

AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

dr n. med. Marcin Frączek

Katedra i Klinika Otolaryngologii Chirurgii Głowy i Szyi
Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Wrocław 2017

1. Imię i Nazwisko: Marcin Frączek

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

2000 – dyplom lekarza; Wydział Lekarski Akademii Medycznej we Wrocławiu

2005 – stopień doktora nauk medycznych; Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ekspresja białek regulacyjnych cyklu komórkowego fazy G1, G1/S i S w raku krtani”

2008 tytuł specjalisty otorynolaryngologa

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

Zatrudnienie akademickie

2007 - 2009 asystent w Katedrze i Klinice Otolaryngologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

2009 - obecnie, adiunkt w Katedrze i Klinice Otolaryngologii Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

Zatrudnienie szpitalne

2000 - 2001 Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 3 we Wrocławiu – Lekarz stażysta

2002 - 2008 Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 1, Klinika Otolaryngologii Akademii Medycznej we Wrocławiu – Lekarz rezydent

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

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl 8 publikacji o łącznej punktacji:

IF = 9,032

pkt. MNiSW/KBN = 148,0

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

„Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych – wybrane aspekty patogenezy, diagnostyki i leczenia”

b) autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy:

1. **Marcin Frączek**, Maciej Guziński, Monika Morawska-Kochman, Kamil Henryk Nelke, Tomasz Kręcicki.: Nasal endoscopy: an adjunct to patient selection for preoperative low-dose CT examination in chronic rhinosinusitis. *Dentomaxillofac. Radiol.* 2016 Vol.45 no.5; art.20160173
IF: 1.919; Pkt. MNiSW/KBN: 30.000
2. **Marcin Frączek**, Maciej Guziński, Monika Morawska-Kochman, Tomasz Kręcicki.: Investigation of sinonasal anatomy via low-dose multidetector CT examination in chronic rhinosinusitis patients with higher risk for perioperative complications. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 2017 Vol.274 no.2; s.787-793
IF: 1.627; Pkt. MNiSW/KBN: 25.000
3. **Marcin Frączek**, Beata Rostkowska-Nadolska, Małgorzata Kapral, Justyna Szota, Tomasz Kręcicki, Urszula Mazurek.: Microarray analysis of NF-kappa B-dependent genes in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2013 Vol.22 no.2; s.209-217
IF: 0.333; Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
4. Beata Nadolska, **Marcin Frączek**, Tomasz Kręcicki, Maja Kocięba, Michał Zimecki.: Lactoferrin inhibits the growth of nasal polyp fibroblasts. *Pharmacol. Rep.* 2010 Vol.62 no.6; s. 1139-1147
IF: 2.500; Pkt. MNiSW/KBN: 20.000
5. **Marcin Frączek**, Beata Rostkowska-Nadolska, Elektra Sliupkas-Dyrda, Dariusz Kuśmierz, Jakub Pniak, Małgorzata T. Latocha.: The influence of vitamin D derivatives on the expression of apoptotic genes in nasal polyp fibroblasts. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2010 Vol.19 no.6; s.679-684
IF: 0.103; Pkt. MNiSW/KBN: 13.000
6. **Marcin Frączek**, Dariusz Kuśmierz, Beata Rostkowska-Nadolska, Andrzej Kutner, Małgorzata T. Latocha.: Antiproliferative and cytotoxic effect of selected vitamin D analogs on nasal polyps fibroblasts and other cells with higher proliferative potential. *Acta Pol. Pharm.* 2015 Vol.72 no.5; s.923-929
IF: 0.877; Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
7. **Marcin Frączek**, Beata Rostkowska-Nadolska, Dariusz Kuśmierz, Aleksandra Zielińska, J. Rok, Elektra Sliupkas-Dyrda, Alicja Grzanka, Tomasz Kręcicki, Małgorzata T. Latocha.: Vitamin D analogs decrease in vitro secretion of RANTES and enhance the effect of budesonide. *Adv. Med. Sci.* 2012 Vol.57 no.2; s.290-295
IF: 0.796; Pkt. MNiSW/KBN: 15.000
8. **Marcin Frączek**, Dariusz Kuśmierz, Beata Rostkowska-Nadolska, Tomasz Kręcicki, Małgorzata T. Latocha.: Impact of genistein and phytic acid on the viability and proliferation activity of nasal polyps' cells in an in vitro model. *Acta Pol. Pharm.* 2015 Vol.72 no.4; s.719-725
IF: 0.877; Pkt. MNiSW/KBN: 15.000

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

Przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP) jest chorobą błony śluzowej jamy nosa i zatok przynosowych, która bardzo istotnie obniża jakość życia około 10% mieszkańców krajów rozwiniętych. Etiopatogeneza tego schorzenia jest wieloczynnikowa i wciąż nie w pełni wyjaśniona. Na rozwój stanu zapalnego w zatokach przynosowych wpływają zaburzenia miejscowej homeostazy błony śluzowej, kolonizacja bakterii, grzybów, alergię, czynniki nerwowo-naczyniowe, słabo poznane zaburzenia wrodzonego układu odpornościowego itd.

W związku z faktem, że etiologia przewlekłego zapalenia zatok pozostaje niejasna nie opracowano skutecznych metod leczenia tego schorzenia. Obecne metody leczenia farmakologicznego PZZP opierają się głównie na sterydoterapii miejscowej. Sterydoterapia doustna ze względu na zwiększone ryzyko objawów niepożądanych jest często nieakceptowana przez pacjentów. W związku z brakiem skuteczności leczenia zachowawczego znaczna grupa chorych wymaga zabiegu operacyjnego który często jest wielokrotnie powtarzany. Wszystko to wskazuje na potrzebę intensywnych prac nad ulepszeniem dostępnych metod terapeutycznych mogących mieć zastosowanie u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych. W tym celu w ramach prowadzonych z moim udziałem badań oceniony został *in vitro* wpływ witaminy D i jej pochodnych oraz wybranych substancji pochodzenia roślinnego na polipy nosa.

Obserwacje kliniczne wskazują, że przewlekłe zapalenie zatok może mieć różny przebieg i co najważniejsze charakteryzuje się różną odpowiedzią na zastosowane leczenie. Sugeruje to udział w rozwoju choroby nie tylko czynników środowiskowych ale również słabo poznanych, osobniczo zmiennych uwarunkowań genetycznych. Pogłębienie wiedzy o molekularnym podłożu PZZP może mieć wartość diagnostyczno-prognostyczną w ocenie skłonności do nawrotów, a także może być pomocne w opracowaniu nowych, bardziej selektywnych środków leczniczych.

Kolejnym zagadnieniem analizowanym w przedstawionym cyklu publikacji jest diagnostyka obrazowa u pacjentów z PZZP. Jednym z podstawowych badań diagnostycznych wykonywanym w tej grupie chorych jest tomografia komputerowa twarzoczaszki. Zwiększająca się w dużym tempie liczba wykonywanych badań radiologicznych wskazują na potrzebę badań zmierzających do wdrożenia metod ograniczających ekspozycję na promieniowanie rentgenowskie.

Ad. 1 Celem pracy była ocena przydatności ambulatoryjnej endoskopii jamy nosa przy kwalifikacji pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych do przedoperacyjnego badania techniką tomografii komputerowej w protokole niskodawkowym.

