy.

Zmniejszona antyagregacyjna efektywność ASA wiązała się z gorszą odpowiedzią mikrokrążenia na przezskórną jontoforezę pilokarpinową ocenioną za pomocą przepływomierza laserowego. Nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w zakresie wskaźnika reaktywnego przekrwienia (RHI, reactive hyperemia index) pomiędzy grupami zmierzonego metodą EndoPat. Ponadto wykazano jedynie słabą korelację pomiędzy współczynnikiem przepływu (flow ratio, zmierzonego przepływomierzem laserowym) a bezpośrednim i zlogarytmowanym wskaźnikiem RHI (zmierzonymi metodą EndoPat). Wykazano znamienne niższy poziom VEGF w grupie osób wrażliwych na ASA, nie stwierdzając jednocześnie istotnych różnic w zakresie pozostałych oznaczanych markerów aktywacji śródbłónka, metabolitów szlaku tlenu azotu ani oznaczanych markerów stresu oksydacyjnego.

Odpowiedź płytek krwi na agregację indukowaną kwasem arachidonowym ulegała zahamowaniu przez kwas acetylosalicylowy u 36 osób, u 25 natomiast wykazano istnienie zmniejszonej reaktywności na ASA. Ponadto płytki osób ASA opornych cechowały się wyjściowo silniejszą agregacją w odpowiedzi na kwas arachidonowy. Osoby wrażliwe na ASA charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem PAI-1.

W wykonanej elektroforezie 2D mającej za zadanie porównanie pelletów płytek po agregacji oraz nieaktywowanych płytek uwidoczniono różnice ilościowe i jakościowe, wobec czego podjęto decyzję o

wykonaniu badań LC/MS. W wykonanych badaniach LC/MS porównujących zarówno płytki nieaktywowane, jak i agregaty płytek od osób niewrażliwych na ASA z osobami wrażliwymi na ASA po indukcji agregacji kolagenem wykazano, że białkiem różnicującym grupy w obu przypadkach jest anhydraza węglanowa. Analiza porównawcza proteomów supernatantów zawierających białka uwalniane przez płytki w procesie agregacji w odpowiedzi na określonego agonistę nie wykazała różnic. Gdy porównywano proteomy płytek nieaktywowanych z agregatami kolagenowymi, wykazano kilkanaście białek różnicujących. Wśród nich jest pula wspólna białek, różnicująca materiał niezależnie od odpowiedzi na ASA (są to: alfa-1-antytrypsyna, alfa-1-synukleina, składowa C3 dopełniacza, łańcuchy alfa, beta i gamma fibrynogenu, nidogen, domeny PDZ i LIM białka 1, albumina, białko SPARC, transtyretyna, białko trem-like oraz zyksyna), a także pule białek różnicujących tylko w grupie wrażliwych na ASA (płytkowa GP IX, sortilina, trombospondyna oraz białko S) i w grupie niewrażliwych na ASA (białko A4 amyloidu beta, kaldesmon, kalumenina, białko 1 bogate w cysteinę i glicynę, białko wiążące FYN, płytkowa GP V, synaptosomalne białko 23, tymozyna beta-4, białko zawierające powtórzenia WD).

Przeprowadzone wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Osoby ze zmniejszoną odpowiedzią na ASA charakteryzowały się gorszą reaktywnością mikrokrążenia na pilokarpinę w porównaniu do osób w pełni wrażliwych na ASA. Obserwacja ta nie znalazła odzwierciedlenia w badaniu EndoPat. Wobec tego konieczne jest dalsze badanie powiązań zaburzeń funkcji płytek z dysfunkcją wazodylatacyjną śródbłonna, a także z fenotypem jego funkcji zapalanej i prokoagulacyjnej celem lepszego zrozumienia patogenezy oporności płytek na ASA i możliwości znalezienia jej predyktorów.
2. Wykazano, że istnieje zaledwie słaba korelacja pomiędzy obiema metodami badania funkcji wazodylatacyjnej śródbłonna, przy czym każda z nich wykazuje różny stopień powiązania z reaktywnością na kwas acetylosalicylowy. Wobec tego konieczne są dalsze badania perspektywne oceniające ich wartość prognostyczną i swoistość w przewidywaniu incydentów sercowo-naczyniowych.
3. Badania z zakresu proteomiki sugerują powiązanie zjawiska zmniejszonej reaktywności na kwas acetylosalicylowy z ilością anhydrazy węglanowej w cytozolu płytek krwi.

Wyniki tego projektu prezentowane były na konferencji European Atherosclerosis Society w Madrycie w 2014r. i opisane są w powstającym obecnie manuskrypcie:

**A. Doroszko, M. Jakubowski, E. Szahidewicz-Krupska, J. Dębski, A. Turek, J. Gawryś, K. Rdzanek, A. Derkacz:** Platelet carbonic anhydrase II limits antiaggregatory effect of Aspirin and may be responsible for aspirin resistance: a LC/MS proteomic study

Przy realizacji tego projektu zaangażowany jest doktorant lek. M. Jakubowski, nad którym sprawuję opiekę naukową.

