

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko: MAŁGORZATA KRZYSTEK-KORPACKA

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

1991 r. - świadectwo dojrzałości z wyróżnieniem, XII Liceum Ogólnokształcące im. Orłąt Lwowskich we Wrocławiu

1994 r. - stopień licencjata biotechnologii uzyskany na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego

1996 r. - stopień magistra biotechnologii uzyskany na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego na podstawie pracy „Lektyny dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*) i ich antygenowe podobieństwo do endogennej lektyny CLB_a oraz lektyn ConA i WGA” wykonanej pod kierunkiem dr Ireny Lorenc-Kubis

2006 r. - stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej uzyskany na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu na podstawie pracy „Midkina w nowotworach przełyku oraz połączenia przełykowo-żołądkowego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Teresy Banaś

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/~~artystycznych~~.

Po ukończeniu studiów na Uniwersytecie Wrocławskim na kierunku biotechnologia w roku 1997 podjęłam pracę w laboratorium naukowym i diagnostycznym Katedry i Kliniki Chorób Zakaźnych Dzieci Akademii Medycznej na stanowisku st.ref. inżynierjno-technicznego, gdzie zajmowałam się immunologią chorób zakaźnych. W roku 1998 zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu na stanowisku asystenta, a od roku 2006 pracuję na stanowisku adiunkta. W latach 2012-2014 byłam również zatrudniona na stanowiskach głównego badacza i badacza w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu przy realizacji dwóch zadań w projekcie współfinansowanym przez Unię Europejską „WROVASC – Zintegrowane Centrum Medycyny Naczyniowej”.

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/~~artystycznego~~

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl ośmiu publikacji pod wspólnym tytułem: **Znaczenie kliniczne i diagnostyczne midkiny w zapalnych i nowotworowych chorobach przewodu pokarmowego oraz sepsie**. Cykl obejmuje wyłącznie prace, w których jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Sumaryczny IF prac stanowiących cykl wynosi **23.437** (228 punktów MNiSW).

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

4.1. Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D., Grabowski K., Błachut K., Kustrzeba-Wójcicka I., Banaś T., *Impact of weight loss on circulating IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha, VEGF-A, VEGF-C and midkine in gastroesophageal cancer patients*, Clin Biochem 2007;40:1353-60 (MNiSW=20; **IF=2.072**, liczba cytowań: 34)

4.2. Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D., Grabowski K., Błachut K., Kustrzeba-Wójcicka I., Terlecki G., Gamian A., *Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers*, Clin Chem Lab Med 2008;46:359-64 (MNiSW=27; **IF=1.888**, liczba cytowań: 38)

4.3. Krzystek-Korpacka M., Neubauer K., Matusiewicz M., *Clinical relevance of circulating midkine in ulcerative colitis.*, Clin Chem Lab Med 2009;47:1085-90 (MNiSW=27; **IF=1.886**, liczba cytowań: 7)

4.4. Krzystek-Korpacka M., Neubauer K., Matusiewicz M., *Circulating midkine in Crohn's disease: clinical implications*, Inflamm Bowel Dis 2010 16:208-15 (MNiSW=32; **IF=4.613**, liczba cytowań: 12)

4.5. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Grabowski K., Gamian A., *Tumor location determines midkine level and its association with the disease progression in colorectal cancer patients: a pilot study*, Int J Colorectal Dis 2012;27:1319-24 (MNiSW=30; **IF=2.238**, liczba cytowań: 4)

4.6. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Kapturkiewicz B., Bębenek M., Gamian A., *Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance*, Cancer Lett 2013;337:107-14. (MNiSW=35; **IF=5.016**, liczba cytowań: 9)

4.7. Krzystek-Korpacka M., Diakowska D., Neubauer K., Gamian A., *Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases*, Cytokine 2013;64:158-64 (MNiSW=25; **IF=2.874**, liczba cytowań: 2)

4.8. Krzystek-Korpacka M., Mierzchała M., Neubauer K., Durek G., Gamian A., *Midkine, a multifunctional cytokine, in patients with severe sepsis and septic shock: a pilot study*, Shock 2011;35:471-7 (MNIŚW=32; **IF=2.848**, liczba cytowań: 7)

We wszystkich wymienionych pracach mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaprojektowaniu doświadczeń, wykonaniu części eksperymentalnej badań, akwizycji, opracowaniu i analizie danych eksperymentalnych, analizie statystycznej, ocenie i interpretacji wyników części eksperymentalnej w kontekście danych klinicznych, przygotowaniu manuskryptu, jego edycji i polemice z recenzentami. Swój udział w każdej z wymienionych prac szacuję na 80%. Oświadczenia współautorów prac w załączeniu.

Prace 4.5 i 4.8 oraz prace 4.6 i 4.7, w części dotyczącej raka jelita grubego, finansowane były przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ z projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne – BioMed” (POIG 01.01.02-02-003/08-00), finansowanego z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka 1.1.2). Prace 4.6 i 4.7, w części dotyczącej nieswoistych zapaleń jelit, finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki (grant DEC-2011/01/D/NZ5/02835).

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. ~~pracy~~ prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Cel

Celem badań zawartych w przedstawionym cyklu prac była ocena midkiny na poziomie ogólnoustrojowym w chorobach przewodu pokarmowego i towarzyszącego im zespołu wyniszczenia oraz w sepsie, stanowiącej powikłanie infekcyjne chorób jelit oraz zbiegów operacyjnych w zakresie jamy brzusznej. W pracach oceniano związek obserwowanego wzrostu stężenia midkiny na poziomie ogólnoustrojowym z zaawansowaniem lub aktywnością kliniczną badanych chorób oraz z nasileniem odpowiedzi zapalnej i angiogennej oraz określano potencjał midkiny jako biomarkera w odniesieniu do innych cytokin prozapalnych i angiogennych oraz markerów biochemicznych wykorzystywanych obecnie w praktyce klinicznej. Badaniem objęto pacjentów z rakiem górnego odcinka przewodu pokarmowego (GEC; gastro-esophagal cancer), pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC; colorectal cancer), pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit (IBD; inflammatory bowel disease) oraz pacjentów z ciężką sepsą lub wstrząsem septycznym.

Wstęp

Midkina to stosunkowo niedawno odkryta wielofunkcyjna cytokina podlegająca ekspresji głównie w życiu płodowym, kiedy uczestniczy w organogenezie, a której ekspresja jest indukowana przejściowo podczas procesów naprawy i regeneracji tkanek i narządów lub konstytutywnie w stanach patologicznych. Biologiczne funkcje midkiny są wielorakie i wciąż odkrywane. Midkina jest czynnikiem wzrostu stymulującym proliferację i promującym przeżycie komórek przez zapobieganie apoptozie oraz indukującym różnicowanie. Ponadto midkina promuje migrację komórek mięśniówki gładkiej ścian naczyń krwionośnych oraz migrację komórek prozapalnych, takich jak makrofagi i neutrofile, działając jako chemoatraktant lub czynnik haptotaktyczny. Dowiedziono również, że midkina pośredniczy w adhezji komórek układu nerwowego, indukuje zmiany morfologiczne w komórkach, m.in. stymuluje formowanie pseudopodiów w fibroblastach oraz ma własności immunomodulujące wobec regulatorowych limfocytów T. W wielu aktywnościach biologicznych midkiny pośredniczą inne chemokiny i czynniki wzrostu. Wykazano między innymi, że midkina stymuluje syntezę interleukiny (IL)-8, transformującego czynnika wzrostu (TGF)- β , białka zapalnego makrofagów (MIP)-2 i białka chemotaktycznego dla makrofagów (MCP)-1, a może hamująco wpływać na ekspresję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF)-A. Midkina jest również zaangażowana w fibrylizę, gdyż stymuluje ekspresję aktywatora plazminogenu uPA, hamując jednocześnie ekspresję PAI-1, inhibitora aktywatora plazminogenu. Szczególnie interesująca jest rola midkiny w angiogenezie, zarówno fizjologicznej, jak i patologicznej. W procesach tych midkina może uczestniczyć w sposób parakryny lub autokryny przez stymulację proliferacji komórek śródbłonka naczyń krwionośnych, a także poprzez stymulację migracji i różnicowania komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Midkina indukuje również formowanie się warstw komórek śródbłonka i syntezę glikozoaminoglikanów. Także rekrutacja neutrofilów i makrofagów, wydzielających proangiogenne czynniki VEGF-A i IL-8, pośrednio przyczynia się do stymulacji tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Ponadto midkina w komórkach endotelium moduluje ekspresję uPA i PAI-1, co pozwala na przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej. Degradacja i przebudowa macierzy ułatwia z kolei migrację komórek w trakcie angiogenezy i inwazji, m.in. w nowotworowej chorobie przerzutowej. Ostatnie badania wskazują, że midkina ma własności antybakteryjne, szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich. Również niedawno wykazano udział midkiny w aktywacji układu dopełniacza¹.

¹Krzystek-Korpacka et al. *Structure and function of midkine, a novel heparin-binding growth factor*. *Postepy Hig Med Dosw* 2006;60:591-601

Kliniczne znaczenie midkiny w chorobach nowotworowych, zapalnych i infekcyjnych podsumowałam w pracy przeglądowej (V.A.1)[†], która znalazła się w monografii poświęconej temu czynnikowi, do której napisania zostałam zaproszona przez odkrywcę midkiny prof. Takashi Muramatsu². Analiza dotychczasowych badań, również własnych, wskazuje, że nowotworzeniu, niezależnie od typu nowotworu, towarzyszy wzmożona sekrecja midkiny. Ponieważ stężenie midkiny w surowicy osób uważanych za zdrowe jest niskie lub niewykrywalne (średnia w badaniach własnych wynosi <100 ng/L), proponuje się wykorzystanie midkiny jako ogólnego markera nowotworowego. Dobrze udokumentowana jest także wartość midkiny jako markera prognostycznego. W niektórych typach nowotworów, np. w raku płaskonabłonkowym przełyku, wzrost stężenia midkiny w surowicy może być indykatorem procesu przerzutowania².

W literaturze niewiele jest natomiast danych dotyczących związku midkiny z chorobami zapalnymi czy infekcyjnymi. Potencjalny związek midkiny z zaburzeniami towarzyszącymi chorobie nowotworowej czy chronicznym chorobom zapalnym – kacheksją i anemią – nie był wcześniej przedmiotem badań. Z wyjątkiem prac własnych, przedstawionych w niniejszym osiągnięciu, brak jest danych literaturowych dotyczących stężenia midkiny u pacjentów z chorobami jelit, mimo że wiele z aktywności biologicznych midkiny może potencjalnie przyczyniać się do indukcji i rozwoju nieswoistych zapaleń jelit lub wspierać regenerację tkanek w okresie remisji czy uczestniczyć w procesie nowotworzenia. Potencjalnie midkina może więc stanowić atrakcyjny cel ukierunkowanych terapii biologicznych albo służyć jako biomarker w tej grupie chorób, wspierając diagnostykę, monitorowanie i podejmowanie decyzji klinicznych.

Omówienie poszczególnych prac

Kacheksja nowotworowa wpływa niekorzystnie na stan fizyczny i psychiczny pacjenta, pogarszając jakość i komfort jego życia. Jest też złym czynnikiem rokowniczym, bowiem ogranicza skuteczność terapii przeciwnowotworowych i skraca czas przeżycia, czyniąc wyniszczonych pacjentów mniej odpornymi na infekcje i zwiększając ryzyko wystąpienia powikłań. Szacuje się, że kacheksja nowotworowa występuje nawet u 80% pacjentów z rakiem górnego odcinka przewodu pokarmowego w momencie jego rozpoznania i odpowiada za około połowę zgonów³. Mimo to dane literaturowe dotyczące kacheksji w tej

[†]oznaczenie odnosi się do pozycji zajmowanej w „Wykazie opublikowanych prac naukowych z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia” przygotowanym przez Bibliotekę UMED (załącznik 3)

²Krzystek-Korpacka et al. in *Midkine: from embryogenesis to pathogenesis and therapy*; eds Mine Erguven, Takashi Muramatsu, Ayhan Bilir; Dordrecht, Springer, 2012

³Inui A. *Cancer cachexia–anorexia syndrome: current issues in research and management*. CA Cancer J Clin 2002;52:72–91

grupie nowotworów są wyjątkowo skąpe. Patomechanizm wyniszczenia nowotworowego jest wieloczynnikowy i stosunkowo słabo poznany, co znajduje swoje odzwierciedlenie w braku skutecznych sposobów walki z kacheksją⁴. Stąd podkreśla się konieczność odkrycia i scharakteryzowania wszystkich jej mediatorów, co mogłoby wesprzeć próby opracowania nowych strategii terapeutycznych. O ważności tematu świadczy choćby wysoki indeks cytowań obu moich prac ujętych w osiągnięciu, a poświęconych zagadnieniu wyniszczenia.

Sugeruje się, że kacheksja powinna być raczej postrzegana jako chroniczny stan zapalny, a nie zaburzenie odżywiania, szczególnie że charakterystyczne dla niej zmiany na poziomie molekularnym pojawiać się mogą we wczesnych stadiach zaawansowania choroby, również przy braku spadku masy ciała. Konsekwentnie, ogólnoustrojowy stan zapalny wymieniany jest jako jeden z trzech czynników definiujących pacjentów wyniszczonych, oprócz znaczącej a niezamierzonej utraty masy ciała i zmniejszonego spożycia pokarmów. Cytokiny prozapalne, takie jak TNF α , IL-1 β i IL-6, uznane są za klasyczne cytokiny prokachektyczne, mimo że dane o udziale TNF α i IL-1 β pochodzą głównie z modeli zwierzęcych. Niewiele jest natomiast doniesień dotyczących potencjalnego udziału innych cytokin o charakterze prozapalnym, choć ekspresja wielu z nich, również midkiny, jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne zaangażowane w promocję kacheksji - NF- κ B i/lub AP-1.

W pracy pt.: ***Impact of weight loss on circulating IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , VEGF-A, VEGF-C and midkine in gastroesophageal cancer patients***" (poz. 4.1.) wykazałam po raz pierwszy, że pacjenci z rakiem górnego odcinka przewodu pokarmowego i współistniejącą kacheksją mają wyższe niż pacjenci niewyniszczeni stężenia IL-6 i IL-8, a stężenia midkiny i VEGF-A, po normalizacji jego stężenia do ilości płytek krwi, wykazują podobną tendencję. Zaobserwowałam ponadto, że wyniszczenie częściej towarzyszyło chorym płci żeńskiej, pacjentom >60 roku życia, niedożywionym i z rozległymi guzami pierwotnymi. Najlepszymi markerami kacheksji były niedożywienie, które cechowała wysoka swoistość, lecz mała czułość oraz wzrost stężenia interleukin 6 i 8, z których pierwszą charakteryzowała lepsza czułość, a drugą swoistość. Midkinę jako wskaźnik wyniszczenia, podobnie jak IL-8, cechowała lepsza swoistość niż czułość. Jednak analiza wieloczynnikowa wykazała, że to niedożywienie, wzrost stężenia midkiny i znormalizowanego VEGF-A są niezależnymi predyktorami kacheksji, umożliwiając prawidłowe zaklasyfikowanie ponad 76% pacjentów. Uzyskane przeze mnie wyniki po raz pierwszy wskazały na związek między wyniszczeniem nowotworowym w raku górnego odcinka przewodu pokarmowego a zwiększonym wydzielaniem IL-8,

⁴Deans et al. *Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:265–9

midkiny i VEGF-A. W świetle prowadzonych przeze mnie aktualnie badań *in vitro*, których wstępne wyniki wskazują na zdolność midkiny do indukcji ekspresji i sekrecji zarówno IL-8 (2.5-krotnie), jak i IL-6 (ponad 3-krotnie) oraz do modulowania wydzielania VEGF-A przez komórki gruczolakoraka jelita grubego, midkina może przyczyniać się do rozwoju kacheksji w sposób pośredni, poprzez regulację ekspresji tych cytokin. Rzeczywiście, w raku górnego odcinka przewodu pokarmowego, wyłącznie u pacjentów wyniszczonych, stężenie midkiny pozytywnie korelowało z IL-8 i IL-6. Tym samym uzyskane przeze mnie wyniki mogą wskazywać na midkinę jako potencjalny cel terapii biologicznych, skierowanych przeciwko wyniszczeniu nowotworowemu. Cel tym atrakcyjniejszy, że modulowanie jej ekspresji mogłoby umożliwić regulację wydzielania wielu mediatorów kacheksji jednocześnie. Kacheksja u pacjentów z rakiem górnego odcinka przewodu pokarmowego jest nie tylko istotnym czynnikiem rokowniczym, ale i predykcyjnym, wskazującym na wczesny nawrot choroby nowotworowej po leczniczej resekcji guza⁵. Uzyskane przeze mnie wyniki zdają się wyjaśniać, przynajmniej w części, podłoże molekularne tej zależności. Biorąc pod uwagę proangiogeny charakter VEGF-A, IL-8 i midkiny oraz ich udokumentowane zaangażowanie w chorobę przerzutową, nasilenie stężenia tych cytokin towarzyszące kacheksji może przyczyniać się do wzrostu ognisk mikrometastatycznych oraz umożliwiać rozsiew krążących komórek nowotworowych i tym samym odpowiadać za korelację między współwystępowaniem kacheksji a skłonnością do nawrotów choroby.