Tomografia komputerowa (TK) obok endoskopii jamy nosa jest najczęściej wykonywanym badaniem diagnostycznym u pacjentów z podejrzeniem przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (PZZP). Tomografia komputerowa dostarcza bardzo dokładnych informacji o natężeniu stanu zapalnego w obrębie zatok przynosowych i budowie anatomicznej badanego regionu. O ile badanie endoskopowe jamy nosa jest nieważymie i bezpieczne to tomografia

komputerowa wiąże się z ekspozycją pacjenta na szkodliwe działanie promieniowania jonizującego. Wzrostowi liczby wykonywanych badań radiologicznych obserwowanemu w ostatnich latach towarzyszy rosnąca świadomość społeczna o szkodliwości promieniowania rentgenowskiego. Podejmowane są wysiłki służące uzyskaniu obrazów TK o zadowalającej jakości diagnostycznej przy minimalnej dawce promieniowania. W konsekwencji coraz częściej wykonywane są badania wielorzędowymi tomografami komputerowymi w protokołach z obniżoną dawką promieniowania oraz badania techniką tomografii komputerowej wiązki stożkowej. Możliwość wykorzystania badania TK u pacjentów z PZZP w protokołach niskodawkowych w ramach przygotowań do endoskopowego zabiegu operacyjnego nie została jednak jak dotąd określona. W pracy podjęto próbę oceny przydatności endoskopii jamy nosa przy kwalifikacji do odpowiedniego protokołu TK. W ramach prowadzonych badań w pierwszym etapie wykorzystując preparat ludzkiej głowy utrwalonej w formalinie ustalono parametry posiadanego skanera TK umożliwiające maksymalną redukcję dawki promieniowania przy zachowaniu akceptowalnej diagnostycznej jakości otrzymany skanów zatok przynosowych.

W drugim etapie 134 pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych zostało losowo przydzielonych do grupy badanej wypracowanym protokołem niskodawkowym (tj. 120 kVp i 45 mAs) lub protokołem standardowym (120 kVp i 100 mAs). Oceniono możliwość wizualizacji 5 chirurgicznie istotnych struktur anatomicznych w obrębie zatok przynosowych przy użyciu pięciostopniowej skali [od niezadowalającej (1) do doskonałej (5)]. Podczas badania endoskopowego jamy nosa nasilenie zmian zapalnych oceniono w oparciu o klasyfikację Lund-Kennedy i skalę Lildholdta.

Jakość 13% badań TK pacjentów z polipami w jamie nosa diagnozowanych techniką niskodawkową i 4% badań uzyskanych protokołem standardowym oceniono w zakresie słabe-przeciętne. Otrzymane wyniki wskazują że u pacjentów u których nie stwierdzono polipów w badaniu endoskopowym jakość obrazów TK uzyskanych w protokole niskodawkowym i standardowym jest taka sama. Jakość obrazów TK w protokole niskodawkowym była gorsza u pacjentów z polipami w przewodzie nosowym środkowym. Różnica w jakości obrazów pomiędzy protokołem niskodawkowym i standardowym była największa ($p < 0.001$) u pacjentów z polipami poniżej małżowiny środkowej w badaniu endoskopowym (powyżej 2 punktów w skali Lildholdta). Wyniki wskazują także, że inne zmiany (tj. wysięk, obrzęk, strupy, blizny) widoczne w jamie nosa bez współistniejących polipów nie wpływają istotnie na pogorszenie jakości obrazów TK.

Podsumowując, uważamy że badanie TK z redukcją dawki promieniowania powinno być promowane jako podstawowe badanie obrazowe w diagnostyce przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Ponadto, badanie niskodawkowe może być wykonywane w ramach przygotowań do endoskopowego zabiegu operacyjnego bez obawy o istotną utratę jakości obrazu u pacjentów z niepowikłanym zapaleniem zatok bez polipów lub z niewielkimi zmianami w endoskopii nosa (tj. polipami ograniczonymi do przewodu nosowego środkowego). Użycie dawek standardowych podczas badania TK zapewnia jednak lepszą identyfikację kostnych punktów orientacyjnych,

minimalizuje możliwość wystąpienia błędów diagnostycznych i zwiększa bezpieczeństwo pacjenta podczas endoskopowego zabiegu operacyjnego. Z tego powodu standardowe dawki promieniowania powinny być uwzględnione podczas badania TK u pacjentów z większymi zmianami zapalnymi tj. polipami zajmującymi przestrzeń poniżej małżowiny środkowej w badaniu endoskopowym.

Wypracowane w trakcie przedstawionych wyżej badań parametry skanera TK mogą posłużyć jako punkt wyjścia do opracowania własnych standardów badania niskodawkowego w innych pracowniach radiologicznych. Przy wykorzystaniu wypracowanego przez nas protokołu niskodawkowego dawki promieniowania które otrzymywali pacjenci były 100 krotnie niższe w porównaniu do standardowego badania TK zatok przynosowych. Pomimo korzyści wynikających z zastosowania protokołów niskodawkowych są one słabo rozpowszechnione wśród lekarzy otolaryngologów.

Ad. 2 Celem pracy była ocena anatomii zatok przynosowych przy użyciu wielorzędowego tomografu komputerowego w protokole niskodawkowym u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych i z podwyższonym ryzykiem powikłań okołoperacyjnych.

Funkcjonalna, endoskopowa operacja zatok przynosowych jest obecnie uważana za podstawową metodę leczenia przewlekłego zapalenia zatok przynosowych w przypadku braku poprawy po leczeniu farmakologicznym. Przedoperacyjne badanie techniką tomografii komputerowej (TK) nie tylko pozwala zakwalifikować pacjenta do zabiegu operacyjnego ale również precyzyjnie zaplanować jego zakres. Przedoperacyjne badanie TK powinno dokładnie uwidocznić budowę zatok przynosowych, ze szczególnym uwzględnieniem anomalii i odmian anatomicznych struktur w obrębie operowanego regionu. Jest to istotne nie tylko w celu osiągnięcia optymalnego efektu operacji ale również, a może przede wszystkim dla zapewnienia bezpiecznego przebiegu operacji. Dzieje się tak pomimo, że nie jest w pełni jasne czy obniżenie jakości obrazów TK wynikające z obniżenia dawki promieniowania nie zwiększa ryzyka wystąpienia powikłań okołoperacyjnych.

W pracy porównano możliwość wizualizacji istotnych struktur anatomicznych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok na obrazach TK otrzymanych przy użyciu protokołu niskodawkowego (120 kVp i 45 mAs) i standardowej dawki promieniowania (120 kVp i 100 mAs). Do badania zakwalifikowano pacjentów z podwyższonym ryzykiem powikłań okołoperacyjnych (tzn. ze współistniejącą astmą oskrzelową, zaawansowaną polipowatością zatok przynosowych lub po przebytych wcześniej operacjach zatok) u których przedoperacyjna diagnostyka obrazowa wydaje się mieć szczególne ważną dla bezpiecznego przebiegu operacji. Na skanach TK w pięciostopniowej skali oceniono jakościowo możliwość identyfikacji następujących struktur anatomicznych: tętnic sitowych przednich, nerwów wzrokowych, blaszek sitowych i papierowatych.

Spośród wszystkich analizowanych na niskodawkowych skanach TK struktur blaszka sitowa była najslabiej identyfikowalna. Była ona istotnie gorzej widoczna przy redukcji dawki promieniowania

u pacjentów z nasiloną polipowatością oraz u osób z brakiem węchu. Błazka papierowata była natomiast statystycznie gorzej identyfikowalna na skanach niskodawkowych u wszystkich badanych pacjentów. Redukcja dawki promieniowania w sposób nieistotny pogarszała wizualizację tętnic sitowych przednich i nerwów wzrokowych. Pomimo to tętnice sitowe przednie były po błazkach sitowych najsłabiej widocznymi strukturami na obrazach niskodawkowych.

Podsumowując, jeśli badanie TK wykonywane jest w celu zaplanowania operacji endoskopowej zatok przynosowych to u pacjentów z wyższym ryzykiem powikłań śródoperacyjnych należy rozważyć badanie z użyciem standardowej dawki promieniowania. Niskodawkowe protokoły TK mogą u tych chorych w sposób niewystarczający uwidaczniać istotne dla chirurga struktury anatomiczne, a tym samym mogą wpłynąć na bezpieczeństwo przeprowadzanego zabiegu operacyjnego. Dotyczy to pacjentów z współistniejącą astmą oskrzelową, zaawansowaną polipowatością jamy nosa (powyżej 2 punktów w skali Lildholdta), całkowitym brakiem węchu oraz pacjentów po wcześniejszych operacjach zatok przynosowych.