#### **4. Wykorzystanie proteomiki do poszukiwania biomarkerów udaru niedokrwiennego mózgu i punktów uchwytu dla działania nowych leków o działaniu neuroprotekcijnym**

*Kierowany przeze mnie projekt w ramach grantu *Iuventus Plus* subsydiowanego przez MNiSW mojego autorstwa*

Projekt ten stanowi kontynuację moich badań z zakresu proteomicznej analizy skutków działania ostrego stresu oksydacyjnego w modelach uszkodzenia układów sercowo-naczyniowego i oddechowego. Jest on jednocześnie rozszerzeniem prowadzonych przeze mnie dotychczas badań nad proteomiką płytek i farmakoproteomiką aspirynooporności oraz patofizjologii dysfunkcji śródbłonna.

Udar mózgu jest trzecią co do częstości przyczyną zgonów i główną przyczyną trwałego kalectwa u osób dorosłych. W Polsce odnotowuje się ok. 60 000 nowych zachorowań na udar niedokrwienny, a zapadalność szacuje na około 175/100 000 mężczyzn i 125/100 000 kobiet. Przeprowadzone dotychczas badania z zakresu patologii molekularnej pozwoliły na wytypowanie kilku biomarkerów mających potencjalny związek z ostrym incydentem niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego i mogących wykazywać pewne znaczenie rokownicze. Badania ostatnich lat wskazują na prawdopodobne znaczenie osteoprotegeryny, białka S-100, czy BNP jako biomarkerów udaru, lecz żaden z nich jak dotąd nie charakteryzował się wystarczającą czułością i swoistością by móc rekomendować jego oznaczenie rutynowo w praktyce klinicznej. Nadal zauważalny jest brak markerów ostrego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, korespondujących ściśle z rozległością ogniska niedokrwiennego i wykazujących dynamikę zmian w czasie, co pozwoliłoby także na rozpoznanie dorzutu udaru w czasie szybszym niż wystąpienie zmian ogniskowych widocznych w badaniach neuroobrazowych. Udar mózgu jest coraz częściej rozumiany jako „ostry zespół mózgowy”, co podkreśla analogię do ostrych zespołów wieńcowych, stąd też wykrycie biochemicznych markerów naczyniopochodnego uszkodzenia mózgu, powinno mieć podobne znaczenie diagnostyczne i prognostyczne jak oznaczenie troponiny lub CK-MB w zawale mięśnia sercowego.

Nadrzędnym celem niniejszego projektu jest poszerzenie wiedzy z zakresu patogenezы choroby naczyniowej mózgu, co jednocześnie powinno znaleźć przełożenie praktyczne w znaczącej redukcji ryzyka zgonów i niesprawności z powodu udaru, jak i przewlekłego niedokrwienia mózgu. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do sprecyzowania obiektywnych biomarkerów mających dużą użyteczność w praktyce prowadząc w efekcie do zmiany stosowanych procedur medycznych.

Do badania włączono  $n=32$  pacjentów w wieku 18-80 lat z rozpoznanym świeżym udarem niedokrwiennym mózgu (wykluczając osoby z niedokrwistością, zaburzeniami hemostazy, klinicznymi wskazaniami do przewlekłej terapii antykoagulacyjnej, w tym migotaniem przedsionków, wcześniejszą historią schorzeń ośrodkowego układu nerwowego (OUN), nowotworami oraz osoby niezdolne do wyrażenia świadomej zgody).

Grupę kontrolną stanowią ochotnicy, dobrani pod względem charakterystyki demograficznej do uzyskanej grupy badanej (30 osób). W grupach tych dokonano analizy ryzyka sercowo-naczyniowego,

fenotypu funkcji śródbłonna i parametrów agregacji płytek. Przeprowadzono także analizę różnic proteomu i peptydomu osocza oraz płytek krwi pomiędzy grupą badaną i kontrolną, a także w obrębie grupy badanej w szeregach czasowych (pierwsza doba hospitalizacji, po 48h i tygodniu od włączenia do badania).

Brano pod uwagę: wiek, płeć, morfologię krwi obwodowej, OB, badania biochemiczne krwi (lipidogram, CRP, jonogram, glikemia, mocznik, kreatynina, AST, ALT, białko całkowite, bilirubina całkowita, TSH, parametry krzepnięcia). Funkcje śródbłonna charakteryzowano w oparciu o wyniki badania czynnościowego - laser doppler z reaktywnym wzrostem przepływu w odpowiedzi na bodziec cieplny, a funkcję płytek w oparciu o testy agregacji krwi pełnej. Ponadto oceniono stężenia markerów aktywności śródbłonna i płytek we krwi (TxB2, 6-keto-PGF-1alfa, VEGF, sE- i sP-selektyna, sVCAM-1, sICAM-1 oraz PAI-1, metabolity szlaku tlenu azotu ADMA, SDMA, L-Arginina, analiza proteomu i peptydomu).