Impulsem do podjęcia badań dotyczących związku między białkami ostrej fazy, kacheksią nowotworową i mediatorami angiogenezy, w tym także midkiną, których wyniki opublikowałam w pracy ***Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers*** (poz. 4.2), był brak danych w literaturze, dotyczących białek ostrej fazy w kacheksji towarzyszącej nowotworom górnego odcinka przewodu pokarmowego, mimo że albumina była najczęściej wykorzystywanym markerem stanu odżywienia, na bazie którego wraz z CRP stworzono skalę prognostyczną Glasgow (GPS, Glasgow Prediction Score)⁶. Hipoalbuminemia, wzrost stężenia CRP oraz wysokie wartości GPS są złymi czynnikami rokowniczymi w raku górnego odcinka pokarmowego, jednak podłoże molekularne tych zależności nie było znane. Spekulowano jedynie na podstawie korelacji między VEGF-A i CRP u pacjentek z endometriozą, że za negatywne zjawiska obserwowane u pacjentów z wysokim poziomem CRP odpowiadać może związek CRP ze środowiskiem proangiogenym⁶. W swojej

⁵Mal et al. *Pre-operative predictive factors of early recurrence after resection of adenocarcinoma of the esophagus and cardia*. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:1275–8

⁶Crumley et al. *Evaluation of an inflammation-based prognostic score in patients with inoperable gastro-esophageal cancer*. *Br J Cancer* 2006;94:637–41.

pracy wykazałam, że nowotworom górnego odcinka przewodu pokarmowego towarzyszy spadek stężenia albumin, zaś wzrost stężenia CRP. Ani stężenie albumin, ani rozkład wartości GPS, nie różniły się znacząco między pacjentami z towarzyszącą kacheksją a bez niej. Jedynie CRP wykazywało tendencję wzrostową u pacjentów wyniszczonych. Natomiast stężenie transferyny, podobnie jak albumina ujemnego białka ostrej fazy i markera stanu odżywienia, było znamienne niższe wyłącznie u pacjentów kachektycznych. Analiza korelacji wykazała, że białka ostrej fazy oraz GPS silnie korelują z czynnikami angiogennymi i prokachektycznymi: midkiną, VEGF-A, IL8, IL6 i IL1 β , przy czym część zależności obserwowana była wyłącznie u pacjentów kachektycznych. Uzyskane przeze mnie wyniki łączą transferynę i CRP z kacheksją w nowotworach górnego odcinka przewodu pokarmowego oraz wskazują na związek pomiędzy białkami ostrej fazy a aktywnością angiogenną na poziomie ogólnoustrojowym, która to zależność może w części odpowiadać za wartość rokowniczą białek ostrej fazy oraz opartych na nich skal rokowniczych. Stanowią one również pierwsze doniesienie o korelacji między midkiną a białkami ostrej fazy, albuminą i CRP oraz skalą prognostyczną GPS.

Nieswoiste choroby zapalne jelit, obejmujące głównie chorobę Leśniowskiego-Crohn'a (Crohn's disease; CD) i wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ulcerative colitis; UC), to nieuleczalne choroby przewodu pokarmowego o niewyjaśnionej dotąd etiologii. Uważa się, że do powstania choroby przyczyniają się: predyspozycja genetyczna, nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu immunologicznego, dysfunkcja nabłonka jelita i nieprawidłowa flora bakteryjna, prowadzące do nadmiernej odpowiedzi zapalnej wobec patogenów bakteryjnych oraz komensalnych mikroorganizmów jelitowych. W świetle rosnącej zachorowalności na IBD oraz faktu, że jest to choroba chroniczna, z nawracającymi zaostrzeniami, o dużym nasileniu procesów zapalnych, której towarzyszą komplikacje ogólnoustrojowe, a leczenie skupiające się na utrzymaniu pacjentów w remisji jest niezbyt efektywne, IBD staje się poważnym problemem klinicznym. Lepsze zrozumienie procesów prowadzących do rozwoju i postępu choroby może przyczynić się do wskazania nowych celów terapeutycznych. Rozpoznanie IBD może sprawiać trudności ze względu na zbliżone objawy kliniczne z zaburzeniami funkcjonalnymi jelit bez podłoża zapalnego (np. z zespołem jelita drażliwego). Również objawy kliniczne wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohn'a, zwłaszcza we wczesnym etapie, są bardzo podobne i różnicowanie obu jednostek wymaga wykonania szeregu specjalistycznych badań (endoskopowych z oceną histopatologiczną bioptatów, radiologicznych, immunologicznych i/lub biochemicznych), niejednokrotnie nie dających rozstrzygającej odpowiedzi, co utrudnia dobór odpowiedniego leczenia

operacyjnego⁷. Tymczasem w praktyce klinicznej IBD brak jest nieinwazyjnych, tanich, wiarygodnych i obiektywnych metod wspierających diagnostykę, różnicowanie, ocenę aktywności, monitorowanie oraz prognozowanie. Wysokoczułe CRP pozostaje najlepszym dostępnym markerem biochemicznym (szczególnie w CD), jednak jego użyteczność kliniczna ogranicza się raczej do monitorowania przebiegu, a nie diagnostyki IBD. Ze względu na szczególną rolę neutrofilii w patogenezie IBD, nowe markery poszukiwane są głównie wśród białek związanych z neutrofilami, np. kalprotektyna i laktoferyna oznaczane w kale czy przeciwciała ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies)⁸.

Midkina jako czynnik chemotaktyczny wobec neutrofilii i monocytów, czynnik proangiogeny i immunosupresyjny, induktor ekspresji cytokin prozapalnych, metaloproteinaz oraz komponent macierzy zewnątrzkomórkowej może stanowić potencjalny cel przyszłych terapii biologicznych w IBD lub służyć jako biomarker. Z drugiej strony własności mitogenne, antyapoptotyczne, proangiogenne i antybakteryjne midkiny mogą wspierać procesy regeneracyjne w jelicie. Dotychczas wykazano, że midkina odgrywa istotną rolę w reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobie pod wieloma względami podobnej do IBD⁹. Dane literaturowe dotyczące midkiny w IBD są bardzo skąpe. Dotychczas wykazano zwiększoną ekspresję midkiny w śluzówce jelita u szczurów z eksperymentalnym UC¹⁰. Badania *in vitro* na szczurzych liniach komórkowych wykazały ekspresję midkiny w fibroblastach oraz jej aktywność chemotaktyczną wobec komórek nabłonka. Wyników tych nie udało się jednak potwierdzić w doświadczeniach na liniach ludzkich. W badaniach nad IBD u ludzi wykazano jedynie zwiększoną ekspresję midkiny w nowotworach i dysplazji związanej z UC¹¹.

Celem prac ***Clinical relevance of circulating midkine in ulcerative colitis*** (poz. 4.3) oraz ***Circulating midkine in Crohn's disease: clinical implications*** (poz. 4.4) była charakterystyka midkiny we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego i chorobie Leśniowskiego-Crohn'a oraz ocena jej potencjału jako biomarkera nieswoistych zapaleń jelit w porównaniu z CRP. W pracach tych po raz pierwszy wykazałam wzrost stężenia midkiny w surowicy pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego lub chorobą Leśniowskiego-Crohn'a, zarówno w nieaktywnej, jak i aktywnej fazie choroby. Stężenia CRP i IL-6

⁷Travis et al. *European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management*. Gut 2006;55(suppl 1):116–35

⁸Vermeire et al. *Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?* Gut 2006;55:426–431.

⁹Maruyama et al. *Midkine, a heparinbinding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 2004;50:1420–9

¹⁰Yuki et al. *Increased expression of midkine in the rat colon during healing of experimental colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;291:G735–43

¹¹Tokuyama et al. *Midkine expression in colorectal tumors: correlation with Ki-67 labeling in sporadic, but not ulcerative colitis-associated ones*. Pathol Int 2007;57:260–7

zmieniały się w sposób podobny do midkiny, natomiast nie zaobserwowałam zmian w stężeniu TNF- α , czy IL-1 β . Stężenie midkiny zależało od aktywności choroby i nasilenia procesów zapalnych - było znamienne wyższe u pacjentów w aktywnej fazie choroby i bezpośrednio korelowało z kliniczną (colitis activity index; CAI) i endoskopową aktywnością choroby we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego oraz z kliniczną aktywnością choroby Leśniowskiego-Crohn'a (Crohn's disease activity index; CDAI). Stężenie midkiny dodatkowo korelowało również z wykładnikami stanu zapalnego: CRP, OB, WBC, PLT i IL-6. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że stężenie midkiny koreluje wyłącznie z aktywnością kliniczną nieswoistych zapaleń jelit, natomiast obserwowane zależności ze stężeniem CRP czy IL-6 wynikają z korelacji tych czynników z CAI/CDAI. Wysokie stężenie midkiny w aktywnej fazie choroby sugeruje możliwość jej udziału w patogenezie lub rozwoju wrzodziejącego zapalenia jelita grubego i choroby Leśniowskiego-Crohn'a i potwierdza istnienie związku między wzrostem stężenia midkiny w surowicy a stanem zapalnym. Dotychczas wśród chorób zapalnych wzrost stężenia midkiny w surowicy wykazano jedynie u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, u których midkina stymulowała migrację leukocytów oraz indukowała różnicowanie makrofagów w osteoklasty⁹. Zaobserwowane przeze mnie podwyższenie stężenia midkiny w nieaktywnej fazie choroby koresponduje z udokumentowaną przez Tokuyama i wsp.¹¹ nadekspresją midkiny w nabłonku, podlegającym regeneracji i może sugerować jej udział w procesie odnowy nabłonka. Doświadczenia przeprowadzone na modelach zwierzęcych wrzodziejącego zapalenia jelita grubego potwierdzają udział midkiny w reepitelizacji i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej¹⁰. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że do indukcji ekspresji i sekrecji midkiny dochodzi niezależnie od typu stanu zapalnego, choć wzrost stężenia towarzyszący aktywnej chorobie Leśniowskiego-Crohn'a był nieco wyższy niż w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Powyższa obserwacja dyskwalifikuje midkinę jako potencjalny marker różnicujący obie jednostki chorobowe. Lokalizacja zmian zapalnych w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a (jelito cienkie lub jelito grube) również nie wpływa znamienne na stężenie midkiny. Zaobserwowałam także, że stężenia midkiny zależy od współistnienia anemii u pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego i chorobą Leśniowskiego-Crohn'a i ujemnie koreluje ze stężeniem hemoglobiny, żelaza i transferyny oraz z hematokrytem. Podobnie stężenie midkiny było znamienne wyższe u pacjentów, którzy doświadczyli znaczącego a niezamierzonego spadku masy ciała (>5% w ciągu 3 miesięcy) i korelowało ujemnie ze stężeniem albuminy oraz transferyny, wskaźników stanu odżywienia. Powyższe wyniki potwierdzają moją wcześniejszą obserwację dotyczącą związku midkiny z anemią¹² i kacheksją (poz. 4.1 i 4.2 osiągnięcia),

¹²Krzystek-Korpacka et al. *Even a mild anemia is related to tumor aggressiveness mediated by angiogenic factors*. Exp Oncol 2009;31:52-6

towarzystwą chorobie nowotworowej, rozszerzając ją o związek z anemią i kacheksją chorób przewlekłych. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że obserwowany w anemii i kacheksji wzrost stężenia midkiny może być skutkiem hipoksemii, gdyż podobnie jak w przypadku innych czynników angiogennych, ekspresja midkiny jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny HIF1 α . Wysokie stężenie midkiny, poprzez nasilenie stanu zapalnego i indukcję cytokin prozapalnych, może z kolei przyczyniać się do pogłębiania anemii/kacheksji. Obserwowana korelacja ze stężeniem żelaza była silniejsza w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a niż we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. W swoich pracach zaobserwowałam również współzależność między stężeniem midkiny a stężeniami innych czynników angiogennych: VEGF-A i PDGF-BB oraz FGF2 w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a. Angiogeneza znacząco przyczynia się do indukcji i rozwoju choroby, a nieswoistym zapaleniom jelit towarzyszy wzrost stężenia kluczowych czynników angiogennych w surowicy, m.in.: VEGF-A, FGF2 i PDGF-BB, korelujący bezpośrednio z ostrością choroby. Uzyskane wyniki po raz pierwszy wiążą midkinę z procesami angiogenezy w nieswoistych zapaleniach jelit. Znalazły one potwierdzenie na poziomie mRNA w tkankach jelit w aktualnie prowadzonych przeze mnie badaniach oraz w wynikach eksperymentów *in vitro*, wskazujących na midkinę jako modulator zarówno ekspresji, jak i wydzielania głównych czynników angiogennych w jelitach. W przedstawionej pracy wykazałam ponadto, że stężenie midkiny koreluje ujemnie z aktywnością paraoksonazy (PON)-1, ujemnym białkiem ostrej fazy, enzymem antyoksydacyjnym i detoksyfikacyjnym, odpowiedzialnym również za rozkład tiolaktonów, cząsteczek wykorzystywanych przez bakterie do wyczuwania liczebności. Aktywność PON1, jak zademonstrowałam we wcześniejszych badaniach, jest wyraźnie obniżona w nieswoistych zapaleniach jelit. Wobec faktu, że midkina w przeciwieństwie do klasycznych peptydów antybakteryjnych wykazuje swoją aktywność również przy fizjologicznych stężeniach soli¹³, istnienie znaczącej zależności między wzrostem stężenia midkiny a spadkiem aktywności PON-1 może sugerować, że przynajmniej częściowo wzmożone wydzielanie midkiny w nieswoistych zapaleniach jelit stanowi mechanizm obrony antybakteryjnej. Wobec faktu, że moc diagnostyczna większości wykorzystywanych w diagnostyce testów zawiera się w przedziale 80-95%, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że midkinę jako marker aktywnej choroby Leśniowskiego-Crohn'a czy marker ogólny choroby cechuje doskonała moc diagnostyczna (odpowiednio 95% i 90%), nieco słabsza w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego: 85 i 87%. Z wyjątkiem aktywnej postaci wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (dla którego midkina okazała się znamienne lepszym markerem niż CRP), wartości uzyskane dla rutynowo wykorzystywanego w praktyce

¹³ Svensson et al. *Midkine and pleiotrophin have bactericidal properties: preserved antibacterial activity in a family of heparin-binding growth factors during evolution.* J Biol Chem 2010;285:16105-15

klinicznej CRP były statystycznie nieistotnie niższe i wynosiły odpowiednio 92% i 88% w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a i 83% i 75% we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Jednoczesne oznaczanie obu markerów nie poprawia mocy diagnostycznej testu. Przy optymalnych wartościach odcięcia, w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a, midkinę jako biomarker cechowała znacznie wyższa swoistość niż czułość (97% wobec 86%, jako marker aktywnej choroby i 97% wobec 66%, jako marker ogólny). Tym samym, midkina mogłaby znaleźć zastosowanie jako marker potwierdzający chorobę (tzw. „ruling in” marker). Obiecujące może być oznaczanie midkiny w kombinacji z kalprotektyną, coraz częściej oznaczanym nowym markerem nieswoistych zapaleń jelit. Kalprotektynę charakteryzuje z kolei wysoka czułość, a więc negatywny wynik testu wyklucza chorobę (tzw. „ruling out” marker).