U pacjentów bez wymienionych czynników ryzyka obniżenie dawki promieniowania podczas badania TK umożliwi uwidocznienie ważnych punktów anatomicznych w sposób porównywalny do zastosowania dawki standardowej.

Wyniki pracy sugerują więc, że dane z wywiadu (tj. obecność astmy oskrzelowej i przebyte operacje zatok), ocena węchu oraz wynik badania endoskopowego są pomocne przy kwalifikacji pacjenta do odpowiedniego protokołu TK.

Ad. 3 Celem pracy była identyfikacja genów regulowanych przez jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (NF- κ B) metodą mikromacierzy oligonukleotydowych w polipach nosa.

Niezależnie od przyczyny wywołującej i podtrzymującej stan zapalny w obrębie zatok przynosowych zawsze w procesach tych uczestniczy wiele czynników transkrypcyjnych. Spośród nich szczególną rolę odgrywa jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (NF- κ B; ang. *Nuclear Factor-kappa B*). Dostępne dane literaturowe sugerują, że czynnik NF- κ B poprzez regulację ekspresji genów uczestniczących w szeregu ścieżek sygnałowych może mieć znaczenie w etiologii przewlekłego zapalenia zatok z polipami.

Metoda mikromacierzy oligonukleotydowych zastosowana w przedstawionym badaniu w przeciwieństwie do wielu innych technik molekularnych umożliwia jednoczesną ocenę aktywności transkrypcyjnej dziesiątek tysięcy genów powiązanych z danym procesem biologicznym, a tym samym pozwala lepiej poznać szlaki sygnałowe charakterystyczne dla danej jednostki chorobowej.

Spośród 582 analizowanych genów których transkrypcja zależna jest od NF- κ B 25 charakteryzowała wyższa ekspresja w polipach niż w niezmienionej błonie śluzowej. Największe różnice stwierdzono w przypadku genów kodujących: czynnik trójlistny 3 (TFF3; 7-krotnie wyższa ekspresja w porównaniu do grupy kontrolnej), syntazę tlenu azotu 2 (NOS2; 5-krotnie), inhibitor proteaz serynowych 1 (SERPINA1; 5-krotnie), białko rozprzegające 2 (UCP2; 4-krotnie),

interleukinę 8 (IL8; 4-krotnie), receptor oksytocyny (OXTR; 4-krotnie) i eotaksynę-1 (CCL11; 3-krotnie) ($p < 0.05$).

W grupie kontrolnej (niezmieniony nabłonek wyrostków haczykowatych) w porównaniu do polipów stwierdzono istotnie podwyższoną ekspresję 19 genów zależnych od NF- κ B. Najwyższą aktywność transkrypcyjną charakteryzowały się geny kodujące m.in.: laktoferynę (LF; 13-krotnie), keratynę 6 (KRT6B; 6-krotnie), metaloproteinazę 3 (MMP3; 5-krotnie), antagonistę receptora dla interleukiny 1 (IL1RN; 4-krotnie), lizozym (LYZ; 4-krotnie), dehydrogenazę 11 β -hydroksysteroidową typu 2 (HSD11B2; 4-krotnie) i chemokinę CCL14 (2-krotnie) ($p < 0.05$).

Dzięki zastosowaniu techniki mikromacierzy oligonukleotydowych wykazano, że panel genów zależnych od czynnika NF- κ B ulegających transkrypcji w polipach nosa jest odmienny od panelu genów w niezmienionej błonie śluzowej. Analiza ekspresji genów regulowanych przez NF- κ B pozwala więc na rozróżnienie tkanek zdrowych od chorych. Wyniki potwierdzają więc, że nieprawidłowa transkrypcja szeregu genów jest elementem rozwoju przewlekłych, hiperplastycznych zmian zapalnych w obrębie zatok przynosowych. Zmieniona ekspresja wielu z nich została stwierdzona w prezentowanej pracy po raz pierwszy dlatego też ocena ich roli w etiopatogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych wymagać będzie dalszych prac.

Wykorzystanie badania profilu ekspresji genów techniką mikromacierzy oligonukleotydowych stanowi ciekawą metodę identyfikacji procesów zachodzących w zmienionej błonie śluzowej. Użyta metoda może posłużyć do budowania nowych hipotez i teorii, oraz stanowić punkt wyjścia dla wielu interesujących analiz. Wykonane badania mogą się przyczynić do pogłębienia wiedzy o mechanizmach leżących u podstaw rozwoju polipów nosa. Identyfikacja ścieżek sygnałowych angażujących geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B może pomóc w opracowaniu nowych, bardziej skutecznych i specyficznych rodzajów terapii. W tym kontekście wykorzystując obserwacje, że w polipach nosa wykazano 13-krotne obniżenie ekspresji laktoferyny zaplanowane zostało kolejne badanie *in vitro* oceniające wpływ laktoferyny na komórki polipów nosa.

Ad. 4 Celem pracy była ocena wpływu laktoferyny na wzrost fibroblastów z polipów nosa.

Laktoferyna (LF) jest białkiem wydzielniczym występującym m.in. w sianie, mleku, ślinie, łzach i śluzie. Przypisuje się jej działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze, antywirusowe, przeciwzapalne, immunomodulacyjne oraz wiele innych. Białko to stanowi kluczowy element odporności wrodzonej. Laktoferyna wydaje się być niezwykle interesującym białkiem ze względu na pełnione funkcje przy jednoczesnym braku toksyczności dla człowieka.

W trakcie prowadzonych badań wykorzystano dwie laktoferyny ludzkie (natywną i wysyconą żelazem) oraz laktoferynę z mleka krowiego wszystkie w różnych stężeniach.

W pracy wykazano, że proliferacja fibroblastów z polipów nosa jest hamowana przez wszystkie użyte laktoferyny w sposób zależny od dawki. Najsilniejszą zdolność hamowania proliferacji

fibroblastów charakteryzowała się laktoferyna wyizolowana z mleka i laktoferyna wysycona żelazem.

Obserwacje wskazują również, że zdolność ograniczania proliferacji fibroblastów przez laktoferyny nie jest gatunkowo swoista, ponieważ laktoferyna bydłęca była również aktywna w stosunku do ludzkich fibroblastów z polipów nosa. Dodanie do hodowli monosacharydów nie ograniczało anty-proliferacyjnej aktywności laktoferyn co sugeruje natomiast, że interakcje pomiędzy użytymi laktoferynami i receptorami komórkowymi nie zależą od składu reszty cukrowej cząsteczek laktoferyn. Z drugiej strony dodanie do hodowli fibroblastów chloranu sodu (inhibitora siarczanowania glikozaminoglikanów) lub heparyny zniosło anty-proliferacyjną aktywność laktoferyn, co wskazuje, że LF wiążą proteoglikany zawierające siarczan heparanu. Kolejną ważną obserwacją było to, że dodanie do kolonii przeciwciał przeciwko receptorom TLR2 i TLR4 nie ogranicza funkcji laktoferyn.

Związki produkowane przez błonę śluzową jamy nosa i zatok przynosowych w tym laktoferyna odgrywają ważną rolę w nieswoistej ochronie przed patogenami (wirusami, bakteriami, grzybami i pasożytami). Laktoferyna wykazuje również działanie przeciwzapalne, immunomodulujące oraz co wykazano w prezentowanych badaniach anty-proliferacyjne. Obniżony poziom ekspresji laktoferyny u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych stwierdzony w zaprezentowanej wcześniej pracy może być kolejnym elementem procesu odpowiedzialnego za progresję choroby. Można przypuszczać, że obniżona ekspresja laktoferyny jest jednym z czynników zaburzających miejscową hemostazę w błonie śluzowej zatok przynosowych. W badaniach wykazaliśmy, że laktoferyny działają na fibroblasty z polipów nosa poprzez receptory zawierające siarczan heparanu. Ten typ receptorów jest wykorzystywany również przez zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) co mogłoby tłumaczyć anty-proliferacyjną aktywność laktoferyn w stosunku do fibroblastów.