Realizując niniejszy projekt uzyskano dotychczas następujące wyniki i wnioski:

1. Obserwowana u pacjentów ze świeżym udarem niedokrwiennym z utrzymującym się niedowładem kończynowym upośledzona funkcja śródbłonna naczyniowego może być niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu (nie korelowała bowiem istotnie z innymi konwencjonalnymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego), jednakże mogło być spektrum fenotypu ostrej fazy udaru jako takiego, jakkolwiek o tym mogłaby rozstrzygnąć jedynie analiza retrospektywna badań śródbłonna osób z występującym udarem. Dysfunkcja ta wynika głównie ze zmniejszonej biodostępności tlenu azotu na skutek niższych stężeń substratu dla jego syntazy przy wyższych stężeniach inhibitora kompetycyjnego, a także wynikać może ze zmiatania tlenu azotu, na co wskazuje niższy status antyoksydacyjny chorych.
2. Odnotowane różnice w zakresie średniej objętości płytki, odzwierciedlające ich wiek i zdolność do aktywacji może pośrednio wskazywać na zaangażowanie określonej subpopulacji płytek w aktywację procesu zakrzepowego w ostrej fazie udaru. Wymaga to jednak weryfikacji metodą bardziej szczegółowych badań (np. immunofenotypowanie płytek cytofluorymetrią przepływową). Świadczyć za tą tezę może także odnotowany w szeregach czasowych spadek stężenia tromboksanu i tendencja spadkowa sP-selektyny, jakkolwiek taki kierunek zmian poziomu tych markerów może być wyłącznie wtórny do terapii przeciwplatekowej zastosowanej w terapii pacjentów z udarem.
3. Wzrost VEGF pacjentów z udarem świadczy o aktywacji angiogennej nieselektywnie śródbłonna lub płytek krwi. Może to być wyrazem inicjacji kompensacyjnej angiogenezy w ośrodkowym układzie nerwowym. Celem jednoznacznego stwierdzenia źródła inicjacji angiogenezy wskazane mogłoby być oznaczenie stężenia m.in. angiostatyny pochodzącej z płytek krwi.
4. Odnotowany, statystycznie znamienne, lecz mieszczący się w zakresie norm laboratoryjnych wzrost aktywności enzymów wątrobowych wynikać może zarówno z hepatotoksycznego działania leków

(zwłaszcza statyny, włączanej już w ostrej fazie udaru u osób jej niestosujących), ale także może być obrazem subklinicznej ogólnoustrojowej dysfunkcji narządowej w odpowiedzi na silny stresor, jakim jest ostre niedokrwienie OUN.

5. Obserwowany spadek poziomu hematokrytu i liczby erytrocytów w stosunku do wartości wyjściowych u pacjentów z udarem może wynikać z płynoterapii zastosowanej w czasie hospitalizacji.

6. W oparciu o uzyskane rezultaty analiz porównawczych proteomu, poddano skutecznej falsyfikacji o hipotezy o braku różnic w proteomie osób w udarem w porównaniu do grupy kontrolnej, ale także wśród chorych z udarem w szeregach czasowych. Wykazano różnice w zakresie białek związanych z metabolizmem energii, strukturalnych i receptorowych błony płytek oraz związanych z ich aktywacją. Dalsze badania tych właśnie białek powinny spośród znalezionych kandydatów wyłonić biomarkery udaru przydatne w praktyce klinicznej, a także pomóc zdefiniować nowe punkty uchwytu dla działania leków zarówno neuroprotektoryjnych, jak i przeciwplatekcyjnych dedykowanych pacjentom z udarem niedokrwiennym mózgu.

7. Analiza podstawowych parametrów biochemicznych porównująca chorych z udarem wskazuje na niskie wartości frakcji HDL cholesterolu jako najsilniejszy czynnik ryzyka udaru spośród branych pod uwagę w konwencjonalnej stratyfikacji ryzyka sercowo-naczyniowego. Istotnie wyższe, mieszczące się w górnej granicy normy wartości TSH mogą potwierdzać będące przedmiotem prowadzonych ostatnio badań i licznych kontrowersji znaczenie subklinicznej niedoczynności tarczycy jako czynnika sprzyjającego występowaniu ostrych incydentów niedokrwiennych w ośrodkowym układzie nerwowym.

Przy realizacji tego projektu zaangażowana jest doktorantka lek. A. Turek, nad którą sprawuję opiekę naukową.