Pacjenci z IBD obarczeni są ponad 6-krotnie większym ryzykiem zachorowania na **raka jelita grubego** niż populacja ogólna¹⁴. Szacuje się, że u około 20% pacjentów z IBD chroniczny stan zapalny jelit przyczynia się do transformacji nowotworowej. Rak jelita grubego u pacjentów z IBD jest najczęściej wieloogniskowy, a prognoza jest gorsza niż w przypadku raka sporadycznego. Stąd u pacjentów z IBD zalecany jest nadzór onkologiczny obejmujący wykonywanie regularnych badań endoskopowych. Kolonoskopia jest jednak badaniem kosztownym, inwazyjnym i obciążonym ryzykiem krwawienia i perforacji jelita. Co więcej, ocena nabłonka pacjenta z IBD sprawia duże trudności interpretacyjne z uwagi na trudności w rozpoznaniu dysplazji. O ile w przypadku raka sporadycznego dysplazja najczęściej występuje w postaci polipa (wzniesionej), o tyle w IBD często pojawiają się zmiany płaskie. Dysplazja może także występować w obrębie lub w pobliżu różnych zmian makroskopowych towarzyszących IBD, np. pseudopolipów, wzniesionych zmian blaszkopodobnych, guzków oraz mas zapalnych, utrudniając identyfikację ognisk dysplazji. Może także być trudna do odróżnienia od procesów regeneracji nabłonka. IBD manifestują się przede wszystkim krwistą biegunką z domieszką śluzu i ropy, uniemożliwiając wykorzystanie w tej grupie pacjentów badania na krew utajoną w kale (FOB, fecal occult blood test). FOB jest zalecany jako test przesiewowy w kierunku raka jelita grubego w populacji ogólnej (pacjenci >50 roku życia), czy u pacjentów z innymi niż IBD czynnikami ryzyka rozwoju raka, np. z rodzinną polipowością gruczolakowatą lub z polipektomią w wywiadzie. Mimo swojej nieinwazyjności, łatwości wykonania i niskich kosztów przeprowadzenia badania, FOB cechuje niewystarczająca moc diagnostyczna. Co więcej, specyficzność testu zależy nie tylko od stopnia zaawansowania choroby, ale i od lokalizacji guza nowotworowego. Jedynymi biochemicznymi markerami wykorzystywanymi w praktyce klinicznej raka

¹⁴Mattar et al. *Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer*. *Gastrointest Cancer Res* 2011;4:53–61

jelita grubego jest antygen karcynoembrionalny (CEA), czy, znacznie rzadziej ze względu na mniejszą moc diagnostyczną, antygen nowotworowy CA19-9. Jednakże czułość CEA zależy w dużym stopniu od stopnia zaawansowania choroby, powodując, co potwierdzają również wyniki badań własnych, że CEA jako wczesny marker raka jelita grubego jest nieefektywny. Jego wykorzystanie jest natomiast rekomendowane do monitorowania stanu zdrowia pacjentów po leczniczej resekcji guza, jako że wzrost stężenia CEA jest często pierwszym sygnałem nawrotu choroby.

Mimo intensywnych badań nad midkiną w chorobie nowotworowej i wciąż rosnącej w niektórych krajach, również w Polsce, częstości występowania raka jelita grubego, w literaturze istniała luka odnośnie midkiny w tym typie nowotworu.

Celem pracy ***Tumor location determines midkine level and its association with the disease progression in colorectal cancer patients: a pilot study*** (poz. 4.5) była ocena ilościowa midkiny w tkance jelita grubego i odbytnicy u pacjentów z rakiem jelita grubego w odniesieniu do zaawansowania choroby i lokalizacji guza. W literaturze ostatnich lat pojawia się coraz więcej doniesień wskazujących na odmiennosc raka odbytnicy oraz raka prawej i lewej strony okrężnicy, określanych wspólnym mianem raka jelita grubego, zarówno pod względem czynników ryzyka, mechanizmów promujących rozwój choroby, przebiegu choroby, rokowania, ryzyka nawrotów oraz efektywności leczenia, jak i pod względem molekularnym¹⁵. Tymczasem ekspresja midkiny w raku jelita grubego była badana jedynie jakościowo oraz półilościowo i nie w aspekcie zaawansowania choroby czy lokalizacji guza. W swojej pracy po raz pierwszy wykazałam, że w 98% badanych tkanek guza w porównaniu z tkanką makroskopowo prawidłową pochodzącą od tego samego pacjenta midkina jest nadekspresjonowana. Stężenie midkiny w tkance guza było średnio 30-krotnie wyższe niż w tkance prawidłowej. W ponad 72% przebadanych prób stężenie midkiny było ponad 5-krotnie wyższe. Zaobserwowałam różnice w stężeniu midkiny w prawidłowej tkance okrężnicy i odbytnicy (wyższe w odbytnicy) oraz odmienny wzorzec zależności między ekspresją midkiny a zaawansowaniem choroby w raku okrężnicy i odbytnicy. Midkina podlegała silniejszej ekspresji w rakach odbytnicy w zaawansowanym stadium (III i IV), przerzutujących do węzłów chłonnych (pN1) niż w mniej zaawansowanych (I i II), nieprzerzutujących (pN0). W rakach okrężnicy zależność była odwrotna: midkina podlegała silniejszej ekspresji w rakach mniej zaawansowanych i nieprzerzutujących. Biorąc pod uwagę dane literaturowe dotyczące roli midkiny w nowotworzeniu, tj. zdolność do indukcji transformacji komórek oraz jej aktywność proangiogenną, uzyskane przeze mnie wyniki mogą wskazywać na udział

¹⁵Albuquerque et al. *Colorectal cancers choosing sides*. *Biochim Biophys Acta* 2011;1816:219–31

midkiny również w rozwoju raka jelita grubego. Zdają się one jednak implikować odmienną rolę w raku odbytnicy, w którym midkina może wspierać proces przerzutowania i w raku okrężnicy, w którym ekspresja midkiny nasila się we wcześniejszych etapach nowotworzenia. Zależność ekspresji midkiny od lokalizacji guza nie była przedmiotem wcześniejszych badań, może natomiast tłumaczyć sprzeczne wyniki badań immunohistochemicznych uzyskane przez japońskich badaczy, wskazujące bądź na stopniowy wzrost ekspresji midkiny w sekwencji tkanka prawidłowa – adenoma - adenocarcinoma, bądź na najsilniejszą ekspresję w adenomach^{11,16}. Uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają sugerowaną przez wielu badaczy odmienną rolę procesów nowotworzenia w różnych fragmentach jelita grubego, dodając midkinę do cząsteczek, których poziom ekspresji zależy od lokalizacji raka. Stwierdzona przeze mnie silniejsza ekspresja midkiny w makroskopowo prawidłowej tkance odbytnicy (granice resekcji guza z histopatologicznie potwierdzonym brakiem raka) oraz wykazany jej związek z przerzutowaniem, mogą przyczyniać się do częstszych wznów i gorszego rokowania w raku jelita grubego o tej właśnie lokalizacji. Biorąc pod uwagę fakt intensywnego badania różnych strategii hamujących ekspresję midkiny lub jej szlaków sygnałowych (np. udane zahamowanie wzrostu raka wątroby przez zastosowanie nanocząsteczek zawierających antysensowne nukleotydy), różnice w poziomie ekspresji midkiny i, potencjalnie, jej udziale w nowotworzeniu w zależności od lokalizacji guza, stanowią również istotną informację, która powinna być uwzględniona w planowaniu zindywidualizowanych antynowotworowych terapii biologicznych, skierowanych przeciw midkinie. Przedstawione wyniki wskazują na silną nadekspresję midkiny na poziomie białka, której jednak, jak wynika z prowadzonych przeze mnie aktualnie badań, towarzyszy jedynie umiarkowany wzrost ekspresji na poziomie mRNA (1.8-krotny), co może sugerować, obserwowane w przypadku innych czynników wzrostu, magazynowanie midkiny w macierzy zewnątrzkomórkowej.

Zdaniem wielu badaczy indywidualne markery, posiadające największą moc diagnostyczną czy predykcyjną, zostały już odkryte. Przyszłość biomarkerów leży raczej w umiejętnym łączeniu wielu czynników, wyselekcjonowanych dzięki zaawansowanym metodom statystycznym, które razem cechować może duża moc diagnostyczna, nawet jeśli indywidualnie ich własności nie są zadawalające. Zastosowanie panelu biomarkerów stwarza możliwość pokonania problemu heterogenności nowotworów, nawet w obrębie jednego typu. Pojawienie się technik umożliwiających jednoczesne oznaczanie wielu czynników w tej samej próbce biologicznej pozwala z kolei zredukować ilość potrzebnego materiału oraz zredukować

¹⁶Ye et al. *Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer*. Br J Cancer 1999;79:179–84

koszty badań w stosunku do wielu oznaczeń indywidualnych, stwarzając ponadto identyczne warunki oznaczeń wszystkich analizów.

Celem prac ***Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance*** (poz. 4.6) oraz ***Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases*** (poz. 4.7) była ocena możliwości wykorzystania midkiny w diagnostyce raka jelita grubego jako składowej wielomarkerowych paneli. Status midkiny na poziomie ogólnoustrojowym w raku jelita grubego i jej znaczenie kliniczne nie były przedmiotem wcześniejszych badań, podobnie jak nie podjęto wcześniej tematyki cytoprofilowania i jego użyteczności w diagnostyce raka jelita grubego. Ze względu na obszerność zgromadzonego materiału, wyniki badań podzielono na dwie prace, z których pierwsza (poz. 4.6) skupia się na analizie możliwości wykorzystania multipleksowania biomarkerów i zaawansowanych metod statystycznych dla poprawy mocy diagnostycznej testów opartych na kluczowych cytokinach prozapalnych i czynnikach wzrostowych, a druga (poz. 4.7) na statusie midkiny i jej związkach z zaawansowaniem choroby oraz, wykorzystując wyniki ujęte w pierwszej z prac, wzajemnych relacjach midkiny z kluczowymi cytokinami/czynnikami wzrostowymi oraz wartości diagnostycznej oznaczeń midkiny indywidualnie i jako składowej wielomarkerowych paneli.

W pracy ***Profiles of circulating inflammatory cytokines in colorectal cancer (CRC), high cancer risk conditions, and health are distinct. Possible implications for CRC screening and surveillance***, wykorzystując technikę multipleksowej analizy stężenia białek, bazującą na pomiarze w czasie rzeczywistym fluorescencji magnetycznych mikrosfer polistyrenowych znakowanych przeciwciałami (Technologia xMAP®, platforma Luminex), stworzono i przeanalizowano profil kluczowych cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostowych oraz CEA pacjentów z rakiem jelita grubego. Uzyskany profil porównano z profilem osób bez choroby nowotworowej, rekrutujących się bądź z populacji ogólnej z podobnym obciążeniem chorobami sercowo-naczyniowymi i cukrzycą, bądź z grup wysokiego ryzyka rozwoju raka jelita grubego (pacjenci z polipektomią w wywiadzie lub nieswoistymi zapaleniami jelit w nieaktywnej fazie choroby) oraz z profilem osób chorych bez choroby nowotworowej, lecz z aktywnym stanem zapalnym (pacjenci z owrzodzeniem podudzi lub nieswoistymi zapaleniami jelit w aktywnej fazie choroby). Łącznie badaniem objęto 246 osób (w tym 99 z rakiem jelita grubego). Uzyskane wyniki wskazują na potencjał FGF2, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , PDGF-BB, TNF- α i VEGF-A jako indywidualnych markerów w badaniach przesiewowych raka jelita grubego w populacji całkowitej, natomiast FGF2, IL-1 β i

MIP-1 α mogą znaleźć zastosowanie również jako markery w badaniach kontrolnych osób ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka. Ze względu na znamienne wzrost stężenia dopiero u pacjentów w III stadium zaawansowania raka, uzyskane wyniki potwierdzają niską wartość CEA jako markera w badaniach przesiewowych. W pracy zaobserwowano znamienne wyższe stężenia VEGF-A u pacjentów z rakiem odbytnicy niż rakiem zlokalizowanym z okrężnicy, a stężenia MCP-1 wykazywały podobną tendencję. Obserwacja ta może tłumaczyć gorsze rokowania charakterystyczne dla takiej lokalizacji guza.

Wykorzystując analizę dyskryminacyjną opracowano panele cytokin najlepiej różnicujących pacjentów we wczesnym stadium raka (wyłącznie I lub I i II) od grup kontrolnych. W większości przypadków panele wielomarkerowe cechowała wyższa moc i swoistość odpowiadająca 95% czułości niż testy oparte na cytokinach ocenianych indywidualnie lub w parach. Najwyższą moc diagnostyczną (93%) uzyskano w przypadku różnicowania pacjentów z rakiem w stadium I i chorych z nieswoistymi zapaleniami jelit dla panelu składającego się z FGF2, G-CSF, IL-6 i MCP-1. Test ten cechowała 75% swoistość przy 95% czułości, wskazując na możliwość jego wykorzystania w nadzorze onkologicznym pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit, podczas gdy test oparty jedynie na FGF2 i G-CSF, głównych cytokinach różnicujących badane grupy, cechowała nieco niższa moc diagnostyczna (86%), lecz brak swoistości (0%). Satisfakcjonującą moc diagnostyczną (86%) miał również test oparty na IL-8, MCP-1, GM-CSF, VEGF-A, IL-6, G-CSF i FGF2, różnicujący pacjentów z rakiem w I i II stadium i pacjentów z polipektomią w wywiadzie. Test oparty jedynie na IL-6 i IL-8, głównych cytokinach różnicujących, cechowała niewiele niższa moc (82%), ale znacznie niższa swoistość przy 95% czułości niż w przypadku panelu wielomarkerowego (20% wobec 68%).

W pracy *Circulating midkine in malignant and non-malignant colorectal diseases* po raz pierwszy wykazałam wyższe stężenie midkiny u pacjentów z rakiem jelita grubego niż u osób zdrowych lub z grupy podwyższonego ryzyka rozwoju raka, które korespondowało z zaawansowaniem choroby oraz stopniem odróżnicowania komórek nowotworowych. W przeciwieństwie do CEA, znamienne wyższego dopiero w stadium IV, stężenie midkiny było znamienne wyższe już w stadium I zaawansowania raka w porównaniu z grupą kontrolną lub stadium II w porównaniu z grupą zwiększonego ryzyka. Stężenie midkiny i CEA korespondowało z obecnością przerzutów, zarówno do okolicznych węzłów chłonnych, jak i przerzutów odległych. W kontekście dostępnej wiedzy o roli midkiny w nowotworzeniu, uzyskane wyniki implikują jej zaangażowanie również w rozwój CRC, wskazując na możliwość wykorzystania w ukierunkowanych terapiach biologicznych lub jako potencjalnego biomarkera. W pracy zaobserwowałam współzależność

między stężeniem midkiny a stężeniem kluczowych cytokin prozapalnych, chemokin i czynników wzrostowych (G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , PDGF-BB, TNF- α , VEGF-A), spośród których zmiany stężenia IL-1 β oraz PDGF-BB były niezależnymi predyktorami stężenia midkiny, podkreślając rolę stanu zapalnego i angiogenezy czy też implikując potencjalny bezpośredni udział IL-1 β i PDGF-BB, w indukcji ekspresji i sekrecji midkiny w CRC. Wykazałam ponadto, że midkinę cechuje większa moc diagnostyczna niż CEA, zarówno jako marker ogólny (80% dla midkiny wobec 60% dla CRP), jak i marker wczesnego raka w populacji ogólnej (74 wobec 52%) czy jako marker różnicujący chorych z CRC i nieaktywnym IBD (77 wobec 70%). W przeciwieństwie do CEA (79%) midkina nie ma natomiast mocy dyskryminującej CRC od nieswoistych zapaleń jelit w zaostrzeniu (59%). W swojej pracy wskazałam na możliwość efektywnego różnicowania grup pacjentów przez panele wielomarkerowe, składające się ze wskaźników indywidualnie pozbawionych mocy dyskryminacyjnej oraz potencjał midkiny jako jednej z komponent takich paneli. W pracy porównano zdolność IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , G-CSF, GM-CSF, FGF2, PDGF-BB, TNF- α , VEGF-A, midkiny i CEA jako potencjalnych markerów różnicujących chorych z CRC, z polipami i osoby zdrowe, oznaczanych indywidualnie lub w wieloczynnikowym panelu. Mimo braku własności dyskryminacyjnych w oznaczeniach indywidualnych, panel składający się z midkiny, CEA, IL-1 β , IL-8, MCP-1, MIP-1 α , G-CSF, GM-CSF, FGF2, PDGF-BB i VEGF-A miał dużą moc dyskryminacyjną i pozwalał na prawidłową klasyfikację 97.5% pacjentów z CRC, 80% pacjentów z polipami i 76.5% osób zdrowych.