Otrzymane wyniki sugerują, że zastosowanie laktoferyny *in vivo* mogłoby hamująco wpłynąć na wzrost polipów nosa. Ocena działania laktoferyn wydaje się tym bardziej uzasadniona, że uprzednio opisano korzystny wpływ laktoferyny na polipy odbytu.

Ad. 5 Celem pracy była ocena wpływu witaminy D oraz takalcytolu na ekspresję genów związanych z procesem apoptozy w hodowli fibroblastów pochodzących z polipów nosa.

Przez wiele lat rolę witaminy D w organizmie człowieka upatrywano głównie w regulacji gospodarki jonami wapnia i fosforu. Nowe doniesienia wskazują na potencjalnie przydatne właściwości witaminy D takie jak wpływ na regulację procesu proliferacji, różnicowania, apoptozy, angiogenezy, produkcji cytokin, enzymów i hormonów. Nie w pełni poznane pro-apoptotyczne i anty-proliferacyjne właściwości witaminy D i jej pochodnych mają duży potencjał terapeutyczny. Wyniki dotychczasowych badań nad wpływem witaminy D na komórki nowotworowe sugerują możliwość jej wykorzystania również w terapii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych.

W badaniach ekspresję genów *BCL-2* i *BAX* oceniono metodą RT-PCR oraz na poziomie białka metodą ELISA w hodowli fibroblastów z polipów nosa z dodatkiem kalcytriolu lub takalcytolu w trzech stężeniach tj. $10(-6)$ M, $10(-5)$ M i $10(-4)$ M. Grupę porównawczą stanowiły fibroblasty z polipów nosa nietraktowane kalcytriolem i takalcytolem.

Przeprowadzone badania wskazują, że zarówno kalcytriol, jak i takalcytol w stężeniu $10(-4)$ M istotnie zmniejszają ekspresję genów *BCL-2* i *BAX*. Wyniki zostały wyrażone również w postaci współczynnika BCL-2/BAX który lepiej niż poziom ekspresji pojedynczych genów *BCL-2* i *BAX* koreluje z losem komórki. Przewaga białka BCL-2 nad BAX uważana jest za decydujący czynnik wpływający na przeżycie komórki i odwrotnie. Niezależnie od użytego stężenia zarówno kalcytriol jak i takalcytol nie obniżał istotnie wartości współczynnika BCL-2/BAX. Współczynnik BCL-2/BAX osiągnął najbardziej pro-apoptotyczną wartość po dodaniu takalcytolu w stężeniu $10(-5)$ M. Obniżenie wartości BCL-2/BAX było rezultatem raczej zahamowania ekspresji *BCL-2* niż zwiększenia ekspresji *BAX*. Żadne z użytych rozcieńczeń kalcytriolu i takalcytolu nie było wystarczające do istotnej zmiany wartości współczynnika BCL-2/BAX.

Proces zapalny odgrywa główną rolę w patogenezie polipów nosa, jednakże zaburzenie naturalnej śmierci komórek powoduje zmiany wtórne, które mogą dodatkowo wzmacniać wzrost polipów. Pomimo, że w indukcji apoptozy bierze udział wiele sygnałów to zmiana poziomu ekspresji białek rodziny BCL-2 jest krytycznym elementem tego procesu.

Wyniki sugerują, że pro-apoptotyczne działanie witaminy D i takalcytolu na fibroblasty z polipów nosa tylko w ograniczonym zakresie opiera się na rodzinie białek BCL-2. Nieznacznie bardziej korzystny wpływ na stosunek ekspresji *BCL-2* do *BAX* oraz słabszy wpływ na gospodarkę wapniową sprawiają, że takalcytol wydaje się być bardziej niż kalcytriol obiecującą substancją terapeutyczną. Zwiększona proliferacja komórek jest jednym z mechanizmów wzrostu polipów nosa. Zahamowanie proliferacji komórkowej jak również indukcja apoptozy jest oczekiwanym i korzystnym efektem działania nowych leków przeznaczonych do stosowania w tej chorobie.

Ad. 6 Celem pracy była ocena anty-proliferacyjnego i cytotoksycznego efektu działania wybranych analogów witaminy D na fibroblasty pochodzące z polipów nosa i inne komórki o podwyższonym potencjale proliferacyjnym.

Niepożądane efekty gromadzenia wapnia i fosforu spowodowane terapeutycznymi stężeniami aktywnej formy witaminy D czyli kalcytriolu ograniczają jego zastosowanie kliniczne. Z tego powodu prowadzone są prace zmierzające do opracowania nowych bardziej selektywnych analogów witaminy D udoskonalonych tak aby rozdzielić ich aktywność kalcemiczną od anty-proliferacyjnej, pro-apoptotycznej i indukującej różnicowanie komórek. Pomimo, że anty-proliferacyjne działanie witaminy D jest obecnie uznawane za obiecujący element m.in. terapii przeciwnowotworowej to wpływ witaminy D oraz większości jej analogów na polipy nosa jest bardzo słabo poznany.

W ramach prowadzonych badań oceniono wpływ kalcytriolu i czterech nowych jego analogów oznaczonych symbolami PRI-2191, PRI-1890, PRI-1906 i PRI-2205 na fibroblasty polipów nosa i trzy linie komórek nowotworowych (SNB-19, C32 i SH-4). Komórki były inkubowane przez 72 godziny z każdą z ww substancji w następujących stężeniach: 0.025, 0.25, 2.5 i 25 µg/mL. Proliferaację komórkową i cytotoksyczność oceniono za pomocą testu kolorymetrycznego WST-1.

Uzyskane wyniki wskazują, że działanie zarówno kalcytriolu jak i analogów witaminy D jest zależne od dawki. Kalcytriol w wyższych stężeniach (tj. 2.5 µg/mL i 25 µg/mL), analog PRI-2191 w każdym z użytych stężeń (0.025-25 µg/mL), a analogi PRI-1906 i PRI-2205 począwszy od stężenia 0.25 µg/mL istotnie hamowały wzrost fibroblastów z polipów nosa ($p < 0.05$). W każdym przypadku efekt działania narastał wraz ze wzrostem stężenia użytej substancji. Spośród analizowanych analogów witaminy D wzrost fibroblastów w największym stopniu ograniczały substancje PRI-2191 i PRI-1890 w stężeniu 25 µg/mL.

W pracy oceniono również wpływ kalcytriolu i ww analogów (wszystkie w stężeniu 0.25 µg/mL) na ekspresję pro-apoptotycznego genu *BAX* i anti-apoptotycznego genu *BCL-2*. Poziom ekspresji mRNA dla obu genów oceniono metodą QRT-PCR. Wyniki zostały wyrażone współczynnikiem *BCL-2/BAX*. Zaobserwowano, że stymulacja kalcytriolem i analogami witaminy D spowodowała spadek wartości współczynnika *BCL-2/BAX* w fibroblastach polipów nosa i pozostałych analizowanych liniach komórkowych w porównaniu do hodowli kontrolnych. Otrzymane wyniki wskazują na pro-apoptotyczne działanie nie tylko kalcytriolu i takalcitolu ale również nowych analogów witaminy D. Statystycznie istotny spadek wartości współczynnika *BCL-2/BAX* stwierdzono w liniach komórkowych inkubowanych z analogami PRI-2191, PRI-1890 i PRI-1906 ($p < 0.05$). Spośród analizowanych substancji najsilniejsze działanie pro-apoptotyczne wywierają analogi PRI-2191 i PRI-1890.

Wyniki otrzymanych badań sugerują potencjalną możliwość wykorzystania pochodnych witaminy D w terapii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych z polipami. Suplementacja witaminy D mogłaby przynieść korzystny wpływ na przebieg procesu zapalnego w obrębie zatok przynosowych zważywszy, że pacjentów tych charakteryzuje zwykle obniżony poziom witaminy D. W kolejnym etapie warto byłoby ocenić korzyści wynikające z miejscowego podania witaminy D lub jej pochodnych co jak wykazano m.in. w leczeniu łuszczycy i hiperkeratoz przynosi pożądane efekty. W badaniu wykazano, że użyte nowe analogi witaminy D o obniżonej aktywności kalcemicznej zachowują swoje korzystne właściwości anti-proliferacyjne i pro-apoptotyczne.