#### **5. Badania nad wykorzystaniem niskoenergetycznego promieniowania laserowego w terapii śródbłonna i płytek krwi**

Prace nad tym zagadnieniem rozpocząłem w okresie studiów, w ramach Indywidualnego Toku Studiów w Pracowni Hemodynamiki Kliniki Kardiologii AM we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. A. Derkacza biorąc udział w kierowanym przez niego projekcie badawczym dotyczącym wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego stosowanego śródnaczyniowo na ryzyko nawrotu zwężenia u pacjentów poddawanych zabiegom angioplastyki wieńcowej. Nabywałem tam umiejętności planowania i przeprowadzania eksperymentu naukowego, tworzenia baz danych, przeprowadzania samodzielnie analiz statystycznych i pisanie manuskryptów. Wieloletnia współpraca zaowocowała powstaniem kilku prac oryginalnych oraz stała się przedmiotem nowego projektu realizowanego przez nas wspólnie w ramach grantu subsydiowanego ze środków EU: "Wrovasc - Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej", gdzie postanowiliśmy połączyć moje doświadczenia z zakresu badań

nad śródbłonkiem naczyniowym i płytkami krwi z doświadczeniami dr hab. A. Derkacza dotyczącymi terapii niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym.

Realizując ten projekt poddawaliśmy próbie falsyfikacji następujące hipotezy:

1. Brak wpływu naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym na funkcje agregometryczne płytek krwi - odrzucenie hipotezy oznacza wykazanie pro- lub przeciw-agregacyjnego efektu ekspozycji płytek *ex vivo* promieniowania laserowego. W toku realizacji projektu hipoteza ta została sfalsyfikowana.
2. Brak wpływu naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym na poziom wybranych markerów aktywacji uwalnianych z płytek krwi - odrzucenie hipotezy tej oznacza modulację przez promieniowanie laserowe procesów aktywacji płytek krwi, a także sugeruje, iż modyfikacja aktywności płytek może być związana z bezpośrednią zmianą procesów fizykochemicznych zachodzących w płytkach. Utrzymanie tej hipotezy wraz z jednoczesnym odrzuceniem hipotezy pierwszej sugerowałoby, że zmiana odpowiedzi agregacyjnej płytek pod wpływem niskoenergetycznego promieniowania laserowego zależy od modyfikacji osoczowych czynników pro- lub anty- agregacyjnych. Hipoteza ta została częściowo sfalsyfikowana w toku prac nad realizacją projektu
3. Brak wpływu niskoenergetycznego promieniowania laserowego na osoczowy szlak metabolizmu tlenu azotu (NO). Odrzucenie tej hipotezy wykazałoby modulującą rolę niskoenergetycznego promieniowania laserowego na metabolizm NO (aktywność osi PRMT-L-Arg/ADMA-DDAH) i dowodziłoby istnienia interakcji na poziomie biodostępności tlenu azotu w osoczu, zaś wykazanie zmian w zakresie markerów stresu oksydacyjnego, a zwłaszcza nitrozacyjnego, pozwoliłoby wykazać, czy są one wtórne do zmiany syntezy czy też nasilenia degradacji NO. Odrzucenie tej hipotezy oraz hipotezy pierwszej sugerować będzie, iż szlak metabolizmu NO jest potencjalnie odpowiedzialny za modyfikację aktywności pro lub anty zakrzepową płytek krwi w odpowiedzi na niskoenergetyczne promieniowanie laserowe. W wyniku realizacji projektu nie udało się sfalsyfikować tej hipotezy.
4. Brak wpływu naświetlania niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym (LLLT – low level laser therapy) na funkcję wazodylatacyjną śródbłonka, zmierzona metodą FMD wg Celermajera. Odrzucenie tej hipotezy wskazywałoby na istotną interferencję promieniowania laserowego z mechanizmami biotransformacji tlenu azotu w ścianie naczynia i w efekcie skłaniałoby do poszukiwania bardziej precyzyjnych mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko.
5. Brak wpływu LLLT na funkcję pro/przeciwzapalną i pro/przeciwzakrzepową śródbłonka. Odrzucenie tej hipotezy wskazywać będzie na modulującą (pozytywnie bądź negatywnie) rolę ekspozycji ściany naczynia na promieniowanie laserowe na fenotyp funkcji śródbłonka i tym samym zdefiniować nową metodę terapii śródbłonka lub – poprzez wykazanie negatywnej roli – dać przesłanki do zaniechania dalszych badań w tym kierunku ze względu na ich potencjalną szkodliwość.

Badania weryfikujące hipotezy 1-3 są treścią obronionej rozprawy doktorskiej P. Roli, gdzie pełniłem rolę promotora pomocniczego.

Badania weryfikujące hipotezy 4 i 5 stanowią treść obronionej rozprawy doktorskiej A. Szymczyszyn (gdzie dostarczyłem ekspertyzę z zakresu patofizjologii molekularnej śródbłonka i płytek krwi) i treść pracy oryginalnej złożonej do *Lasers in Medical Sciences* (A. Szymczyszyn, A. Doroszko, E.Szahidewicz-Krupska, P. Rola, R. Gutherc, J. Jasiczek, G. Mazur, A. Derkacz., Effect of transdermal low-level laser therapy on endothelial function).