Perforacja jelita w przebiegu chorób zapalnych lub nowotworowych jelit oraz nieszczelność zespolenia jako główne powikłanie zabiegów chirurgicznych w zakresie jelita grubego i odbytnicy, stanowią jedną z częstszych przyczyn **sepsy brzusznej**. Czynniki te, eskalując do sepsy ciężkiej lub wstrząsu septycznego, wiążą się z wysoką śmiertelnością. Szacuje się, że liczba zachorowań na ciężką sepsę w ostatnim dwudziestolecu uległa podwojeniu. Ze względu na gwałtowny rozwój technik inwazyjnych, starzenie społeczeństw ze zwiększającą się populacją chorych z upośledzonym układem odpornościowym oraz rosnącą lekooporność mikroorganizmów chorobotwórczych, prognozowany jest dalszy wzrost liczby zachorowań. Biorąc pod uwagę wysokie koszty hospitalizacji pacjentów, ciężka sepsa/wstrząs septyczny stanowi nie tylko poważny problem medyczny, ale i ekonomiczny¹⁷.

Rola cytokin jako mediatorów odpowiedzi immunologicznej, ich udział w rozwoju kolejnych etapów sepsy, począwszy od zespołu uogólnionej odpowiedzi zapalnej (systemic inflammatory response syndrome; SIRS), poprzez fazę antyzapalną (compensatory antiinflammatory response syndrome; CARS), aż po

¹⁷Kubler et al. *Severe sepsis in Poland-results from Web registration of 1043 cases*. Med Sci Monit 2004;10:CR635Y-41

niewydolność wielonarządową, stanowią główny nurt w badaniach nad sepsą. Uważa się, że za powodzenie postępowania terapeutycznego w ciężkiej sepsie odpowiada przede wszystkim wczesne rozpoznanie i intensywne wielokierunkowe leczenie. To właśnie wśród cytokin poszukuje się zarówno nowych potencjalnych celów terapeutycznych, jak i biomarkerów, umożliwiających wczesną diagnostykę, różnicowanie patogenów, prognozowanie przebiegu infekcji czy monitorowanie skuteczności wdrożonego leczenia¹⁸. Midkina nie była dotychczas przedmiotem badań u pacjentów z sepsą, mimo posiadania przez nią szeregu własności potencjalnie istotnych zarówno z punktu widzenia obrony organizmu przed infekcją, jak i dla rozwoju choroby. Midkina, oprócz zwalczania infekcji dzięki własnościom antybakteryjnym, może, poprzez nieprawidłowości w migracji neutrofilii i monocytów czy indukcję cytokin prozapalnych, przyczynić się do niewydolności jednego lub wielu narządów. Jako modulator ekspresji VEGF-A, uPA, PAI i syntezy tlenu azotu, midkina może przyczynić się do towarzyszących sepsie zaburzeń fibrylizacji i przepuszczalności naczyń oraz dysfunkcji śródbłonka. Z kolei własności immunosupresyjne midkiny czy jej zdolność do indukcji ekspresji TGF- β , mogą przyczynić się do rozwoju kompensacyjnej fazy antyzapalnej sepsy (CARS). W związku z powyższym, midkina może zostać wykorzystana nie tylko jako biomarker, ale i stanowić potencjalny cel ukierunkowanych terapii w sepsie czy być wykorzystana jako lek.

Celem pracy ***Midkine, a multifunctional cytokine, in patients with severe sepsis and septic shock: a pilot study*** (poz. 4.8) było scharakteryzowanie midkiny na poziomie ogólnoustrojowym w ciężkiej sepsie i wstrząsie septycznym oraz ocena jej potencjału jako biomarkera w diagnostyce, diagnostyce różnicowej, ocenie ostrości choroby i przewidywania jej przebiegu, wystąpienia powikłań narządowych oraz efektywności leczenia. W pracy po raz pierwszy wykazałam postępujący wzrost ogólnoustrojowego stężenia midkiny w sekwencji: zdrowie - stan zapalny - zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej (SIRS) – sepsa (ciężka sepsa/wstrząs septyczny). Stężenia midkiny w sepsie były 14-krotnie wyższe od stężeń obserwowanych u ludzi zdrowych oraz 3-4 krotnie wyższe niż u osób ze stanem zapalnym, nawet uogólnionym. U ponad 63% pacjentów z sepsą stwierdzono obecność stężeń midkiny przekraczających 1 mg/L. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na możliwość wykorzystania midkiny w diagnostyce sepsy do różnicowania stanu zapalnego przebiegającego z infekcją lub bez niej, w konsekwencji ułatwiając decyzję kliniczną o wdrożeniu antybiotykoterapii. W przypadku potwierdzenia w badaniach dodatkowych jej niekorzystnego wpływu na rozwój sepsy, midkina może stanowić potencjalny nowy cel terapeutyczny. Oznaczanie stężenia midkiny może być pomocne także w praktyce klinicznej, u pacjentów z nieswoistymi

¹⁸ Bochud et al. *Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment*. BMJ 2003;326:262-6

zapaleniami jelit, u których diagnostyka i leczenie infekcji oportunistycznych stanowi duże wyzwanie. W pracy zaobserwowałam różnice w dynamice zmian stężenia midkiny w przebiegu ciężkiej sepsy i wstrząsu septycznego: stopniowy spadek stężenia w ciężkiej sepsie w przeciwieństwie do utrzymującego się na stałym wysokim poziomie stężenia we wstrząsie septycznym. Uzyskany wynik wskazuje na możliwość wykorzystania monitorowania stężenia midkiny do oceny ryzyka wystąpienia wstrząsu septycznego u pacjentów z ciężką sepsą, a zatem do oceny konieczności wprowadzenia bardziej agresywnego leczenia. Przeprowadzone przeze mnie badania dowiodły istnienia zależności między stężeniem midkiny w krążeniu a rodzajem patogenu; najwyższe stężenia midkiny przy przyjęciu zaobserwowano w infekcjach bakteryjnych spowodowanych bakteriami Gram-dodatnimi. Właściwa ocena rodzaju patogenu przyspiesza diagnozę i umożliwia wczesne wdrożenie ukierunkowanej antybiotykoterapii. Niestety, uzyskanie wyników posiewów krwi jest czasochłonne. Co więcej, szacuje się, że mimo klinicznych objawów infekcji, wyniki seryjnych posiewów są w około połowie przypadków fałszywie ujemne. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na możliwość wykorzystania oznaczeń stężenia midkiny do wczesnego potwierdzenia infekcji i różnicowania sepsy spowodowanej bakteriami Gram-dodatnimi od sepsy wywołanej przez inne patogeny. Ponadto zaobserwowałam różnice w dynamice zmian stężenia midkiny w sepsie przebiegającej bez niewydolności sercowo-naczyniowej (stopniowy spadek stężenia midkiny) lub z niewydolnością sercowo-naczyniową (utrzymujące się wysokie jej stężenie). Uzyskany wynik wskazuje na możliwość wykorzystania monitorowania stężenia midkiny do identyfikacji pacjentów zagrożonych ryzykiem wystąpienia niewydolności sercowo-naczyniowej, pozostającej główną przyczyną zgonu wśród pacjentów z ciężką sepsą/wstrząsem septycznym. Wykazałam także, że stężenie midkiny przy przyjęciu zależy od stopnia nasilenia kwasicy metabolicznej. Co więcej, zaobserwowałam utrzymujący się wysoki poziom tej cytokiny u pacjentów wymagających mechanicznej wentylacji wobec stopniowego spadku stężenia midkiny u pacjentów, którzy mechanicznej wentylacji nie wymagają. Obserwacja ta, poparta trwale wysokim stężeniem cytokiny u pacjentów z niewydolnością krążenia, może wskazywać na hipoksję jako czynnik indukujący wzrost stężenia midkiny we krwi pacjentów z sepsą. Można również rozważyć posłużenie się monitorowaniem stężenia midkiny do oceny ryzyka wystąpienia u pacjentów z ciężką sepsą/wstrząsem septycznym ogólnotkankowej hipoksji czy, podobnie jak monitorowanie stężenia mleczanu, do oceny skuteczności wdrożonego leczenia. Stężenie midkiny nie korelowało ze stężeniem markerów biochemicznych oznaczanych rutynowo u pacjentów z sepsą, tj. CRP i prokalcytoniny czy punktów skal APACHE II lub SOFA, służących do oceny stopnia ostrości sepsy. Obserwacja ta sugeruje, że oznaczanie stężenia midkiny u pacjentów z sepsą może stanowić nową jakość, a nie powielenie informacji

uzyskanej metodami rutynowo wykorzystywanymi w praktyce klinicznej. I tak, na przykład, rodzaj patogenu nie wpływał na ocenę w skali APACHE II i SOFA, a stężenia CRP i prokalcytoniny były wyższe w sepsie Gram-ujemnej, implikując, że jednoczesne oznaczanie stężenia midkiny i CRP lub prokalcytoniny może wspomóc diagnostykę różnicową sepsy o podłożu bakteryjnym.

Reasumując wyniki badań przedstawionych w osiągnięciu; jako pierwsza wykazałam, że chorobom zapalnym i nowotworowym jelit oraz ich powikłaniom infekcyjnym towarzyszy nasiloną sekrecja midkiny, która koreluje z ostrością lub zaawansowaniem choroby. W kontekście aktualnie dostępnej wiedzy na temat własności biologicznych midkiny, uzyskane przeze mnie wyniki mogą implikować udział midkiny w rozwoju wymienionych schorzeń, wskazując ją jako potencjalny cel terapeutyczny oraz biomarker w tej grupie chorób. Przedstawione w osiągnięciu prace stanowią również pierwsze doniesienie wiążące midkinę z wyniszczeniem, zarówno w przebiegu choroby nowotworowej, jak i nieswoistych zapaleń jelit.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje główne zainteresowania badawcze oscylowały wokół znaczenia klinicznego wybranych czynników angiogennych i limfangiogennych oraz mediatorów stanu zapalnego i wykładników stresu oksydacyjnego w chorobach przewodu pokarmowego wraz z zespołami towarzyszącymi chorobom przewlekłym – anemią i kacheksją. Badania nad stresem oksydacyjnym i adipokinami w cukrzycy typu I i otyłości dziecięcej stanowiły drugi główny nurt badawczy.

Nowotwory górnego odcinka przewodu pokarmowego

Pracę naukową rozpoczynałam od oceny znaczenia klinicznego midkiny w łagodnych i nowotworowych chorobach przełyku oraz połączenia przełykowo-żołądkowego (raku płaskonabłonkowym i gruczolakoraku). Ze względu na brak komercyjnie dostępnych zestawów immunoenzymatycznych do oceny stężenia midkiny, opracowałam własny test wykorzystujący technikę immunoenzymatycznej detekcji typu „sandwich” z dwoma rodzajami przeciwciał (DASI-ELISA), prezentując test i jego walidację w pracach: *Immunoenzymatic method for midkine determination in serum** (I.B.3)[†] oraz *Elevated levels of an angiogenic factor, midkine, in serum of patients with hernia** (I.B.2). W pracy *Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma* (I.A.3) dowiodłam, że chorobom przełyku towarzyszy wzrost stężenia midkiny w surowicy, nieznaczny w przypadku schorzeń łagodnych (głównie w achalazji), a

znaczny w przypadku chorób nowotworowych, szczególnie w gruczolakorakach. Zaobserwowana przeze mnie zależność między stężeniem midkiny a rozległością guza pierwotnego wskazuje na nowotwór jako główne, lecz nie jedyne źródło cytokiny w krążeniu. Uzyskane przeze mnie wyniki świadczą również o wzmożonej ekspresji i sekrecji midkiny przez komórki krwi i stanowią pierwsze doniesienie sugerujące obecność tej cytokiny, oprócz wielu innych czynników wzrostu, w ziarnistościach płytek krwi. Wykazałam także po raz pierwszy, że stężenie midkiny w surowicy chorych na nowotwory przełyku ściśle wiąże się z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych i z ilością zajętych węzłów oraz koreluje ze stężeniem głównego czynnika limfoangiogenego – VEGF-C, co może sugerować zaangażowanie midkiny w limfoangiogenezę nowotworową i stanowi ważne, z punktu widzenia klinicznego, odkrycie. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, zajęcie węzłów chłonnych jest najważniejszym czynnikiem prognostycznym w nowotworach przełyku i połączenia przełykowo-żołądkowego i pojawia się już w bardzo wczesnych stadiach choroby¹⁹. Uważa się, że u jednej trzeciej pacjentów z nowotworami zaklasyfikowanymi jako N0, w okolicznych węzłach chłonnych obecne są mikroprzerzuty, których obecność jest pod względem prognostycznym równoważna z potwierdzeniem rozsiania procesu nowotworowego, a które są niezwykle trudne do wykrycia w badaniach przedoperacyjnych. Stopień zajęcia węzłów chłonnych odzwierciedla szczególnie agresywny charakter nowotworu, wiążąc się ze zwiększonym odsetkiem zgonów pooperacyjnych na skutek wznowienia procesu rozrostowego. Status zajęcia węzłów jest też czynnikiem decydującym o rozległości zabiegu operacyjnego. Z powyższych względów, ocena stężenia czynników limfoangiogenych postrzegana jest jako nowa strategia diagnostyczna, która mogłaby wesprzeć metody tradycyjne²⁰. Przedstawione przeze mnie badania rozszerzały również aktualną wiedzę na temat midkiny o nowotwory zaawansowane, wcześniej nie badane, wskazując po raz pierwszy na udział tej cytokiny w chorobie przerzutowej. W swoich badaniach oceniłam midkinę jako biomarker obecności nowotworu oraz obecności przerzutów w węzłach chłonnych wykazując, że cechuje ją większa moc diagnostyczna niż VEGF-A, VEGF-C, czy IL-8. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na możliwość zastosowania oznaczeń midkiny jako badania dodatkowego, wspierającego kliniczną ocenę statusu zajęcia węzłów chłonnych, niezbędną dla wyboru najwłaściwszego sposobu leczenia, oceny rozległości ewentualnego zabiegu operacyjnego i ustalenia rokowania. Powyższe wyniki stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej pt.:

†oznaczenia odnoszą się do pozycji zajmowanej w „Wykazie opublikowanych prac naukowych z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia” przygotowanym przez Bibliotekę UMED (załącznik 3)

¹⁹ Enzinger et al. *Medical Progress: Esophageal Cancer*. NEJM 2003;349:2241-52

²⁰ Tamura et al. *Chest CT and serum VEGF-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer*. Chest 2004;126:342–6

* Praca ukazała się przed obroną pracy doktorskiej

Midkina w nowotworach przełyku i połączenia przełykowo-żołądkowego, którą obroniłam w 2006 r., a której wstęp posłużył do przygotowania pracy przeglądowej o budowie i funkcji midkiny zatytułowanej: Budowa i funkcja midkiny, nowego czynnika wzrostu wiążącego heparynę (III.B.1).