Ad. 7 Celem pracy była ocena wpływu kalcytriolu i takalcitolu na ekspresję chemokiny RANTES przez fibroblasty polipów nosa.

Jak wspomniano wyżej witamina D oraz jej aktywne pochodne modulują odpowiedź immunologiczną, a tym samym wpływają na przebieg stanu zapalnego poprzez regulację ekspresji szeregu różnych cytokin. RANTES (ang. *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*) jest chemokiną prozapalną która odpowiedzialna jest za chemotaksję krążących w krwi

eozynofili do objętych stanem zapalnym dróg oddechowych. Rekrutacja eozynofili i uwolnienie wysoce toksycznych białek ziarnistości kwasochłonnych wyindukowane przez chemokinę RANTES odgrywają kluczową rolę w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok z polipami. Efektem chemotaktycznej aktywności RANTES jest również napływ wielu innych rodzajów komórek układu odpornościowego do miejsca zapalenia i zwiększenie produkcji kolejnych chemokin prozapalnych co ostatecznie skutkuje rozwojem samo-podtrzymującego się przewlekłego procesu zapalnego. Z tego powodu podejrzewa się, że ograniczenie produkcji RANTES mogłoby pozytywnie wpłynąć na wzrost polipów nosa. Fibroblasty są podstawowymi komórkami tkanki łącznej które aktywnie uczestniczą w procesie powstawania i wzrostu polipów poprzez produkcję szeregu mediatorów stanu zapalnego w tym białka RANTES.

W ramach prowadzonych badań hodowle komórkowe fibroblastów z polipów nosa po stymulacji bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) inkubowano z kalcytriolem, takalcytolem lub budezonidem R we wzrastających stężeniach [od 10^{-7} M do 10^{-4} M] oraz roztworami złożonymi z kalcytriolu lub takalcytolu i budezonidu R w proporcjach 1:1, 1:3 i 3:1. Analizę ilościową poziomu białka RANTES przeprowadzono w supernatantach z hodowli testem immunoenzymatycznym (ELISA).

Uzyskane wyniki wskazują, że kalcytriol w najwyższym z użytych stężeń (tj. 10^{-4} M) oraz takalcytol w stężeniach 10^{-5} M i 10^{-4} M istotnie redukuje ekspresję białka RANTES w hodowli fibroblastów z polipów nosa (odpowiednio do poziomu 201.1 pg/ml, 338.7 pg/ml i 211.3 pg/ml versus 571.7 pg/ml w grupie kontrolnej; $p < 0.05$). Mieszanina budezonidu R z takalcytolem w proporcjach 1:1 i 1:3 ograniczały natomiast produkcję RANTES przez fibroblasty z polipów nosa do najniższych stwierdzanych w pracy poziomów (odpowiednio, 171.8 pg/ml i 178.7 pg/ml).

Wyniki pracy wskazują, że takalcytol i kalcytriol przez zmniejszenie poziomu chemokiny RANTES mogą ograniczyć migrację granulocytów kwasochłonnych i limfocytów do błony śluzowej w jamie nosa. Sugeruje to, że opisane właściwości witaminy D oraz jej aktywnych analogów mogłyby być rozpatrywane jako uzupełniający element terapii przewlekłego zapalenia zatok z polipami. Obiecującą obserwacją jest, że mieszaniny zawierające budezonid R i analog witaminy D mają przewagę nad budezonidem stosowanym w monoterapii, co wskazuje że aplikacja takich połączeń mogłaby ograniczyć zastosowanie miejscowe sterydów.

Ad. 8 Celem badań była ocena wpływu genisteiny i kwasu fitowego na żywotność i wzrost fibroblastów z polipów nosa.

Substancje pochodzenia roślinnego ze względu na niższą cytotoksyczność nadają się idealnie do stosowania w chorobach przewlekłych, w szczególności takich jak przewlekłe zapalenie zatok przynosowych które zwykle nie skracają długości życia ale bardzo istotnie pogarszają jego komfort. Kolejnym argumentem aby rozważyć zastosowanie fitoterapii w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych jest wielokrotnie młody wiek chorych.

Genisteina jest organicznym związkiem chemicznym z grupy izoflawonów będącym najsilniejszym bioaktywnym składnikiem ziaren soi. Jest ona niespecyficznym inhibitorem kinaz tyrozynowych, a

swoje wielokierunkowe działanie (m.in. anty-proliferacyjne i przeciwzapalne) wywiera poprzez wpływ na poziom ekspresji cytokin, czynników wzrostu, czynników transkrypcyjnych i enzymów. Kwas fitowy występuje naturalnie w większości nasion, ziarnach i otrębach zbóż, nasionach roślin oleistych, kukurydzy oraz w roślinach strączkowych. Kwas fitowy odrywa różnorodne funkcje w komórkach ssaków; wpływa na wzrost komórek oraz ma zdolność regulacji procesu zapalnego i eksportu mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy. Wykazano że ma właściwości przeciwutleniające i chelatujące.

W pracy fibroblasty z polipów nosa inkubowano w różnych stężeniach genisteiny i kwasu fitowego. Proliferację komórkową oceniono za pomocą testu kolorymetrycznego WST-1, a cytotoksyczność metodą pomiaru stężenia LDH. Metoda QRT-PCR została użyta do oceny ekspresji genów histonu *H3*, *BCL-2*, *BAX* i *P53*. Ekspresja kaspazy 8 i 9 została oceniona metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Wyniki badań wskazują, że zarówno genisteina jak i kwas fitowy bardzo istotnie obniżają żywotność i szybkość wzrostu fibroblastów z polipów nosa. Genisteina jak i kwas fitowy w zbliżonym stopniu ograniczają również proliferację komórkową (mierzoną ekspresją genu histonu *H3*). Działanie obu substancji było zależne od dawki. Genisteina i kwas fitowy w niższych stężeniach istotnie obniżają proliferację komórkową, a w wyższych wykazują wyraźniejsze działanie cytotoksyczne. Statystycznie istotne ograniczenie wzrostu fibroblastów stwierdzono po inkubacji z genisteiną w stężeniach wyższych niż 50 μM i z kwasem fitowym w stężeniach powyżej 100 μM .

Oba białka uczestniczą również w regulacji procesu apoptozy fibroblastów poprzez modulację ekspresji pro-apoptotycznego genu *BCL-2* i anty-apoptotycznego genu *BAX* obniżając wartość współczynnika *BCL-2/BAX*. Uzyskane wyniki wskazują również, że w mechanizm apoptozy indukowanej przez genisteinę i kwas fitowy zaangażowany jest enzym kaspaza-8 która ma właściwości indukujące zaprogramowaną śmierć komórki.

Wyniki badań sugerują, że genisteina jak i kwas fitowy posiadają właściwości korzystne dla pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych z polipami. Dalsze badania muszą określić skuteczność użycia miejscowego i suplementacji genisteiny i kwasu fitowego w tej grupie chorych. Zastosowanie biologicznie aktywnych składników pochodzenia roślinnego wpisuje się w aktualny trend w profilaktyce i leczeniu zapalenia zatok przynosowych. Obiecujący jest również fakt, że u pacjentów z astmą oskrzelową po wprowadzeniu diety bogatej w genisteinę uzyskano lepszą kontrolę nad chorobą.

Przedstawione badania prowadzone były we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu (praca 3), Zakładem Biologii Komórki Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu (praca 5,6,7,8), Laboratorium Immunobiologii Instytutu Immunologii i Terapii

Doświadczalnej PAN we Wrocławiu (praca 4) oraz Zakładem Farmakologii Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie (praca 6).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Po wyłączeniu 8 prac oryginalnych wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego mój dorobek stanowi 40 prac, w tym 32 prace oryginalne, 1 praca poglądowa oraz 7 opisów przypadków o łącznej punktacji: IF=16,08 i pkt. MNiSW/KBN=392,0.