## **6. Analiza wybranych czynników ryzyka i markerów uszkodzenia śródbłonka u dzieci z rozpoznaną ostrą białaczką**

*Projekt ten, którego byłem współautorem i wykonawcą subsydiowany był przez NCN, a realizowany we współpracy z Katedrą i Kliniką Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej we Wrocławiu*

Aktywacja śródbłonka naczyniowego w warunkach patologicznych wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu w chorobach o ciężkim przebiegu. Uszkodzenie śródbłonka jest wspólną cechą charakterystyczną wielu wczesnych powikłań szeroko rozumianej terapii hemato-onkologicznej. Jej etiopatogeneza jest słabo poznana, a stanowi one istotną przyczynę wysokiej chorobowości i śmiertelności pomimo ciągłej optymalizacji protokołów terapeutycznych. Przeprowadzenie bezpośredniej stratyfikacji ryzyka uszkodzenia śródbłonka związanego z omawianym leczeniem jest w chwili obecnej zadaniem trudnym, z uwagi na złożoność interakcji i wielość stosowanych schematów terapeutycznych, mogących w różny sposób i w różnym stopniu generować dysfunkcję i strukturalne uszkodzenie śródbłonka.

Celem pracy jest ocena hipotezy, że ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) może być związana z częstszym, wczesnym występowaniem dysfunkcji śródbłonka naczyniowego, a także że w tej grupie dzieci współistnienie uszkodzenia śródbłonka wiąże się z większym ryzykiem zgonu, niezależnie od prowadzonego leczenia wg protokołu ALLIC.

Do badania włączono 22 pacjentów z rozpoznaniem ostrej białaczki limfoblastycznej w wieku od 5 do 18 lat. Czas obserwacji trwał średnio dwa lata od postawienia rozpoznania choroby rozrostowej. U każdego z pacjentów badania przeprowadzono w ściśle określonych punktach realizacji obowiązującego protokołu leczniczego dla dzieci z rozpoznaniem ALL (ostrej białaczki limfoblastycznej) - ALLIC 2002.

Wyznaczone etapy dotyczą:

- indukcji leczenia: dzień 1 - moment postawienia rozpoznania (przed włączeniem profazy sterydowej);
- dzień 33 - kontrolna punkcja szpikowa (prognozowane uzyskanie remisji);
- konsolidacji leczenia- rozpoczęcie protokołu M

Grupę kontrolną n=26 stanowiły zdrowe z hematologicznego punktu widzenia osoby odpowiadających wiekiem i płcią grupie badanej. U każdego badanego oceniano podstawowe parametry



życiowe: waga, wzrost, wskaźnik masy ciała (BMI), ciśnienie tętnicze krwi oraz tętno. Następnie badanym pobierano krew, którą wykorzystano do następujących badań:

1) porównanie wyjściowych stężeń intermediatów i metabolitów szlaków tlenu azotu i cyklooksygenazy: 6-keto PGF1alfa, TXB2 – immunoenzymatycznymi testami fazy stałej (ELISA), ADMA, SDMA, L-Arginina – metodą wysoko wydajnej chromatografii cieczowej (HPLC), a także oznaczenie biochemicznych markerów uszkodzenia śródbłonna i aktywacji płytek (sICAM1, sVCAM1, P-sel, VEGF, E-sel, PAI-1).

2) wykonanie podstawowych badań biochemicznych, gospodarki lipidowej, markerów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego (kreatynina, glukoza, mocznik, kwas moczowy, hsCRP, MDA/HNN – jako marker lipoperoksydacji).

Badanie wazodylatacyjnej funkcji śródbłonna (ocena rozszerzalności naczyń metodą laser Doppler) ma charakter nieinwazyjny, wykonywano je zgodnie z zaleceniami producenta (PeriMed) trakcie tego samego pobytu dziecka w szpitalu. Pod względem charakterystyki demograficznej, wartości ciśnienia, BMI grupy te były do siebie zbliżone (nie wykazano statystycznie znamiennych różnic). Zgodnie z oczekiwaniami, znamienne różnice dotyczyły obrazu morfologii krwi obwodowej. Wartości LDH wyższe były w grupie dzieci z ALL tylko na początku leczenia, po czym osiągały wartości mieszczące się w zakresie norm fizjologicznych.