VEGF-A należy do najintensywniej badanych czynników angiogennych, natomiast w czasie gdy prowadziłam swoje badania, brak było w literaturze danych dotyczących stężenia VEGF-C, PDGF-BB czy IL-8 na poziomie ogólnoustrojowym w nowotworach przełyku i połączenia przełykowo-żołądkowego. Identyfikacja nowych potencjalnych czynników angio- i limfangiogennych jest istotna nie tylko ze względu na możliwość ich wykorzystania jako biomarkerów czy potencjalnych nowych celów terapeutycznych, ale może być także pomocna w fenotypowaniu nowotworów. Mankamentem już wdrożonych terapii biologicznych skierowanych przeciwko VEGF-A jest bowiem stosunkowo szybkie uodparnianie się nowotworów na działanie leku, co w dużej mierze wynika z ich elastyczności, pozwalającej na realizację programu angiogenezy i limfangiogenezy w oparciu o różne mediatory i szlaki przekazywania sygnału²¹. Określenie profilu angio- i limfangiogennego danego nowotworu poprzez ocenę stężenia zidentyfikowanych mediatorów obu procesów może pozwolić na zindywidualizowanie terapii i selekcję tych pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z wdrożonego leczenia, jak również umożliwi monitorowanie ewentualnych zmian fenotypu podczas kuracji i odpowiednią jej modyfikację. W swoich badaniach jako pierwsza wykazałam ogólnoustrojowy wzrost stężenia VEGF-C (*Up-regulation of VEGF-C secreted by cancer cells and not VEGF-A correlates with clinical evaluation of lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)*) (I.A.4), IL-8 (*Elevation of circulating interleukin 8 is related to lymph node and distant metastases in esophageal squamous cell carcinomas - implication for clinical evaluation of cancer patient*) (I.A.9) oraz PDGF-BB (*Increase in serum platelet-derived growth factor (PDGF)-BB reflects lymph node involvement in esophageal cancer patients independently from platelet count*) (I.B.8) w nowotworach górnego odcinka przewodu pokarmowego. Wzrost stężenia VEGF-C powiązany był wyłącznie z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, podczas gdy na stężenie IL-8 wpływała zarówno rozległość guza pierwotnego, jak i obecność wtórnych ognisk nowotworowych, zaś niezależnymi predyktorami wzrostu stężenia PDGF-BB była obecność przerzutów w węzłach chłonnych, trombocytoza oraz stężenie VEGF-C. Silną zależność między stężeniem czynników angiogennych a ilością trombocytów zaobserwowałam także w przypadku VEGF-A i VEGF-C, co sugeruje, że również w nowotworach górnego odcinka przewodu pokarmowego ich stężenie w dużej mierze odzwierciedla zasób

²¹Sullivan et al. *The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition*. MAbs 2010;2:165–75

czynników zgromadzonych w płytkach. Wykazałam także, że VEGF-C jako marker obecności raka płaskonabłonkowego cechowała większa moc diagnostyczna niż VEGF-A i IL-8, zaś IL-8 jest lepszym wskaźnikiem obecności przerzutów, zarówno do węzłów chłonnych, jak i przerzutów odległych. O ważkości zagadnienia i znaczeniu uzyskanych przeze mnie wyników świadczy fakt, że praca dotycząca VEGF-C pozostaje najczęściej cytowaną pozycją w moim dorobku (liczba cytowań: 48).

Ekspresja czynników proangiogennych w komórkach nowotworowych zależy od dostępności tlenu, obniżonej w zaawansowanych nowotworach głównie na skutek miejscowego niedokrwienia (hipoksja ischemiczna) i upośledzenia dyfuzji tlenu (hipoksja dyfuzyjna). Coraz częściej zwraca się jednak uwagę, że na utlenowanie guza negatywny wpływ może mieć również obniżona zdolność krwi do transportu tlenu (hipoksja spowodowana anemią) oraz niskie ciśnienie parcjalne tlenu (hipoksemia)²². Stosunkowo niewiele jest doniesień analizujących związek między hipoksją nowotworową spowodowaną anemią a stężeniem czynników proangiogennych w surowicy, mimo że anemia występuje u większości chorych na nowotwory, szczególnie przewodu pokarmowego. Co więcej, współwystępowanie anemii przed rozpoczęciem leczenia stanowi niezależny czynnik ryzyka wznowy oraz czynnik predykcyjny niepowodzeń w leczeniu nie tylko u pacjentów poddawanych chemioterapii, ale i u tych leczonych chirurgicznie. Jednak postulowany związek przyczynowo-skutkowy między stężeniem hemoglobiny a utlenowaniem guza, nasiloną ekspresją czynników angiogennych i w konsekwencji zwiększoną agresywnością nowotworu pozostaje kontrowersyjny. W okresie, w którym prowadziłam swoje badania, niemal całkowicie brakowało natomiast doniesień dotyczących związków stężenia czynników proangiogennych z hipoksją nowotworową na tle hipoksemii. Tymczasem w związku ze współwystępowaniem chronicznej obturacyjnej choroby płuc, u pacjentów z rakiem przełyku często dochodzi do spadków saturacji i ciśnienia parcjalnego tlenu. Co więcej, nieprawidłowe wyniki testów oddechowych w okresie przedoperacyjnym są negatywnym czynnikiem prognostycznym u pacjentów poddanych ezofagektomii. W swoich badaniach, których wyniki przedstawiłam w pracach: *Even a mild anemia is related to tumor aggressiveness mediated by angiogenic factors* (I.B.7) oraz *Impact of systemic hypoxemia on cancer aggressiveness and circulating vascular endothelial growth factors A and C in gastroesophageal cancer patients with chronic respiratory insufficiency* (I.B.4), wykazałam częstsze występowanie przerzutów, szczególnie do węzłów chłonnych, u pacjentów z rakiem przełyku lub połączenia przełykowo-żołądkowego i współistniejącą anemią, nawet w łagodnej jej postaci oraz związek między rozległością guza a

²²Varlotta et al. *Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2005;63:25–36.

ogólnoustrojową hipoksemią. Stężenie proangiogennej midkiny, wymiennie z przerzutowaniem, okazało się niezależnym predyktorem występowania anemii i stężenia hemoglobiny w tej grupie pacjentów, a spadek stężenia hemoglobiny <10 g/dL okazał się być silnym induktorem sekrecji VEGF-A. Wykazałam także, że współistnienie niewydolności oddechowej u pacjentów z rakiem przełyku lub połączenia przełykowo-żołądkowego wiąże się nie tylko ze zmianami w sekrecji czynników proangiogennych, tj. silniejszą niż u pacjentów z normoksemią sekrecją midkiny, VEGF-A i IL-8, a obniżoną PDGF-BB (*Respiratory insufficiency related to COPD accelerates systemic inflammation, under-nutrition, and angiogenesis in esophageal malignancies* (I.B.5), *Impact of systemic hypoxemia on cancer aggressiveness and circulating vascular endothelial growth factors A and C in gastroesophageal cancer patients with chronic respiratory insufficiency* (I.B.4)), ale i mediatorów stanu zapalnego – wyższym stężeniem IL-6 i CRP, a obniżonym albuminy i transferyny (*Respiratory insufficiency related to COPD accelerates systemic inflammation, under-nutrition, and angiogenesis in esophageal malignancies* (I.B.5)), których stężenie bezpośrednio koreluje z saturacją oraz ciśnieniem parcjalnym tlenu. Zaobserwowałam także częstsze niż przy normoksemii występowanie kacheksji nowotworowej u pacjentów z nowotworami górnego odcinka przewodu pokarmowego i towarzyszącą hipoksemią.

Oprócz prac nad czynnikami angiogennymi i białkami ostrej fazy w kacheksji, ujętych w osiągnięciu, brałam również udział w badaniach, które dowiodły, że kacheksji nowotworowej w raku przełyku towarzyszy także hipoleptynemia. Leptyna, hormon regulujący apetyt i cytokina będąca modulatorem odpowiedzi zapalnej i immunologicznej, nie była w przypadku raku przełyku zaangażowana w progresję choroby nowotworowej, ale, niezależnie od wskaźników masy ciała, wiązała się z wyniszczeniem i korelowała z mediatorami zapalnymi CRP, IL6 i IL8 (*Circulating leptin and inflammatory response in esophageal cancer, esophageal cancer-related cachexia-anorexia syndrome (CAS) and non-malignant CAS of the alimentary tract*) (I.A.15).

Szacuje się, że za inicjację procesu nowotworzenia w około ¼ przypadków odpowiada chroniczny stan zapalny i związany z nim stres oksydacyjny^{23,24}. Wolne rodniki uwalniane podczas wybuchu tlenowego przez komórki układu odpornościowego mogą uszkadzać tkanki sąsiadujące z miejscem infekcji lub uszkodzenia, szczególnie gdy współistnieje niewydolność mechanizmów antyoksydacyjnych. Indukowana wolnymi rodnikami modyfikacja białek, lipidów i kwasów nukleinowych znacznie zwiększa ryzyko

²³Grivennikov et al. *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell 2010;140:883–899

²⁴Reuter et al. *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* Free Radic Biol Med 2010;49:1603-16

wystąpienia raka. Zmodyfikowane struktury, oprócz utraty czy zmiany funkcji biologicznych, stają się również obiektem ataku układu odpornościowego, nasilając i podtrzymując wydzielanie cytokin prozapalnych i czynników wzrostowych, z których wiele ma działanie pronowotworowe i proangiogenne. Ze względu na zaangażowanie stresu oksydacyjnego zarówno w inicjację nowotworzenia, jak i w postęp choroby nowotworowej, jego wykładniki badane są pod kątem możliwości wykorzystania ich jako markerów raka. W swoich badaniach brałam udział w ocenie potencjału 8-hydroksydeoksy guanidyny (wykładnik oksydacyjnej modyfikacji DNA) oraz malonodialdehydu (marker peroksydacji lipidów, MDA), a także wskaźników wydolności antyoksydacyjnej (całkowitego statusu antyoksydacyjnego - TAS oraz aktywności enzymu paraoksonazy (PON)-1) jako biomarkerów w nowotworach górnego odcinka przewodu pokarmowego. Nasze wyniki, przedstawione w pracy pt.: *Evaluation of 8-hydroxydeoxyguanosine, thiobarbituric acid-reactive substances and total antioxidant status as possible disease markers in oesophageal malignancies* (I.A.7), dowiodły, że rakowi przełyku towarzyszy proporcjonalny do postępu choroby, szczególnie przerzutowania do węzłów chłonnych, wzrost stężenia 8-hydroksydeoksy guanidyny oraz stężenia malonodiadehydu, a spadek całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Wskazują one również na stopniowe wyczerpywanie się antyoksydantów osocza bez akumulacji oksydacyjnie zmodyfikowanych makrocząsteczek w łagodnych, nienowotworowych chorobach przełyku. W chorobie nowotworowej pojawia się natomiast niewydolność układu antyoksydacyjnego, której towarzyszy akumulacja zarówno produktów peroksydacji lipidów, jak i oksydacyjnej modyfikacji DNA. Zaobserwowane zaburzenia oksydoredukcyjne nie są jednak nieodwracalne, ponieważ wykazaliśmy, że chirurgiczne usunięcie guza wiązało się z normalizacją ocenianych parametrów. Wszystkie badane wykładniki stresu oksydacyjnego, jako markery obecności raka przełyku, charakteryzowała wysoka moc diagnostyczna, wynosząca, w przypadku 8-hydroksydeoksy guanozyny, nawet 98%. Paraoksonaza-1 (PON1) jest wielofunkcyjną esterazą zaangażowaną m.in. w ochronę lipidów przed peroksydacją czy w rozkład tiolaktanu homocysteiny, toksycznego związku pośredniczącego w negatywnych skutkach hiperhomocysteinemii, któremu przypisywane są również własności proangiogenne²⁵. W pracy *Paraoxonase 1 (PON1) status in gastroesophageal malignancies and associated paraneoplastic syndromes - connection with inflammation* (I.A.8) jako pierwsza wykazałam, że w raku przełyku dochodzi do spadku aktywności enzymu, co może przekładać się na stworzenie prooksydacyjnego, prozapalnego i proangiogenego środowiska w otoczeniu guza, a więc przyczyniać się do progresji choroby i promocji

²⁵ James RW. *A long and winding road: defining the biological role and clinical importance of paraoxonases*. Clin Chem Lab Med 2006;44:1052–9

przerzutowania. Rzeczywiście, zaobserwowałam, że spadek aktywności PON1 koresponduje z zaawansowaniem choroby nowotworowej, szczególnie przerzutowaniem do węzłów chłonnych, którego PON1 była niezależnym wskaźnikiem o mocy diagnostycznej większej niż VEGF-C. Zgodnie z przypisywaną enzymowi funkcją negatywnego regulatora ekspresji białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP1), aktywność PON1 była ujemnie skorelowana z nasileniem stanu zapalnego. Jak wspomniano wcześniej, niedożywienie i anemia u pacjentów nowotworowych są złymi czynnikami rokowniczymi, m.in. negatywnie wpływają na skuteczność leczenia, niezależnie od formy terapii. W pracy wykazałam, że aktywność PON1 obniżała się stopniowo wraz ze wzrostem punktacji Glasgow i była skorelowana nie tylko z wykładnikami stanu zapalnego (ujemnie), ale i stanu odżywienia pacjentów – transferyną i albuminą (dodatkowo) – oraz ze współwystępowaniem anemii. Tym samym ocena aktywności PON1 jako pojedynczego parametru mogłaby służyć do oceny rokowania pacjentów z rakiem górnego odcinka przewodu pokarmowego, niosąc w sobie jednocześnie informację dotyczącą nasilenia odpowiedzi zapalnej i stresu oksydacyjnego oraz stanu odżywienia.

Nowotwory dolnego odcinka przewodu pokarmowego, nieswoiste zapalenia jelit

W dalszych swoich badaniach zajęłam się oceną wskaźników stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego oraz mediatorów angiogenezy w chorobach zapalnych i nowotworowych dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Dopełnieniem badań dotyczących midkiny, omówionych w części dotyczącej osiągnięcia naukowego, była ocena statusu PDGF-BB w tej grupie chorób. W literaturze pojawiły się propozycje terapii biologicznych dla nieswoistych zapaleń jelit oparte na hamowaniu aktywności PDGF-BB²⁶, mimo że ogólnoustrojowy status tego czynnika wzrostu nie był znany. Dostępne dane literaturowe wskazywały jedynie na lokalny wzrost ekspresji PDGF w tkance jelita w obszarach zapalnych oraz miejscach z dużą aktywnością procesów włóknienia. W pracy *Platelet-derived growth factor-BB reflects clinical, inflammatory and angiogenic disease activity and oxidative stress in inflammatory bowel disease* (I.A.12) wykazałam jako pierwsza, że nieswoistym zapaleniom jelit towarzyszy wzrost stężenia PDGF-BB, zarówno krążącego (PDGF-BB w osoczu), jak i pochodzącego z puli płytkowej (PDGF-BB w surowicy), który odzwierciedla kliniczną i endoskopową aktywność choroby. Zaobserwowałam silniejsze powiązanie PDGF-BB krążącego z nasileniem stresu oksydacyjnego, a stanu zapalnego oraz potencjału angiogennego z pulą płytkową czynnika.