W tym:

- prace oryginalne w czasopismach z "impact factor": 17
- prace oryginalne w czasopismach bez „impact factor”: 15
- prace poglądowe w czasopismach z "impact factor": 0
- prace poglądowe w czasopismach bez "impact factor": 1
- opisy przypadków w czasopismach z "impact factor": 1
- opisy przypadków w czasopismach bez "impact factor": 6

W 10 ww pracach jestem pierwszym autorem, w 12 pracach drugim autorem, a w 4 pracach jestem ostatnim autorem.

A. Moje zainteresowania naukowe od wielu lat koncentrowały się wokół tematów z zakresu diagnostyki i etiopatogenezy nowotworów regionu głowy i szyi, a w szczególności raka płaskonabłonkowego krtani. Byłem uczestnikiem szeregu projektów badawczych takich jak:

Ocena przydatności zjawiska autofluorescencji tkanek w diagnostyce raka krtani

Zespół Kliniki Otolaryngologii UM we Wrocławiu jako jeden z pierwszych w Polsce rozpoczął badania nad przydatnością zjawiska autofluorescencji tkanek w diagnostyce onkologicznej w laryngologii. Podczas procesu nowotworzenia dochodzi do znaczących zmian właściwości tkanek czego efektem jest m.in. istotna zmiana ich właściwości fluorescencyjnych. W ramach prowadzonych prac korzystając z lasera półprzewodnikowego opracowano źródło światła niebieskiego indukujące fluorescencję tkankową. Analiza widmowa uzyskanego w badaniu *ex vivo* światła ujawniła, że sygnał autofluorescencji którego fala miała maksymalną długość wynoszącą 505 nm otrzymany z niezmienionej błony śluzowej był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu z sygnałem otrzymanym z tkanki nowotworowej ($p=0.005$). Średnia wartość maksymalnego natężenia sygnału autofluorescencji wyniosła 26.2 V w zdrowej błonie śluzowej i 4.4 V w raku krtani. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej w każdej z próbek raka płaskonabłonkowego wykazano znaczne obniżenie liczby włókien kolagenowych, co wskazuje na rolę jaką kolagen odgrywa w tworzeniu światła fluorescencyjnego. Wyniki badania sugerują, że analiza autofluorescencji jest pomocnym i komplementarnym narzędziem diagnostycznym w onkologii laryngologicznej. Do kolejnego etapu prac (*in vivo*) nad przydatnością zjawiska autofluorescencji

tkanek włączono pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani diagnozowanych i leczonych w Klinice Otolaryngologii. W pracy porównano wyniki badania krtani metodą laryngoskopii pośredniej przy użyciu światła białego i niebieskiego. Otrzymane wyniki były zgodne z obserwacjami z pierwszego etapu badań (*ex vivo*). Niezmieniona błona śluzowa krtani i gardła charakteryzowała się zielonym kolorem fluorescencji, natomiast tkanki nowotworowe wykazywały się brakiem lub obniżonym sygnałem. Wyniki wskazują, że w porównaniu z laryngoskopią w świetle białym laryngoskopia autofluorescencyjna charakteryzuje się wyższą czułością i specyficznością. Z tego powodu technika ma duże zastosowanie w ambulatoryjnej diagnostyce onkologicznej w szczególności u pacjentów z bliznami po uprzednich zabiegach onkologicznych oraz wyższym ryzykiem zmian mnogich. Pewnym ograniczeniem jest współistnienie u niektórych pacjentów stan zapalny oraz kolonizacja bakteryjna które mogą ograniczać emisję zielonego światła autofluorescencyjnego. Opisane badania prowadzone były we współpracy z Politechniką Wrocławską. Końcowym ich efektem było opracowanie publikacji pt.: „Investigation of normal and malignant laryngeal tissue by autofluorescence imaging technique” (*Auris Nasus Larynx*, 2003) (II.A.1) i „Laryngoskopia autofluorescencyjna w diagnostyce zmian nowotworowych krtani” (*Otolaryngol.Pol.*, 2005) (II.D.7), praktycznego podręcznika z zakresu autofluorescencyjnej laryngoskopii pośredniej (II.D.1) oraz rozdziału w książce „Laryngeal diseases: symptoms, diagnosis and treatments” z serii „Otolaryngology Research Advances” (II.D.2).

Ocena udoskonalenia badania metodą endoskopii kontaktowej poprzez zastosowanie komputerowej analizy obrazu

W drugiej z wymienionych wyżej monografii (II.D.2) zamieszczono również wyniki badań prowadzonych z moim udziałem nad możliwością udoskonalenia badania krtani metodą endoskopii kontaktowej poprzez zastosowanie komputerowej analizy obrazu. Endoskopia kontaktowa jest metodą używaną w diagnostyce onkologicznej m.in. zmian w obrębie górnych drogach oddechowych. Jednym z ograniczeń endoskopii kontaktowej jest dość długa krzywa uczenia się. Lekarz wykonujący badanie musi być biegły w ocenie morfologii komórek. W ramach prowadzonych badań w pierwszym etapie oceniono obrazy z endoskopii kontaktowej pod kątem najbardziej dyskryminujących parametrów morfometrycznych jąder komórkowych i wykazano że są nimi: pole powierzchni jądra, gęstość jądra, współczynnik wydłużenia jądra i współczynnik pola powierzchni jądra do powierzchni podobnych. Parametry te posłużyły do określenia trzech typów jąder komórkowych (tj. 1-patologiczne, 2-wątpliwe i 3-prawidłowe). W kolejnym etapie skorelowano liczbę poszczególnych typów jąder z rozpoznaniem histopatologicznym oraz we współpracy z pracownikami Politechniki Wrocławskiej opracowano program komputerowy wykonujący opisaną analizę obrazów z endoskopii kontaktowej. Wyniki pracy wskazują że, analiza obrazów z endoskopii kontaktowej wspomagana komputerowo ma czułość 91% i swoistość 81%. Jednakże w grupie pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani lub dysplazją dużego stopnia czułość i swoistość wyniosła aż 100%. Wszystkie fałszywie dodatnich i fałszywie ujemne

przypadki dotyczyły pacjentów z dysplazją średniego stopnia lub niezmienionym nabłonkiem. Można podsumować, że endoskopia kontaktowa z komputerowo wspomaganą analizą obrazu znacznie poprawia skuteczność diagnostyki raka krtani i dysplazji dużego stopnia. Wyniki powyższych badań zostały zaprezentowane w publikacji pt.: The role of computer-assisted analysis in the evaluation of nuclear characteristics for the diagnosis of precancerous and cancerous lesions by contact laryngoscopy (Adv.Med.Sci., 2008) (II.A.21).

Ocena możliwości różnicowania ludzkich tkanek za pomocą pomiaru ich własności dielektrycznych

Bazując na doniesieniach wskazujących, że wskaźniki bioelektryczne nowotworów złośliwych różnią się zasadniczo od tkanek zdrowych, oceniono *ex vivo* wartości impedancji raków płaskonabłonkowych krtani na podstawie pomiarów napięcia uzyskanego w odpowiedzi na przyłożony do prąd zmienny w szerokim zakresie częstotliwości. Na podstawie uzyskanych danych obliczono moduł impedancji w funkcji częstotliwości. W badaniach wykazano że wartości modułu impedancji były istotnie statystycznie większe w zdrowym nabłonku w porównaniu z rakami krtani ($p < 0.05$). Stosunek modułu impedancji raka do niezmienionego nabłonka wahał się od 2.1 do 15. Wartości impedancji w tkankach zdrowych wzrastały istotnie wraz ze spadkiem częstotliwości przyłożonego prądu.