Aktywność markerów proagregacyjnej oraz prokoagulacyjnej aktywacji śródbłonna (E-selektyna) była podobna w grupie dzieci z ALL i grupie kontrolnej na początku badania, po czym odnotowano tendencje spadkową wskutek zastosowanej terapii w porównaniu do wartości wyjściowych u dzieci z procesem rozrostowym. P-selektyna i PAI-1 w surowicy wykazywały natomiast tendencję wzrostową w trakcie trwania terapii. Jednak cechy zapalnej aktywacji śródbłonna (sVCAM1 i sICAM1) stwierdzano wyraźnie u dzieci z ALL na początku badania, w porównaniu do grupy kontrolnej, z wyraźną tendencją spadkową w trakcie terapii do wartości porównywalnych z grupą kontrolną (sVCAM1). Poziom sICAM1 utrzymywał się na wyższym poziomie także w momencie rozpoczęcia protokołu M u dzieci z rozpoznaną ALL. Wartości VEGF natomiast były wyjściowo znamienne niższe w grupie dzieci z ALL w porównaniu do grupy kontrolnej i wykazywały tendencję wzrostową w trakcie trwania leczenia hemato-onkologicznego.

Oceniając biodostępność tlenu azotu – na podstawie analizy substratu dla syntazy tlenu azotu (L-argininy) i jej inhibitorów kompetycyjnych (ADMA i w znacznie mniejszym stopniu SDMA), wykazano znamienne wyższe wartości ADMA (oraz SDMA) w warunkach wyjściowych u dzieci z ALL zarówno w odniesieniu do grupy kontrolnej, jak i do badań wykonanych w 33 dniu terapii (2) i na początku protokołu M (3). Stężenia L-Argininy wyjściowo nie różniły się w grupie dzieci ALL w porównaniu z dziećmi zdrowymi, jednak w trakcie terapii wykazywało tendencję spadkową. Oceniając biodostępność NO – była ona znacząco niższa w warunkach wyjściowych u dzieci z ALL, po czym wzrastała w trakcie terapii, jednak nie osiągała wartości odnotowywanych w grupie dzieci zdrowych. Peroksydacja lipidów, jako jeden z możliwych czynników zmniejszających biodostępność NO wskutek jego nasilonej degradacji, wbrew

oczekiwaniom wyjściowo porównywalna była w grupie ALL do wartości obserwowanych u dzieci zdrowych, a także odnotowywano jej spadek wskutek stosowanej terapii.

Przeprowadzone badania przepływomierzem laserowym wykazały porównywalną wyjściowo wazodylatację indukowaną pilokarpiną (wyniki analizowano w warunkach wyjściowych, bezpośrednio po podaniu jontoforetycznym pilokarpiny, następnie 5 minut po podaniu leku oraz w momencie uzyskania maksymalnego przepływu). Znamienne lepsza odpowiedź na pilokarpinę odnotowana została w trakcie trzeciego badania (na etapie rozpoczęcia protokołu M) – osiągając wartości wyższe zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i w porównaniu do wyników uzyskiwanych wcześniej, tzn. bezpośrednio po zrekrutowaniu pacjenta i w 33 dniu terapii.

Dokonując podziału dzieci z ALL na podgrupy wg oszacowanego ryzyka, wg protokołu terapeutycznego – SR – ryzyko standardowe, IR – ryzyko pośrednie oraz HR – ryzyko wysokie, odnotowano znamienne wzrost biodostępności tlenu azotu, określonego za pomocą współczynnika L-Arg/ADMA u dzieci z wysokim ryzykiem przy trzecim pobraniu krwi oraz nasiloną peroksydację lipidów w warunkach wyjściowych ocenioną jako MDA w pierwszym pobraniu. Grupa standardowego ryzyka cechowała się wyższymi wyjściowymi wartościami E-selektyny, przy czym różnica ta zanikała w trakcie leczenia.

Dokonując podziału na dzieci, u których leczenie zakończyło się niepowodzeniem vs grupa z przeżyciem w obserwacji krótkoterminowej (12 miesięczny follow-up, zależnie od momentu zrekrutowania) odnotowano, że wyższa biodostępność NO w momencie rozpoczęcia protokołu M była cechą wspólną pacjentów, których terapia zakończyła się niepowodzeniem. Ponadto, wyższe wyjściowo wartości E-selektyny i znamienne wzrost wartości PAI-1 były typowe dla pacjentów z terapią zakończoną niepowodzeniem.

Aktywacja prozapalna i proagregacyjna śródbłonna jest częstym zjawiskiem u dzieci z ALL. Peroksydacja lipidów zwiększająca degradację NO nie jest czynnikiem determinującym jego biodostępność w grupie dzieci z ALL. Wyższe wyjściowo stężenia inhibitorów kom petycyjnych syntazy tlenu azoty przy porównywalnych do grupy kontrolnych wartościach stężeń substratu (L-Arginina) mogą być czynnikiem limitującym syntezę tlenu azotu u dzieci z ALL w momencie rozpoznania choroby, przy czym różnice te ulegają częściowemu zniwelowaniu wskutek stosowanej terapii. Ciekawą obserwacją wymagającą dalszych badań jest wyższa wartość współczynnika L-Arg/ADMA w grupie dzieci z niepowodzeniem leczenia. Pomimo mniejszej wyjściowo biodostępności NO, wazodylatacyjna funkcja śródbłonna w warunkach wyjściowych i w 33 dniu terapii, oceniana za pomocą dopplerowskiego przepływomierza laserowego, jest porównywalna do wartości obserwowanych dzieci zdrowych. Godnym uwagi jest znamienne wzrost wazodylatacyjnej odpowiedzi na pilokarpinę oraz wyjściowo wyższe wartości przepływu oceniane w momencie rozpoczęcia protokołu M. Brak ścisłego związku powyższej obserwacji z parametrami wyznaczającymi biodostępność NO może wskazywać na dominującą rolę