²⁶Magro et al. *Long-standing remission of Crohn's disease under imatinib therapy in a patient with Crohn's disease*. *InflammBowel Dis* 2006;12:1087–9

Rola stresu oksydacyjnego w patogenezie i rozwoju nieswoistych zapaleń jelit jest dobrze udokumentowana. Uważa się, że przeciwdziałanie zaburzeniom równowagi oksydoredukcyjnej może stać się celem nowych terapii biologicznych w tej grupie chorób, szczególnie że kwas 5'-aminosalicylowy (5'-ASA, mesalazyna), niesteroidowy lek przeciwzapalny, szeroko i z powodzeniem stosowany w klinice IBD, ma również własności zmiatacza wolnych rodników. Dla opracowania skutecznych i bezpiecznych terapii kluczowe jest jednak dokładne poznanie zależności między potencjałem antyoksydacyjnym i modyfikacjami oksydacyjnymi wywołanymi zaburzeniem równowagi redoks a stanem zapalnym i przebiegiem choroby²⁷. W swoich badaniach jako pierwsza odkryłam, że chorobie Leśniowskiego-Crohn'a oraz wrzodziejącemu zapaleniu jelita grubego towarzyszy nagromadzenie zaawansowanych produktów utlenienia białek, AOPP (advanced oxidation protein products), dokumentując uzyskane wyniki w pracy *Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD* (I.A.10). AOPP powstają głównie w wyniku działania kwasu podchlorawego na grupy tiolowe i aminowe białek, co prowadzi do tworzenia się międzybiałkowych wiązań krzyżowych, a w konsekwencji do utraty funkcji biologicznej, agregacji i akumulacji zmodyfikowanych białek. Kwas podchlorowy powstaje w czasie reakcji zapalnej w wyniku działania mieloperoksydazy uwalnianej z ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych. Powstałe AOPP, działając za pośrednictwem receptorów dla zaawansowanych produktów glikacji (RAGE), nasilają i podtrzymują stan zapalny przez aktywację monocytów, neutrofilów i limfocytów T²⁸. Jako wskaźniki łączące w sobie komponentę stresu oksydacyjnego (powstają w jego wyniku) i stanu zapalnego (nasilają i podtrzymują stan zapalny), AOPP wzbudziły szczególne zainteresowanie badaczy w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako biomarkera, głównie w chorobach o podłożu autoimmunologicznym czy związanych z chronicznym stanem zapalnym. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że u pacjentów w zaostrzeniu IBD dochodzi do akumulacji AOPP, w ilości wprost proporcjonalnej do aktywności klinicznej choroby, mimo że albumina jest głównym białkiem surowicy ulegającym modyfikacji oksydacyjnej a hypoalbuminemia dotyka około 80% pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohn'a i 50% pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego. Zaobserwowałam również dodatnie korelacje między AOPP a indeksami stanu zapalnego: OB, WBC, PLT, a także IL6 oraz stężeniem triglicerydów, a ujemne między AOPP a transferyną, indeksem stanu odżywienia.

²⁷Kruidenier et al. *Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or radiculous?* *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1997–2015

²⁸Witko-Sarsat et al. *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.* *Kidney Int* 1996; 49:1304-13

Anemia jest jedną z głównych pozajelitowych manifestacji nieswoistych zapaleń jelit i w formie łagodnej do umiarkowanej występuje u większości pacjentów. Na występowanie anemii w IBD składać się może wiele przyczyn, ale głównie stanowi ona mieszankę anemii z niedoboru żelaza, wynikającej ze zwiększonej utraty krwi oraz zaburzeń wchłaniania żelaza w zapalnym jelicie oraz anemii chorób przewlekłych, indukowanej cytokinami, prowadzącej do funkcjonalnego niedoboru żelaza. Anemię pogłębiać mogą niektóre ze stosowanych w klinice IBD leków, np. sulfasalazyna i azatiopryna²⁹. Anemia zaburza równowagę oksydoredukcyjną poprzez zmniejszenie stężenia enzymów antyoksydacyjnych związanych z erytrocytami, tj. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy i peroksydazy glutationowej (GPx). Enzymy te stanowią główne antyoksydanty komórkowe i pierwszą linię obrony przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem wolnych rodników. W okresie, w którym prowadziłam swoje badania, aktywność SOD, GPx i katalazy w IBD badano wyłącznie w osoczu. Prezentowane wyniki były niejednoznaczne, co najprawdopodobniej wynikało z faktu, że enzymy te w osoczu występują w ilościach śladowych jako izoformy zewnątrzkomórkowe, GPx3 i SOD3, lub przedostają się z erytrocytów w wyniku ich uszkodzenia³⁰. Jedynie o katalazie spekuluje się, że może być ona aktywnie wydzielana z komórek podczas stanu zapalnego. W swojej pracy pt.: *Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment* (I.A.16) jako pierwsza oceniłam aktywność erytrocytarnych izoform SOD (SOD1), GPx (GPx1) i katalazy, wskazując na spadek aktywności GPx1 i katalazy zarówno w chorobie Leśniowskiego-Crohn'a, jak i we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Spadek aktywności enzymów widoczny był wyłącznie u pacjentów w zaostrzeniu choroby i korelował z aktywnością kliniczną choroby Leśniowskiego-Crohn'a i aktywnością kliniczną (GPx1) lub endoskopową (katalaza) wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Współwystępowanie anemii u pacjentów z IBD było niezależnym predyktorem obniżenia aktywności obu enzymów. Co więcej, uwzględniając spadek liczby erytrocytów u pacjentów z IBD, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują na zwiększoną aktywność właściwą SOD1. Nasilenie aktywności produkującej nadtlenek wodoru dysmutazy, przy jednoczesnym spadku aktywności pozostałych enzymów odpowiedzialnych za jego neutralizację, może, ze względu na łatwość dyfundowania H₂O₂ przez błony, przyczyniać się do powstawania rodnika hydroksylowego w reakcji Haber'a-Weiss'a. Rodnik hydroksylowy jest jednym z najsilniejszych znanych utleniaczy w układach biologicznych, szczególnie efektywnym w inicjacji peroksydacji lipidów. Tym samym zaobserwowana

²⁹Gasche et al. *Guidelines on the diagnosis and management of iron deficiency and anemia in inflammatory bowel diseases*. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1545–53

³⁰Rezaie et al. *Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?* *Dig Dis Sci* 2007;52:2015–2021

przeze mnie dysproporcja w aktywnościach SOD1 i GPx1 i katalazy przyczynia się do pogłębienia stresu oksydacyjnego i promuje uszkodzenia makrocząsteczek. Generowany przez dysmutazę nadtlenu wodoru wykazuje dodatkowo funkcje immunomodulatora, chemoatraktanta dla neutrofilów, induktora toczenia się leukocytów, aktywacji limfocytów T oraz angiogenezy²⁷. Ponadto upośledzona aktywność GPx1 czyni pacjentów z IBD wrażliwymi na uszkodzenia wywołane stresem nitrozacyjnym, ponieważ enzym ten ma również właściwości reduktazy nadtlenoazotynu. Tymczasem łagodna forma anemii u pacjentów z IBD nie była dotąd uważana za groźną i nie stanowiła podstawy do interwencji terapeutycznych. Z wyjątkiem najnowszych opracowań, zagadnienie anemii nie pojawiało się nawet w oficjalnych wytycznych dotyczących postępowania w IBD, budząc sprzeciw części środowiska. Jego wyrazem było opracowanie przez zespół ekspertów pod przewodnictwem prof. Gasche²⁹ wytycznych, w których wskazuje się na konieczność diagnostyki anemii w IBD celem określenia jej przyczyny oraz konieczność przynajmniej rozważenia interwencji terapeutycznej, gdy poziom hemoglobiny spada poniżej normy. Autorzy komentują bierność części środowiska w kwestii anemii w IBD stwierdzając wręcz, że „gastroenterolodzy mają tendencję do lepszego znoszenia niskiego poziomu hemoglobiny niż ich pacjenci”²⁹. Prezentując negatywne skutki nawet łagodnej formy anemii w kontekście wydolności antyoksydacyjnej, uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają wagę zagadnienia i wskazują na konieczność monitorowania pacjentów ze współistniejącą anemią celem podjęcia leczenia farmakologicznego. Rzeczywiście, w kolejnej pracy pt.: *Lipid peroxidation markers in Crohn's disease: the associations and diagnostic value* (I.A.23) wykazaliśmy, że aktywnej chorobie Leśniowskiego-Crohn'a towarzyszy akumulacja malonodialdehydu, jednego z głównych produktów peroksydacji lipidów, wprost proporcjonalna do aktywności SOD1 i nasilenia stanu zapalnego wyrażonego stężeniem IL6, a odwrotnie do aktywności katalazy. Co zaskakujące, pacjenci z chorobą Leśniowskiego-Crohn'a mieli obniżony potencjał peroksydacyjny (PP) i stężenie utlenionych LDL (oxLDL). Za te paradoksalne z pozoru wyniki odpowiada najprawdopodobniej szybkie wyczerpywanie się substratów peroksydacji, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w przypadku PP i cholesterolu w przypadku oxLDL, których stężenie w zaostrzeniu choroby Leśniowskiego-Crohn'a jest znacznie obniżone. W pracy oceniliśmy również przydatność oznaczeń MDA jako markera choroby wykazując, że cechuje go większa moc diagnostyczna niż CRP, a jego oznaczenie mogłoby znaleźć, ze względu na wysoką specyficzność, zastosowanie przy wykluczeniu choroby, redukując tym samym konieczność przeprowadzania inwazyjnej i kosztownej diagnostyki.

Prowadzone przez nas badania pozwoliły po raz pierwszy ujawnić, że oprócz obniżonego potencjału antyoksydacyjnego erytrocytów, u pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit w aktywnej fazie choroby spada również aktywności PON1 (*Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis*) (I.A.13). PON1 jest syntetyzowana w wątrobie, ale jelito stanowi prawdopodobnie drugie źródło enzymu w krążeniu. Badania ostatnich lat wskazują, że paraoksonaza ma również aktywność laktanazy, a jej naturalnymi substratami są tiolakton homocysteiny, metabolit odpowiedzialny za toksyczne skutki hiperhomocysteinemii oraz lakton acylowy seryny, czynnik pośredniczący w porozumiewaniu się bakterii Gram-ujemnych, tzw. wyczuwaniu liczebności, czyniąc z PON1 enzym wygaszający (z ang. „quorum quenching”)³¹. PON1 pełni także rolę immunomodulatora i czynnika detoksyfikującego. Mimo, że patogeniza nieswoistych zapaleń jelit pozostaje niewyjaśniona, wiadomo, że kluczową rolę odgrywa interakcja między limfocytami T gospodarza a bakteriami jelitowymi, komensalnymi lub patogennymi. W tym kontekście wygaszanie chemicznych sygnałów o zagęszczeniu bakterii rozpatrywane jest jako potencjalna nowa strategia terapeutyczna. Jej realizacja poprzez stymulację aktywności PON1 mogłaby potencjalnie przynieść również dodatkową korzyść w postaci zmniejszenia ekspresji MCP1, głównej cytokiny rekrutującej monocyty, przyczyniającej się do podtrzymania stanu zapalnego i indukcji procesów włóknienia. W literaturze opisano szereg polimorfizmów PON1, z których najistotniejszy dla funkcji enzymu jest polimorfizm w pozycji 192³². Fenotyp A PON1 (homozygoty z Q w pozycji 192) uważa się za efektywniejszy w przeciwdziałaniu peroksydacji lipidów. Rzeczywiście, u pacjentów z tym fenotypem enzymu zaobserwowaliśmy niższe stężenia markerów peroksydacji lipidów. Jednak to u posiadaczy allelu 192R a nie Q (heterozygoty Q192R oraz homozygoty z 192R) rzadziej obserwuje się występowanie IBD, co sugeruje ochronne działanie fenotypu B PON1 przed rozwojem choroby. Nasze wyniki wskazują na silniejszą odpowiedź zapalną u pacjentów z fenotypem B enzymu. Podobnie jak w przypadku nowotworów górnego odcinka przewodu pokarmowego, poczynione przez nas obserwacje wiążą spadek aktywności PON1 ze stanem odżywienia i występowaniem anemii u pacjentów z IBD.

Cukrzyca typu I oraz otyłość u dzieci

W swojej pracy badawczej zajmowałam się także zagadnieniem stresu oksydacyjnego w cukrzycy typu 1 oraz otyłości u dzieci. Rola stresu oksydacyjnego jest dobrze udokumentowana, szczególnie w

³¹ Khersonsky et al. *Structure–reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase*. *Biochemistry* 2005;44:6371–82

³² La Du et al. *Serum paraoxonase (PON)1 isoenzymes: the quantitative analysis of isoenzymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals*. *Drug Metab Dispos* 2001;29:566–9

rozwoju powikłań cukrzycy³³. Badania ostatnich lat dowodzą jednak, że zaburzenia równowagi oksydo-redukcyjnej mogą przyczyniać się również do wystąpienia choroby. Z tego względu coraz częściej postuluje się wprowadzenie markerów stresu oksydacyjnego do panelu badań wykonywanych przy ocenie i monitorowaniu pacjentów z cukrzycą typu 1. Peroksydacja lipidów, wyrażana przez nagromadzenie malonodialdehydu, jest najczęściej ocenianą manifestacją stresu oksydacyjnego. Jednakże uzyskane przez nas wyniki, przedstawione w pracy pt.: *Diagnostic potential of oxidative stress markers in children and adolescents with type 1 diabetes* (I.A.6), wskazują na wczesne wyczerpywanie się potencjału antyoksydacyjnego (TAS), któremu towarzyszy stopniowa akumulacja białkowych markerów stresu oksydacyjnego (AOPP), natomiast warunkiem znamiennej akumulacji MDA jest dopiero brak wyrównania cukrzycy. W przeciwieństwie do MDA moc diagnostyczna AOPP i TAS jako markerów DM1 była wysoka. Stopień akumulacji AOPP i MDA odzwierciedlał z kolei wyrównanie cukrzycy, lecz czułość i specyficzność obu markerów jako indykatorów wyrównania cukrzycy była zbyt mała, żeby mogły one znaleźć zastosowanie w monitorowaniu choroby. Co interesujące, zaobserwowaliśmy znamienne nagromadzenie AOPP, a obniżenie potencjału antyoksydacyjnego u rodzeństwa dzieci z cukrzycą typu 1. Obserwacje te wpisują się w poruszane wcześniej w literaturze zagadnienie rodzinnej predyspozycji do cukrzycy typu 1, której jednym z elementów fenotypowych jest zaburzenie równowagi oksydoredukcyjnej³⁴. Co więcej, w dalszych badaniach (*Trace elements, magnesium, and the efficacy of antioxidant systems in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings*) (I.A.27), zarówno u dzieci z cukrzycą typu I jak i ich rodzeństwa, zaobserwowaliśmy zmiany w erytrocytarnym systemie antyoksydacyjnym - spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej a wzrost aktywności katalazy - oraz spadek stężenia cynku, antyutleniacza chroniącego grupy sulfhydrylowe białek i kofaktora dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)-1. Zgodnie z deklarowanym wpływem diety ubogomagnezowej na rozwój cukrzycy poprzez indukcję odpowiedzi zapalnej i stresu oksydacyjnego, dzieci z cukrzycą typu 1, lecz już nie ich rodzeństwo, miały obniżony poziom magnezu w surowicy krwi. Natomiast stężenie miedzi, metalu podobnie jak żelaza zaangażowanego w indukcję peroksydacji lipidów, było znamienne wyższe, przyczyniając się do tworzenia prooksydacyjnego środowiska w krwi dzieci z cukrzycą typu I.