Otrzymane wyniki badań potwierdzają, że pomiar bioimpedancji może być cennym źródłem informacji o tkankach bo wartość impedancji bioelektrycznej jest ściśle zależna od jej struktury. Wyniki sugerują również możliwość wykorzystania analizowanych wskaźników w różnicowaniu raka płaskonabłonkowego. Ww badania prowadzone były we współpracy z Politechniką Wrocławską. Wyniki badań zostały zaprezentowane w publikacjach pt.: „Electrical impedance measurements in assessing laryngeal squamous cell carcinoma” (Adv.Clin.Exp.Med., 2006) (II.A. 24) i „Measurements of electrical impedance of biomedical objects” (Acta Bioeng.Biomech., 2016) (II.A.17).

Ocena wartości rokowniczej zmian poziomu ekspresji naczyniowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sVCAM-1) oraz naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) u pacjentów z rakiem krtani

W ramach prowadzonych badań oceniono wartość prognostyczną zmian poziomu ekspresji naczyniowej cząsteczki adhezyjnej-1 (sVCAM-1) oraz naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w raku krtani. W tym celu oceniono poziom obu białek w surowicy pacjentów, a otrzymane wyniki skorelowano z danymi klinicznymi. Stężenie sVCAM-1 w surowicy pacjentów z rakiem krtani wynosiło średnio 542.1 ng/ml (SD 164.9 ng/ml), a stężenie VEGF średnio 519.4 pg/ml (SD 335.9 ng/ml). Stężenia obu białek było istotnie statystycznie wyższe w surowicy pacjentów z rakiem krtani w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono jednak istotnych zależności między stężeniem sVCAM-1 i VEGF a wskaźnikami klinicznymi i

patologicznymi raków. Uzyskane wyniki sugerują, że ocena stężenia sVCAM-1 oraz VEGF w surowicy pacjentów chorych na raka płaskonabłonkowego krtani nie ma klinicznego znaczenia w przewidywaniu zaawansowania w tym tendencji do tworzenia przerzutów. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Circulating soluble vascular cell adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in patients with laryngeal squamous cell cancer (Adv.Clin.Exp.Med., 2007) (II.A.23).

Poszukiwanie czynników przydatnych w prognozowaniu skuteczności samodzielnej radioterapii raka płaskonabłonkowego krtani

Współpraca z Panią dr D. Duplą z Zakładu Radioterapii Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu zaowocowała badaniami dotyczącymi prognozowania skuteczności radioterapii w raku płaskonabłonkowym krtani. W ramach tych badań określono wartość predykcyjną cykliny D1, cykliny B1, białek EGFR i P53 w prognozowaniu skuteczności radioterapii, poprzez ustalenie związku poziomu ekspresji ocenianych markerów z ryzykiem wznowy miejscowej i przeżyciem swoistym pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani leczonych samodzielną radioterapią.

Cykliny to produkty protoonkogenów które odgrywają kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Nieprawidłowy, podwyższony poziom cykliny D1 może znosić indukowaną przez promieniowanie przerwę w fazie G1 cyklu. Nadekspresja cykliny B1 może natomiast modulować odpowiedź komórek na działanie promieniowania jonizującego poprzez wpływ na punkty kontrolne fazy G2 i M, efektem czego może być dalsza nieprawidłowa proliferacja przyczyniająca się do promieniooporności.

Receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) którego aktywacja przez promieniowanie jonizujące spełnia funkcję cytoprotekcyjną i może być odpowiedzialna za repopulację i przeżycie komórek, a tym samym niepowodzenie leczenia jest jednym z najczęściej aktywowanych onkogenów w nowotworach głowy i szyi. Radioterapia jest także jednym z głównych czynników powodujących aktywację białka P53 i włączenie mechanizmu obronnego punktu kontroli integralności DNA. Dlatego uszkodzenie funkcji P53 może w znaczący sposób wpływać na przeżycie komórek po naświetlaniu.

W prowadzonych badaniach nie wykazano związku pomiędzy podwyższoną ekspresją cykliny D1, cykliny B1, P53 i EGFR a parametrami klinicznymi i histopatologicznymi guzów. Analiza jednowariantowa wykazała znaczący wpływ cechy T na ryzyko wznowy miejscowej ($p=0.035$) i zgonu z powodu raka krtani ($p=0.035$) oraz związek zaawansowania klinicznego (wg. TNM) z ryzykiem zgonu z powodu nowotworu ($p=0.029$). Pacjentów w stopniu zaawansowaniu I i II choroby nowotworowej charakteryzowało istotnie niższe ryzyko zgonu z powodu raka niż chorych w stopniu zaawansowania III i IV. Analiza jednoczynnikowa nie wykazała istotnego związku pomiędzy poziomem ekspresji cykliny D1, cykliny B1, P53 i EGFR a ryzykiem wznowy i zgonu z powodu raka krtani.

W analizie wieloczynnikowej niezależnymi czynnikami związanymi z ryzykiem wznowy miejscowej okazały się: cecha T ($p=0.004$), wiek ($p=0.009$) oraz poziom ekspresji cykliny B1 i białka P53. Pacjenci poniżej 60 roku życia mieli istotnie niższą szansę przeżycia 5 lat bez cech wznowy miejscowe. Guzy gromadzące cyklinę B1 charakteryzowały się wyższym ryzykiem wystąpienia wznowy miejscowej ($rr=1.44$; $p=0.005$). Przeciwnie, nadekspresja białka P53 była związana z korzystnym rokowaniem. Pięcioletnie przeżycia w tej grupie chorych były wyższe 82.4% v. 75% ($p=0.042$).

W analizie wieloczynnikowej całkowitego czasu przeżycia jedynym niezależnym czynnikiem rokowniczym pozostała wielkość ogniska pierwotnego (cecha T). Ryzyko zgonu chorych z powodu raka krtani z guzami T3 i T4 było wyższe niż dla raków T1 i T2 ($rr=14.6$; $p=0.028$).

Wyniki badań wskazują, że najistotniejszym czynnikiem rokowniczym dla pacjentów z rakiem krtani leczonych konwencjonalną radioterapią pozostaje zaawansowanie kliniczne choroby. Dodatkowo, sugerują one użyteczność analizy ekspresji cykliny B1 w prognozowaniu skuteczności leczenia. Białko P53 wydaje się być również korzystnym czynnikiem predykcyjnym jakkolwiek wymagane są dalsze badania. Wyniki prac zostały przedstawione w publikacjach pt.: „Ocena związku pomiędzy ekspresją receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i białka p53 a promieniowrażliwością raka krtani” (Otolaryngol.Pol., 2009) (II.D.13) oraz „Znaczenie prognostyczne ekspresji cykliny D1 i cykliny B u pacjentów z rakiem krtani leczonych radioterapią” (Otolaryngol.Pol., 2009) (II.D.14).

Ocena obecności wybranych polimorfizmów genów naprawy DNA w raku płaskonabłonkowym krtani

Celem badań była ocena obecności polimorfizmów wybranych 8 genów zaangażowanych w i) metabolizm ksenobiotyków pierwszej fazy (*CYP1A1*, *CYP2A6*, *CYP2D6*), ii) mechanizmy naprawy DNA (*XRCC1*, *OGG1* (BER – naprawa przez wycięcie zasady), *XPC*, *XPD* (NER - naprawa przez wycięcie nukleotydu), *XRCC3* (HR – naprawa przez homologiczną rekombinację) u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani metodą PCR lub PCR-RFLP. W wyniku prowadzonych badań w analizowanych rakach krtani znaleziono 9 polimorfizmów w genach *CYP1A1*, *CYP2A6*, *XPC*, *PAT*, *XRCC3* i *OGG1*. Stwierdzono dodatkowo kilka korelacji między analizowanymi polimorfizmami i dostępnymi danymi klinicznymi jakkolwiek nieistotnych statystycznie w analizie wieloczynnikowej. Wyniki badań wskazują na znaczącą rolę zarówno polimorfizmów genu *CYP1A1*, jak i *XPC*, *XRCC3* oraz *OGG1* w kształtowaniu ryzyka rozwoju raka płaskonabłonkowego krtani. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: The role of chosen polymorphisms in genes coding xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair proteins in laryngeal cancer (Adv.Clin.Exp.Med., 2011) (II.A.12).