innych wazodylatorów śródbłonkowych w regulacji napięcia ściany naczynia na tym etapie leczenia. Obecnie brak jest danych w piśmiennictwie pozwalających odnieść tą obserwację do znanych mechanizmów patogenetycznych dysfunkcji śródbłonka w przebiegu chorób rozrostowych. Jest to o tyle istotne, że zwiększona zdolność wazodylatoryjna, w połączeniu z dodatkowo zwiększoną wartością L-Arg/ADMA, charakteryzuje subpopulację wyższego ryzyka zgonu. Wysoki wyjściowo poziom VEGF, wzrost biodostępności NO jest związany z wyższą śmiertelnością w ALL. Wyjściowo wysoki poziom E-selektyny w surowicy, jak również brak tendencji wzrostowej VEGF i znamieny wzrost PAI-1 wiązały się także z większym ryzykiem zgonu u dzieci z ALL.

Realizacja tego projektu zaowocowała powstaniem pierwszej pracy oryginalnej zaakceptowanej w 2016r. do druku w *Post. Hig. Med. Dosw.*:

1. **A. Doroszko, E. Niedzielska, M. Jakubowski, J. Porwolik, A. Turek, E. Szahidewicz-Krupska, G. Mazur, A. Chybicka, A. Szuba:** *Endothelial dysfunction in ALL children is present prior to treatment and results from ADMA overproduction and endothelial inflammatory activation.*

a także wynikami prezentowanymi na konferencji międzynarodowej – ASH w San Francisco:

1. **Doroszko A, Niedzielska E, Wójcik D, Szuba A, Andrzejak R** *Leukemia, solid tumors and methylarginines: is there any relation? Blood 2008 Vol.112 no.11; poz.5471. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, California, December 6-9, 2008.*

2. **Doroszko A, Niedzielska E, Wójcik D, Wójcik E, Szuba A, Andrzejak R.** *Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetrical dimethyl-l-arginine (adma) and neoplasms in children. Blood 2008 Vol.112 no.11; poz.5469. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology. San Francisco, California, December 6-9, 2008.*

Pozostałe prace oryginalne uwzględniające 5-letnią prospektywną obserwację są obecnie w przygotowaniu.

#### **Podsumowując, łączna punktacja mojego dorobku poza-habilitacyjnego wynosi:**

390 pkt MNiSW

IF= 23,610

### **5. KSZTAŁCENIE MŁODEJ KADRY:**

#### **1. Działalność dydaktyczna:**

Od 2006 r. roku prowadzę zajęcia ze studentami V roku Wydziału Lekarskiego (studenci polskojęzyczni oraz English Division) z zakresu chorób wewnętrznych – ćwiczenia kliniczne i seminaria. Ponadto prowadziłem w tym okresie zajęcia (ćwiczenia i wykłady) z Propedeutyki Chorób Wewnętrznych dla studentów II roku Pielęgniarstwa na Wydziale Zdrowia Publicznego AM we Wrocławiu oraz zajęcia z chorób wewnętrznych dla studentów III roku Ratownictwa Medycznego.

W roku 2007 zorganizowałem (wraz z moim promotorem, dr hab. A. Szubą) Studenckie Koło Naukowe w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego AM, którym współkierowałem, a następnie od roku 2012 jestem samodzielnie jego opiekunem naukowym.

W latach 2008-2010 – jako post-doc szkoliłem i nadzorowałem pracę naukową wybranych studentów farmakologii University of Saskatchewan.

W roku 2012 objąłem obowiązki adiunkta dydaktycznego w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego AM, po czym przeprowadziłem aktualizację sylabusu nauczania przedmiotu choroby wewnętrzne dla studentów V roku Wydziału Lekarskiego w jednostce macierzystej, kładąc większy nacisk na nauczanie stanów nagłych w internie w świetle obowiązujących algorytmów postępowania. Ponadto jestem autorem dwóch przedmiotów fakultatywnych cieszących się dużym zainteresowaniem studentów Wydziału Lekarskiego:

1. Ostry dyżur internistyczny - diagnostyka różnicowa i przypadki kliniczne w świetle algorytmów w stanach nagłych w internie/Emergency service in Internal Medicine – differential diagnosis and clinical cases with respect to the guidelines
2. Problemy internistyczne w pytaniach i odpowiedziach do egzaminu końcowego/The problems in Internal Medicine. Questions and answers for final exam