Gwałtowny rozwój otyłości w ostatnich latach spowodował, że jest ona nazywana epidemią XXI wieku. Otyłość, której towarzyszy chroniczny stan zapalny i stres oksydacyjny, nie tylko bardzo pogarsza jakość życia, ale i przyczynia się do rozwoju powikłań otyłości w postaci nadciśnienia, hiperlipidemii,

³³Valko et al. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:44–84

³⁴Matteucci et al. *Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients*. Diabetes Care 2000;23:1182–6

insulinooporności, zespołu metabolicznego, stłuszczenia wątroby, policystycznych jajników i bezpłodności, cukrzycy, chorób sercowo-naczyniowych a nawet raka³⁵. Mimo coraz większej świadomości społecznej dotyczącej negatywnych skutków otyłości, Polska wymieniana jest wśród krajów, w których odsetek dzieci i młodzieży z nadwagą czy otyłością rośnie najszybciej³⁶. Według danych Unii Europejskiej z roku 2005³⁶, mieliśmy też najwyższy na świecie odsetek 11-latków z nadwagą. Próg wiekowy, w którym dzieci stają się otyłe, stale się obniża. Jedynie u ok. 5% nadmierna masa ciała wynika z zaburzeń hormonalnych, czy jest uwarunkowana przyjmowaniem leków, a w pozostałych 95% przypadków jest skutkiem nadmiernej podaży kalorii, skojarzonej z niewystarczającą aktywnością fizyczną. We współpracy z Katedrą Endokrynologii i Diabetologii Dzieci i Młodzieży oraz Katedrą Bromatologii naszego Uniwersytetu Medycznego badałam wpływ zmiany trybu życia i diety niskokalorycznej u dzieci z otyłością, połączonej u niektórych pacjentów z suplementacją otrębami lub leczeniem insulinooporności metforminą, na parametry stresu oksydacyjnego i wybrane białka związane z metabolizmem lipidów.

Pomimo że kwas moczowy należy do niskocząsteczkowych antyoksydantów osocza, hiperurykemia okazuje się być czynnikiem ryzyka rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy typu 2 oraz niektórych z jej powikłań i często poprzedza wystąpienie insulinooporności, nadciśnienia i otyłości. W swojej pracy, zatytułowanej *Gender-specific association of serum uric acid with metabolic syndrome and its components in juvenile obesity* (I.A.18), zwróciłam uwagę na aspekt zróżnicowania zależności między stężeniem kwasu moczowego a zespołem metabolicznym i jego komponentami w zależności od płci. Dimorfizm płciowy manifestuje się między innymi różnicami ilościowymi (większa zawartość tłuszczu u kobiet) i jakościowymi (przewaga podskórnej tkanki tłuszczowej u kobiet) w tkance tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa pełni rolę organu endokrynnego, a jej funkcja, ekspresja genów czy aktywność metaboliczna, jest zróżnicowana w zależności od depozytu, i tak, np. tkanka tłuszczowa trzewna jest szczególnie aktywna w uwalnianiu do krążenia wolnych kwasów tłuszczowych i adipokin³⁷. W konsekwencji również charakter zaburzeń w zespole metabolicznym różni się w zależności od płci, m.in. u kobiet częściej występuje nadciśnienie tętnicze, a powiązania między zespołem metabolicznym i wskaźnikami aterogenności są ściślejsze. Co więcej, hormony żeńskie i męskie w odmienny sposób wpływają na ekspresję genów, m.in. testosteron hamuje ekspresję adipocytarnego białka wiążącego kwasy tłuszczowe (A-FABP). Prowadzone przeze mnie badania wpisują się w ten nurt, wskazując na ściślejsze powiązanie hiperurykemii z zespołem

³⁵ Vincent et al. *Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans*. Int J Obes 2006;30:400–18

³⁶ EU platform on diet, physical activity and health. International Obesity Task Force EU Platform briefing paper, Bruksela; 2005.

³⁷ Siemińska L. *Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych*. Endokrynol Pol 2007;58:330–42

metabolicznym u dziewcząt niż u chłopców. U chłopców stężenie kwasu moczowego zależało wyłącznie od indeksów otyłości, zarówno ogólnej (BMI), jak i trzewnej (obwód pasa) a hiperurykemia nie była predyktorem żadnego z zaburzeń wchodzących w skład zespołu metabolicznego. Tymczasem u dziewcząt, oprócz wskaźników masy ciała, stężenie kwasu moczowego korespondowało z parametrami gospodarki węglowodanowej: stężeniem glukozy, C-peptydu, insuliny i z HOMA oraz poziomem triglicerydów. W analizie wieloczynnikowej, po uwzględnieniu innych komponent zespołu metabolicznego i insulinooporności, hiperurykemia była niezależnym predyktorem otyłości i nadciśnienia tętniczego. Tradycyjnie hiperurykemia uważana była za konsekwencję hiperinsulinizmu i insulinooporności, które prowadziły do zmniejszonego wydalania kwasu moczowego przez nerki. Badania ostatnich lat wskazują jednak na udział hiperurykemii w patogenezie tych zaburzeń i proponują mechanizm polegający na zmniejszaniu przez kwas moczowy biodostępności tlenu azotu³⁸. Uważa się, że negatywny wpływ na syntezę tlenu azotu oraz aktywacja układu renina-angiotensyna mogą odpowiadać za związek między hiperurykemią a nadciśnieniem tętniczym. Rzeczywiście, wyniki uzyskane przeze mnie wskazują na niezależność związku między stężeniem kwasu moczowego a nadciśnieniem tętniczym od hiperinsulinizmu czy insulinooporności. Różnice wynikające z płci zaobserwowałam również w przypadku paraoksonazy (*Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress*) (I.A.25). Nadwaga i otyłość związana była ze znamienym spadkiem aktywności PON1 wyłącznie u dziewcząt. Obniżenie aktywności enzymu towarzyszyło również nadciśnieniu tętniczemu i hiperinsulinizmowi, ale to otyłość brzuszna była niezależnym predyktorem aktywności PON1. Natomiast spadek aktywności PON1 obserwowany w grupie chłopców z nadwagą czy otyłością nie był znamienym, jednak aktywność enzymu była odwrotnie zależna od nasilenia stanu zapalnego wyrażonego stężeniem CRP, co pozostaje w zgodzie z demonstrowanym spadkiem ilości transkryptów dla PON1 w hepatocytach stymulowanych CRP lub cytokinami prozapalnymi.

Wszechobecność syropów glukozy-fruktozowych w produktach spożywczych, szczególnie w napojach gazowanych, przyczynia się do wzrostu stężenia kwasu moczowego u dzieci i młodzieży³⁹. Hiperurykemia jest czynnikiem potencjalnie modyfikowalnym, a interwencje oparte na farmakologicznym obniżeniu poziomu kwasu moczowego okazały się skuteczne w obniżeniu ciśnienia, zmniejszeniu ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i zwolnieniu postępu przewlekłej niewydolności nerek (chronic kidney disease, CKD) u osób dorosłych³⁸. W swojej pracy (*The effect of a one-year weight reduction program on serum*

³⁸ Feig et al. *Serum uric acid: a risk factor and a target for treatment?* J Am Soc Nephrol 2006;17:S69–73

³⁹ Khitan et al. *Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension.* J Nutr Met 2013; Article ID 682673

uric acid in overweight/obese children and adolescents) (I.A.19) jako pierwsza oceniałam skuteczność długoterminowego programu odchudzającego, opartego na diecie niskokalorycznej skojarzonej z modyfikacją trybu życia i zwiększonym wysiłkiem fizycznym, w redukcji kwasu moczowego u dzieci i młodzieży z nadwagą lub otyłością. Zaobserwowałam spadek stężenia kwasu moczowego, który nie był uwarunkowany uratą masy ciała. Ta obserwacja jest bardzo istotna i krzepiąca, ze względu na niższą skuteczność długoterminowych programów odchudzania w redukcji masy ciała w porównaniu z programami krótkoterminowymi. Wynika to z faktu, że dzieci pozostają wśród osób i w środowisku, które przyczyniło się do ich otyłości. Około 80% matek często nie dostrzega nadwagi lub otyłości u swoich dzieci, bądź traktuje je jako wykładnik dobrego stanu odżywienia⁴⁰. Z drugiej strony, w świadomości wielu ludzi funkcjonuje pogląd, że otyłość jest cechą dziedziczną, którą trudno zmienić. Programy długoterminowe nie są prowadzone w warunkach kontrolowanych i wiele zależy od zdyscyplinowania i determinacji uczestników. Nasze wyniki, zarówno dotyczące kwasu moczowego, jak i innych, przedstawionych w dalszej części parametrów, wskazują, że już niewielkie modyfikacje trybu życia są wystarczające dla normalizacji parametrów stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego. W przypadku kwasu moczowego, do obniżenia jego poziomu przyczyniło się najprawdopodobniej zmniejszenie spożycia czerwonego mięsa – źródła puryn, w wyniku rozkładu których powstaje kwas moczowy – oraz napojów słodzonych syropem glukozowo-fruktozowym. Fruktaza przyczynia się do wzrostu stężenia kwasu moczowego we krwi, zwiększając jego syntezę a hamując wydalanie³⁹. Fruktaza jest w hepatocytach fosforylowana przez fosfofruktokinazę do fruktozo-1-fosforanu kosztem ATP, a aktywność enzymu nie podlega hamowaniu zwrotnemu. Powstający w wyniku reakcji ADP jest dalej degradowany do kwasu moczowego, ponieważ fruktoza indukuje również deaminazę AMP. Z drugiej strony, wyindukowana fruktozą hiperurykemia powoduje zmniejszenie biodostępności tlenu azotu, wazokonstrykcję naczyń nerkowych i w konsekwencji zmniejszenie wydalania kwasu moczowego z moczem. Co więcej, kwas mlekowy powstający w wyniku metabolizmu glukozy konkuruje o transport z kwasem moczowym, w dalszym stopniu upośledzając jego wydalanie. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że redukcja stężenia kwasu moczowego u dziewcząt dodatnio koreluje ze zmianami w indeksach otyłości i z normalizacją parametrów gospodarki węglowodanowej. Metformina, lek poprawiający insulinowrażliwość komórek obwodowych, wspomagał redukcję stężenia kwasu moczowego, a w przypadku chłopców, jedynie w tej grupie redukcja stężenia kwasu moczowego była statystycznie istotna.

⁴⁰Baughcum et al. *Maternal perceptions of overweight preschool children*. Pediatrics 2000;106:1380–6

W pracy *Advanced oxidation protein products (AOPPs) in juvenile overweight and obesity prior to and following weight reduction* (I.A.5) jako pierwsza ujawniłam, że otyłości brzusznej i zespołowi metabolicznemu u dzieci i młodzieży towarzyszy akumulacja AOPP. Modyfikacja trybu życia, nawet bez wyraźnego spadku masy ciała, była efektywna w jej zmniejszeniu. Szczególnie efektywna w zmniejszeniu stężenia AOPP okazała się suplementacja diety otrębami. Uważa się, że otręby korzystnie wpływają na profil lipidowy i redukują masę ciała. Uzyskane przeze mnie wyniki zdają się potwierdzać własności antyoksydacyjne i zdolność do łagodzenia stresu oksydacyjnego przypisywane otrębom, przemawiając za włączeniem suplementacji otrębami do rekomendacji żywieniowych dzieci z nadwagą lub otyłością. Zmniejszenie akumulacji AOPP obserwowałam także u dzieci leczonych metforminą. Metforminie przypisuje się również własności antyoksydacyjne⁴¹. Wykazano bowiem, że zmniejsza ona produkcję reaktywnych form tlenu przez komórki śródbłonna i zwiększa wydolność erytrocytarnego systemu antyoksydacyjnego. Metformina hamuje także ekspresję RAGE, receptorów zaawansowanych produktów glikacji (AGE), które uczestniczą w przekazywaniu sygnału niesionego przez AOPP.

Przypuszcza się, że adipocytarne białko wiążące kwasy tłuszczowe (AFABP) integruje odpowiedź zapalną i metaboliczną w otyłości, przyczyniając się do pojawienia jej powikłań⁴². Uważa się, że może stanowić ono atrakcyjny cel farmakoterapii w otyłości, cukrzycy typu 2 i miażdżycy, a jego poziom w krążeniu jest dobrym markerem predykcyjnym zespołu metabolicznego. W literaturze brakowało jednak danych dotyczących AFABP u dzieci. W pracy *Circulating adipocyte fatty acid-binding protein, juvenile obesity, and metabolic syndrome* (I.A.21) wykazałam wzrost stężenia AFABP w surowicy dzieci z nadwagą i otyłością oraz wskazałam na różnice w zależnościach wynikające z płci. Wzrost stężenia AFABP w krążeniu u dziewcząt był wprost proporcjonalny do wykładników otyłości ogólnej (BMI) i brzusznej (obwód pasa). Zależał również od profilu lipidowego, stężenia insuliny oraz indeksu insulinooporności (HOMA), a więc ściśle wiązał się z zaburzeniami metabolicznymi, definiującymi lub towarzyszącymi zespołowi metabolicznemu. Natomiast u chłopców nie zaobserwowałam zależności między wzrostem AFABP a parametrami zespołu metabolicznego. Wzrost stężenia AFABP we krwi wiązał się raczej z nasileniem stanu zapalnego i stężeniem leptyny. Modyfikacja trybu życia skutkowałą spadkiem stężenia AFABP, który jedynie u dziewcząt był powiązany ze zmianą wskaźników BMI.

⁴¹Vincent et al. *Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity*. *Diabetes. Obes Metab* 2007;9:813–39.

⁴²Erbay et al. *Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins in metabolic syndrome*. *Curr AtherosclerRep* 2007;9:222 – 9

Wisfatyna, adipocytokina o własnościach enzymatycznych fosforybozylotransferazy nikotynamidu (NAMPT), podobnie jak AFABP, łączy odpowiedź zapalną z zaburzeniami metabolicznymi, towarzyszącymi otyłości⁴³. Jednak dane literaturowe odnośnie wisfatyny we krwi nie były jednoznaczne ze względu na stosowanie niespecyficznych testów immunoenzymatycznych wykrywających nieznane wielkocząsteczkowe białko zamiast wisfatyny⁴⁴. Wykorzystując specyficzny test, w swojej pracy pt.: *Visfatin in juvenile obesity - the effect of obesity intervention and sex* (I.A.20) po raz pierwszy wykazałam wzrost stężenia wisfatyny w otyłości brzusznej, hiperinsulinemii i insulinooporności u dzieci i młodzieży. Ponieważ wisfatyna poprawia insulinowrażliwość komórek obwodowych, jej wysokie stężenia w insulinooporności mogą sugerować oporność komórek na działanie wisfatyny na podobieństwo niewrażliwości na działanie leptyny (leptynooporność). Podobnie jak w przypadku AFABP, zaobserwowałam związane z płcią różnice – podczas gdy u dziewcząt stężenie wisfatyny korespondowało ze stężeniem leptyny, co może wskazywać na podskórną tkankę tłuszczową jako główne źródło wisfatyny w krążeniu (leptyna jest produkowana głównie tam i dobrze odzwierciedla całkowitą masę tłuszczową), to u chłopców wisfatyna korespondowała raczej z WBISI, indeksem bazującym na teście obciążenia glukozą, który lepiej niż HOMA odzwierciedla insulinooporność komórek obwodowych oraz ze wskaźnikami stanu zapalnego (IL6) i stresu oksydacyjnego (MDA). Dieta i modyfikacja trybu życia przyczyniła się do normalizacji poziomu wisfatyny, bez różnic w zależności od typu interwencji.

Badania spoza głównego nurtu badawczego

Podczas swojej pracy badawczej uczestniczyłam również w szeregu innych projektów. Wraz z dr Małgorzatą Matusiewicz, we współpracy z Ohio State University, Ohio, USA, opracowywałyśmy metody izolacji i oczyszczania oraz analizowałyśmy własności enzymu arylsulfatazy z liścionoga *Artemia salina* (*Characterization of arylsulfatase activity in brine shrimp, Artemia salina**) (I.A.2). Opracowany przez nas test do oceny aktywności enzymu w płynach ustrojowych uzyskał patent RP nr 199466 „Sposób oznaczania aktywności arylsulfatazy”. Metoda została wykorzystana do oceny aktywności sulfatazowej w surowicy pacjentów z nowotworami jelita grubego (*Serum sulfatase activity is more elevated in colonic adenomas than cancers*) (I.A.11). Sulfatazy, poprzez usunięcie grubo siarczanowej z proteoglikanów, inicjują proces przebudowy i degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, kluczowy dla angiogenezy

⁴³Chang et al. *The relationship of visfatin / pre-B-cell colony-enhancing factor / nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids*. *Metabolism* 2010;59:93–9

⁴⁴Korner et al. *Molecular characteristics of serum visfatin and differential detection by immunoassays*. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4783–91

* Praca ukazała się przed obroną pracy doktorskiej

nowotworowej. Indukowane przez sulfatazy modyfikacje proteoglikanów prowadzą również do zmian aktywności szlaków przekazywania sygnałów, szczególnie szlaku Wnt/APC/ β -katenina, przyczyniając się do promocji wzrostu guzów nowotworowych, angiogenezy, inwazji i przerzutowania. Uzyskane przez nas wyniki sugerują zaangażowanie sulfataz we wczesne etapy nowotworzenia – aktywność sulfatazowa surowicy była największa u pacjentów z polipami jelita grubego i wprost proporcjonalna do ich ilości, a malała wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej i wielkością guza pierwotnego.

Uczestniczyłam również w badaniach *ex vivo* prowadzonych przez Katedrę i Klinikę Chorób Wewnętrznych, Geriatrii i Alergologii dotyczących udziału neutrofilii w patogenezie chorób alergicznych jako alternatywnych komórek docelowych, co zaowocowało opracowaniem pt.: *Uwalnianie mieloperoksydazy przez neutrofile pod wpływem wybranych alergenów zewnątrzpochoźnych** (I.B.1) oraz w projekcie Katedry i Kliniki Chirurgii Szcękowej dotyczącym oceny potencjału osteoindukcyjnego i możliwości wykorzystania białek morfogenetycznych kości (BMP) w rekonstrukcjach kostnych i leczeniu złamań i innych defektów kostnych (*Perspectives of Clinical Application of Bone Morphogenetic Proteins in Children***) (I.A.1). Praca przy tym projekcie zaowocowała również zgłoszeniem patentowym dotyczącym metody oznaczania BMP pt.: „Sposób immunologicznej detekcji wołowego białka morfogenetycznego kości” (nr P375947).

Mój dorobek w dziedzinie sepsy uzupełnia praca *Quantitative indices of dynamics in concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as prognostic factors in severe sepsis/septic shock patients--comparison with CRP and procalcitonin* (I.A.17), przygotowana we współpracy z II Katedrą i Kliniką Anestezjologii i Intensywnej Terapii, w której oceniamy wartość diagnostyczną i predykcyjną dynamiki zmian mediatorów sepsy, wyrażoną za pomocą wskaźników ilościowych, m.in. indeksów łańcuchowych. Z kolei uzupełnieniem moich zainteresowań biologią nowotworów jest udział w projektach dotyczących terapii fotodynamicznej, prowadzonych we współpracy z Katedrą Patomorfologii naszego Uniwersytetu, co zaowocowało współautorstwem prac: *In vitro and in vivo matrix metalloproteinase expression after photodynamic therapy with a liposomal formulation of aminolevulinic acid and its methyl ester* (I.A.14) oraz *Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells* (I.A.26). Natomiast dopełnieniem dorobku w zakresie wskaźników biochemicznych w chorobach jelit są prace dotyczące metaloproteinaz: powstała we współpracy z II Katedrą i Kliniką Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia praca pt.: *Correlation of MMP-3 and MMP-9 with Crohn's Disease Activity in Children* (I.A.24)

oraz powstała we współpracy z Katedrą Gastroenterologii i Hepatologii praca *Matrix metalloproteinase-9 - its interplay with angiogenic factors in inflammatory bowel disease* (I.A.28), a także praca dotycząca wahań poziomu serotoniny u pacjentów z uchyłkowatością jelita grubego pt.: *Plasma serotonin level in left-sided colonic diverticulosis: a pilot study* (I.A.22).

Aktualnie prowadzone badania i plany naukowe

Aktualnie prowadzone przeze mnie badania koncentrują się na znaczeniu midkiny w patogenezie i rozwoju raka jelita grubego oraz nieswoistych zapaleń jelit i obejmują ocenę ekspresji na poziomie mRNA i białka w tkance jelit - prawidłowej, zapalnej i nowotworowej – oraz w leukocytach krwi obwodowej, a także badania *in vitro* na liniach gruczolakoraka jelita grubego (Caco-2, DLD1, Lovo, HT29, HCT116, SW480 i SW620) oraz na komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych pozyskanych z jelita (HIMEC). Badania ekspresji midkiny na poziomie mRNA rozpoczęłam od oceny stabilności ekspresji szeregu genów referencyjnych. PCR w czasie rzeczywistym jest narzędziem pozwalającym na detekcję nawet niewielkich zmian w ekspresji genów. Warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników jest jednak zastosowanie stabilnie ekspresjonowanych genów referencyjnych. W dotychczasowych badaniach PCR stosowano normalizację do genów typu *GAPDH*, *ACTB* czy *BM*, których ekspresja okazuje się jednak podlegać regulacji, dyskwalifikując ich wykorzystanie w czułych badaniach RT-qPCR. W swojej pracy *Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies* (I.A.29) zaproponowałam geny o względnie stabilnej ekspresji, które mogą być wykorzystywane jako normalizatory przy ocenie ekspresji genów badanych w tkankach prawidłowych, zapalnych i nowotworowych, pochodzących od pacjentów z nieswoistymi zapaleniami jelit lub z nowotworem jelita grubego. Kontynuując badania nad genami referencyjnymi dowiodłam, na przykładzie nowotworowych linii jelitowych, że silnym modulatorem ich ekspresji jest zmienna dostępność środków odżywczych, czyniąc wiele z aktualnie wykorzystywanych normalizatorów niewiarygodnymi w badaniach *in vitro* obejmujących manipulację dostępnością surowicy (praca w recenzji). Zaburzenia dostępności środków odżywczych to zjawisko często występujące *in vivo* w guzach nowotworowych jako skutek utrudnionego dopływu krwi. W swoich aktualnie prowadzonych badaniach wykazałam również, że naprzemienne głodzenie i resuplementacja komórek nowotworowych jest, podobnie jak hipoksja, silnym modulatorem ekspresji i sekrecji czynników angiogennych (manuskrypt w przygotowaniu).

Dotychczas uzyskane przeze mnie wyniki badań nad rolą midkiny w chorobach jelit wskazują, że podlega ona ekspresji w prawidłowej tkance jelita tak cienkiego, jak i grubego. Ekspresja midkiny w jelicie grubym podlega dalszej indukcji pod wpływem stanu zapalnego, z tendencją do silniejszej nadekspresji w przypadku zapalenia w przebiegu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego niż choroby Leśniowskiego-Crohn'a. Indukcja ekspresji na poziomie mRNA jest niższa niż na poziomie białka, co sugeruje zaangażowanie mechanizmów potranslacyjnych i/lub magazynowanie zsyntetyzowanego białka w macierzy zewnątrzkomórkowej. Ekspresja midkiny w krwi pełnej jest natomiast niska. Stężenie midkiny w surowicy krwi pozostaje wysokie w okresie pooperacyjnym, a normalizuje się u pacjentów badanych po 30 dniach od operacji. Wyniki prowadzonych przeze mnie badań *in vitro* wskazują, że midkina, odmiennie niż w przypadku raka trzustki i żołądka, nie wpływa stymulująco na wzrost komórek jelit, pozostając bądź obojętną, bądź wręcz hamując ich wzrost nawet o 60%. Na poziomie molekularnym, hamującemu wpływowi midkiny towarzyszy obniżenie poziomu ekspresji markerów proliferacji: *Ki67* i *PCNA* oraz nasilenie ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego *CDKN1A* (p21) i *TP53* (p53). Analiza ekspresji innych regulatorów cyklu komórkowego, wskazanych w raku trzustki jako indukowanych nadekspresją midkiny, tj. kinaz zależnych od cyklin (CDK)-2, 4 i 6 oraz cyklin D1 i A1 wykazała, że stymulacja egzogenną midkiną hamuje ekspresję szczególnie *CDK6*, a w mniejszym stopniu również *CDK2* i 4 oraz *CCND1* (cykliny D1). Uważa się, że pronowotworowe działanie midkiny związane jest przede wszystkim z promocją angiogenezy. Uzyskane przeze mnie wyniki sugerują raczej działanie pośrednie, ponieważ midkina nie stymuluje proliferacji komórek śródbłonka naczyń krwionośnych jelit (HIMECs), wpływa natomiast pozytywnie na sekrecję i ekspresję innych, kluczowych czynników angiogennych, tj. angiopoetyny-1, VEGF-A, IL-8, FGF2 i PDGF-BB (praca w recenzji).

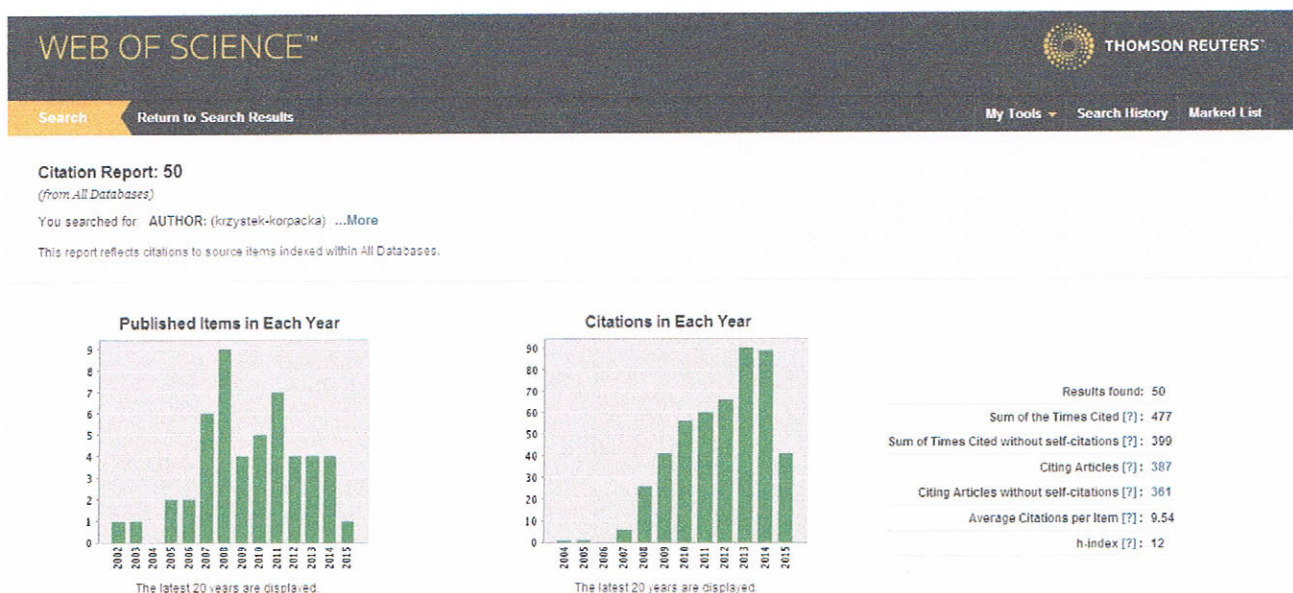
Kontynuując tematykę chorób jelit, we współpracy z Kliniką i Katedrą Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN oraz Dolnośląskim Centrum Onkologicznym, biorę udział w badaniach immunologicznych, *in vitro* i z zakresu biologii molekularnej nad rolą plejotrofiny, siostrzanego białka midkiny oraz adipokinami wisfatyną i chimeryną w patogenezie i rozwoju nieswoistych zapaleń jelit oraz raka jelita grubego. Wyniki uzyskane dotychczas wskazują na nadekspresję wisfatyny w guzach nowotworowych jelita grubego, zarówno na poziomie białka, jak i mRNA, którym towarzyszy wzrost stężenia wisfatyny w krążeniu. Zaobserwowana przez nas nadekspresja wiąże się przede wszystkim z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Wisfatyna silnie koreluje z ekspresją czynnika transkrypcyjnego indukowanego hipoksją (HIF1 α) oraz

ekspresją i stężeniem czynników prozapalnych i angiogennych. Wyniki badań *in vitro* potwierdzają wpływ hipoksji i wskazują na zmienność dostępności składników odżywczych jako kolejny czynnik modulujący poziom ekspresji wisfatyny. Stymulacja endogenną wisfatyną nie promuje wzrostu komórek nowotworowych jelita grubego. Badania nad wisfatyną zaowocowały jak dotąd pracami: *Visfatin and other adipocytokines in inflammatory bowel disease* (III.A.1) oraz *Nampt/PBEF/visfatin up-regulation in colorectal tumors, mirrored in normal tissue and whole blood of colorectal cancer patients, is associated with metastasis, hypoxia, IL16, and anemia* (I.A.30). Wykorzystując techniki spektroskopii mas, badamy w nieswoistych zapaleniach jelit i raku jelita grubego również argininę i związki pokrewne (asymetryczną i symetryczną dimetyloargininę, cytrulinę, dimetyloaminę), zaangażowane w regulację syntezy tlenku azotu i funkcję śródbłonna oraz hepcydynę, główny hormon regulujący gospodarkę żelazem. We współpracy z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym we Wrocławiu, w ramach Zintegrowanego Centrum Medycyny Naczyniowej „Wrovasc”, programu współfinansowanego przez Unię Europejską, oceniam różnice w odpowiedzi zapalnej, immunologicznej i angiogennej oraz ekspresji alarmin (markerów uszkodzenia tkanek) i ich receptorów, a także zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej i funkcji śródbłonna, wywołane zabiegami chirurgicznymi resekcji guzów jelita grubego przeprowadzonymi metodami tradycyjnymi lub za pośrednictwem robota da Vinci. Dotychczas uzyskane przeze mnie wyniki wskazują m.in. na stale rosnący w okresie pooperacyjnym poziom IL-7 przy operacjach obrotowych, lecz nie operacjach klasycznych, co, biorąc pod uwagę funkcję IL-7 w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, szczególnie odpowiedzi antynowotworowej, może przekładać się na mniejsze ryzyko wznowy procesu nowotworowego u pacjentów poddawanych operacjom robotowym (publikacja w opracowaniu). Równolegle, w ramach wspomnianego programu Wrovasc, prowadzę podobne badania dotyczące oceny zaburzeń równowagi oksydoredukcyjnej i funkcji śródbłonna, odpowiedzi zapalnej, immunologicznej i angiogennej, akumulacji zaawansowanych produktów glikacji oraz ekspresji alarmin i ich receptorów - w zakresie chorób naczyń i ich powikłań w postaci ran przewlekłych oraz aspektu naczyniowego stwardnienia rozsianego. Moje zainteresowania naukowe dotyczą również związków stresu oksydacyjnego i szeroko pojętego stanu zapalnego z chorobami otępiennymi i schizofrenią. Badania w tym zakresie prowadzę we współpracy z Katedrą i Kliniką Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego oraz Ośrodkiem Alzheimerowskim w Ścinawie.

6. Podsumowanie dorobku naukowego

Mój dorobek obejmuje 46 pełnotekstowych prac oryginalnych: 38 z IF (w 26 jako pierwszy autor, w dwóch jako ostatni autor) i ośmiu bez IF (w sześciu jako pierwszy autor a w jednej jako ostatni). Jestem również autorką trzech prac poglądowych (jednej z IF, dwóch bez IF), jednego rozdziału w książce (wydawnictwo międzynarodowe) i dziewięciu skryptów dla studentów (w tym czterech w j. angielskim), 71 abstraktów konferencyjnych: 38 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych a 33 na konferencjach krajowych) i jednego wykładu konferencyjnego „Wskaźniki biochemiczne w nieswoistych zapaleniach jelit” wygłoszonego na XI Wrocławskiej Wiośnie Gastroenterologicznej, 20 kwietnia 2007 r.

Całkowita liczba punktów MNiSW/KBN mojego dorobku wynosi **1066** (w tym 228 w cyklu stanowiącym osiągnięcie). Sumaryczny IF wg *Journal Citation Reports (JCR)*: **93,271** (w tym 23.435 w cyklu stanowiącym osiągnięcie). Liczba cytowań wg bazy *Web of Science* (dane z 13.06.2015): **477** z autocytowaniami/**399** bez autocytowań. Średnia liczba cytowań na pracę: **9.54**. Indeks Hirscha: **12**.



Małgorzata
Krzystek-Korpacka