## **2. Opieka naukowa nad doktorantami:**

1. Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim dr n. med. K. Podgórskiej: " Wpływ regularnej aktywności fizycznej na funkcję śródbłonna i wybrane parametry aktywności płytek krwi" (postępowanie ukończone w 11.2014 r., promotor: dr hab. A. Derkacz)
2. Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim lek. A. Janus: " Wpływ insulinooporności i hiperinsulinemii na funkcje śródbłonna naczyniowego i płytek krwi u młodych mężczyzn" (promotor: prof. dr hab. G. Mazur, przewod ukończony z wyróżnieniem w 11.2015 r.)
3. Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim lek. P. Roli " Wpływ niskoenergetycznego promieniowania laserowego stosowanego ex vivo na wybrane parametry funkcji płytek krwi " (promotor: dr hab. A. Derkacz, postępowanie ukończone w 06.2015 r.)
4. Opieka naukowa nad projektem doktorskim lek. M. Jakubowskiego - w ramach kierowanego przeze mnie projektu "Farmakoproteomiczna analiza patogenezy aspirynooporności"
5. Opieka naukowa nad projektem doktorskim lek. A. Turek w ramach kierowanego przeze mnie projektu "Wykorzystanie proteomiki do poszukiwania biomarkerów udaru niedokrwiennego mózgu i punktów uchwytu dla działania nowych leków o działaniu neuroprotektynym ".
6. Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim lek. D. Łuciuka: „Wpływ przewlekłej stymulacji oraz miejsca implantacji elektrody prawokomorowej na funkcję prawej komory i zastawki trójdzielnej.” (promotor: prof. dr hab. J. Gajek, postępowanie w toku)

**3. Opieka naukowa nad lekarzami w trakcie specjalizacji z chorób wewnętrznych:**

1. Opiekun specjalizacji z chorób wewnętrznych - dr n. med. A. Chachaj (ukończone w 03.2015r.)
2. Opiekun specjalizacji z chorób wewnętrznych - lek. M. Jakubowski (szkolenie w toku)

**4. Opieka naukowa nad magistrantami (promotor pomocniczy):**

1. Badanie elastyczności tętnic i wybranych aspektów funkcji śródbłonna u piłkarzy ręcznych. Autor: mgr S. Suwiczak - Wydział Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, promotor – prof. dr hab. A. Szuba, 2010r.
2. Elastyczność tętnic i wybrane parametry funkcji śródbłonna u graczy w Futbolu Amerykańskim. Autor: mgr M. Job - Wydział Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu, promotor – prof. dr hab. A. Szuba, 2010r

**5. Opieka nad Indywidualnym Tokiem Studiów:**

1. Dwoje studentów VI roku Wydziału Lekarskiego UM we Wrocławiu: K. Rdzanek i J. Gawryś (obecnie)
2. Studentka V roku Wydziału Lekarskiego - M. Mach (rok akademicki 2014/2015)

**6. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA:**

1. Zorganizowanie Pracowni Farmakoproteomiki w Katedrze Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, w której obecnie samodzielnie realizuję badania w ramach prowadzonych przeze mnie projektów
2. Zorganizowanie i nadzór naukowy nad Studenckim Kołem Naukowym w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Nadciśnienia Tętniczego AM we Wrocławiu
3. Zorganizowanie i realizacja dwóch nowych przedmiotów fakultatywnych dla studentów Wydziału Lekarskiego polsko- i angielskojęzycznych: Ostry dyżur internistyczny - diagnostyka różnicowa i przypadki kliniczne w świetle algorytmów w stanach nagłych w internie/Emergency service in Internal Medicine – differential diagnosis and clinical cases with respect to the guidelines oraz Problemy internistyczne w pytaniach i odpowiedziach do egzaminu końcowego/The problems in Internal Medicine. Questions and answers for final exam
4. Funkcja adiunkta dydaktycznego w jednostce macierzystej
5. Organizacja i koordynowanie kursu dla lekarzy "Wprowadzenie do specjalizacji z chorób wewnętrznych" 2013, 2014 i 2015r.
6. Organizacja Studenckiego Obozu Naukowego Boguszyce 2007, 2010, 2013

7. Współudział w organizacji I Międzynarodowego Kongresu – Nadciśnienie Tętnicze jako problem Interdyscyplinarny – Wrocław 2007
8. Współudział w organizacji "The 16th Annual Life and Health Sciences Research Conference". University of Saskatchewan (Canada) 2009,
9. Współudział w organizacji *Canadian Society of Pharmacology and Therapeutics 2009 Conference* "Innovations in pharmacology". Saskatoon, Saskatchewan (Canada), May 30 - June 2, 2009.
10. Delegat lekarzy SPSK-1 we Wrocławiu do Okręgowego Związku Zawodowego Lekarzy (funkcja sekretarza 2007-2009)

Adrian Doroszko