Ocena nasilenia metylacji sekwencji DNA w raku płaskonabłonkowym krtani

Zmiany stopnia metylacji DNA są jedną z najczęstszych form modyfikacji epigenetycznych obserwowanej w wielu ludzkich nowotworach. Hipometylacja DNA może prowadzić m.in. do niestabilności chromosomowej, utraty imprintingu czy aktywacji różnych onkogenów. Jedną z metod oceny stopnia metylacji DNA jest ocena całkowitej zawartości 5-metylocytozyny. W ludzkich komórkach nowotworowych występuje hipometylacja, polegająca na całkowitej utracie 5-metylocytozyny, w miejscach dużych skupisk normalnie hipermetylowanych sekwencji genomu.

Celem badań było sprawdzenie czy poziom metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej może być markerem metylacji DNA w komórkach raka płaskonabłonkowego krtani. Do oceny poziomu metylacji DNA użyto wysokosprawnej chromatografii cieczowej oceniając całkowitą zawartość 5-metylocytozyny. Do badania użyto materiał tkankowy (tj. tkankę guza, niezmienną błonę śluzową krtani oraz leukocyty krwi obwodowej) pochodzący od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym krtani. Hipometylację DNA stwierdzono w 56% raków płaskonabłonkowych krtani i w 49% przypadków przylegającej, niezmienniej błony śluzowej krtani. Nasilenie metylacji DNA w rakach krtani korelowało istotnie ze stopniem metylacji w przylegającej, niezmienniej błonie śluzowej krtani ($p < 0.01$) ale nie z metylacją w leukocytach krwi obwodowej. Odwrotną korelację stwierdzono pomiędzy poziomem 5-metylocytozyny w leukocytach i stopniem zróżnicowania histopatologicznego raków krtani ($p < 0.05$). Stwierdzono również związek pomiędzy zwiększoną konsumpcją alkoholu i zawartością 5-metylocytozyny w leukocytach ($p = 0.032$).

Wyniki wskazują, że hipometylacja DNA jest często spotykaną modyfikacją epigenetyczną w raku płaskonabłonkowym krtani i przyległym niezmiennym nabłonku. Obecność hipometylacji DNA w obu tkankach jest prawdopodobnie wynikiem karcynogenezy polowej. Podsumowując można stwierdzić, że pomiar natężenia metylacji DNA w leukocytach krwi obwodowej (poprzez ocenę poziomu całkowitej 5-metylocytozyny) nie może być użyty do oceny stopnia metylacji DNA w komórkach raka płaskonabłonkowego krtani. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Global DNA methylation status in laryngeal cancer (Head Neck, 2014) (II.A.16).

Ocena ekspresji genów kompleksu różnicowania naskórka w wybranych rakach płaskonabłonkowych regionu głowy i szyi

Celem badań była kompleksowa analiza ekspresji genów należących do rodziny kompleksu różnicowania naskórka (EDC; ang. *Epidermal Differentiation Complex*) na poziomie transkrypcji w rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej oraz rakach krtani. Kompleks różnicowania naskórka (EDC) składa się z szeregu genów zlokalizowanych regionie 1q21 i kodujących białka zaangażowane w późną fazę różnicowania komórek nabłonka. Zmiana ekspresji wielu genów należących do kompleksu EDC spotykana jest w nowotworach m.in. skóry, żołądka, płuc i nerki. Zastosowanie w badaniu techniki mkromacierzy oligonukleotydowych pozwoliło na jednoczesną analizę ekspresji transkryptomu całej rodziny genów.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że geny należące do kompleksu EDC charakteryzuje bardzo zróżnicowana ekspresja w badanych guzach. Zarówno w rakach jamy ustnej jak i rakach

krtani wykazano podwyższoną ekspresję 3 genów: *S100A3*, *LCE3D* i *CGN*. W rakach jamy ustnej wykazano również istotnie podwyższoną ekspresję genów *S100A11*, *S100A7*, *S100A3*, *S100A2* i *LCE3D* (*Late Cornified Envelope 3D*). W tej lokalizacji dodatkowo stwierdzono istotnie obniżoną ekspresją genów *S100A1* i *S100A4* w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja pozostałych genów z rodziny EDC nie różniła się istotnie w rakach jamy ustnej i niezmiętej błonie śluzowej. Ekspresja genu *S100A7* została zweryfikowana również w większej grupie pacjentów z rakiem jamy ustnej metodą QRT-PCR.

Wyniki wskazują, że spośród wielu genów rodziny EDC zaangażowanych w różnicowanie komórek nabłonka w rakach regionu głowy i szyi obserwowana jest zmiana ekspresji tylko grupy genów kodujących białka S100. Ww badania miały charakter wielośrodkowy i prowadzone były we współpracy z Centrum Onkologii w Gliwicach. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Epidermal differentiation complex (locus 1q21) gene expression in head and neck cancer and normal mucosa (*Folia Histochem. Cytobiol.*, 2014) (II.A.15).

B. Drugim ważnym kierunkiem badań w który byłem zaangażowany po obronie rozprawy doktorskiej dotyczył etiologii przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Efektem doświadczeń i wiedzy zdobytej w trakcie realizacji wymienionych niżej prac są późniejsze tematy badawcze składające się na mój cykl habilitacyjny. Uczestniczyłem m.in. w następujących badaniach:

Analiza aktywności transkrypcyjnej genów w polipach nosa techniką mikromacierzy oligonukleotydowych

W celu oceny aktywności transkrypcyjnej genów w polipach nosa w przeprowadzonych badaniach zastosowano mikromacierze oligonukleotydowe o wysokiej gęstości (HG-U133A; Affymetrix), które pozwalają jednocześnie przeanalizować bardzo dużą liczbę (22 283) cząsteczek mRNA w jednej badanej próbce.

Wyniki badań wskazują, że wzór aktywności transkrypcyjnej genów w polipach nosa jest istotnie różny od profilu ekspresji genów w niezmiętej błonie śluzowej. Wyniki sugerują, że mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie się polipów nosa angażują wiele genów nie ulegających transkrypcji w niezmiętym nabłonku. Ocena aktywności transkrypcyjnej pozwoliła wyodrębnić podgrupę pacjentów z masywnymi zmianami polipowatymi z eozynofilią tkankowa i z różnym stopniem nadreaktywności dolnych dróg oddechowych oraz drugą podgrupę - polipów bez dominującego nacieku eozynofilowego. Sugeruje to, związek profilu ekspresji genów z podziałem polipów ze względu na dominujący typ nacieku zapalnego i tym samym z przebiegiem klinicznym choroby.

W kolejnym etapie prac skoncentrowano się na genach różnicujących które mogą odpowiadać za powstawanie polipów nosa. W badaniach wskazano 556 genów wykazujących odmienną ekspresję w obu grupach. Wśród nich 217 miało istotnie wyższą ekspresję w polipach nosa, a 339 niską ekspresję w polipach w porównaniu do grupy kontrolnej. W polipach nosa największy wzrost

transkrypcji stwierdzono w przypadku genu kodującego enzym metaloproteinazę-10 (MMP10; 20-krotnie większą ekspresję).

Wyniki otrzymane za pomocą techniki mikromacierzy oligonukleotydowych zweryfikowano przy użyciu bardziej czułej metody jaką jest QRT-PCR w większej grupie pacjentów z zapaleniem zatok przynosowych. Zwalidowano ekspresję 4 genów o podwyższonej ekspresji w polipach nosa (tj. *MMP10*, *IL-8*, *NOS2A* i *ALOX15*) i 4 genów o podwyższonej ekspresji w niezmienionej błonie śluzowej (*MMP3*, *ALOX12*, *LTF* i *DMBT1*). Wyniki otrzymane techniką QRT-PCR były zgodne z wynikami otrzymanymi metodą mikromacierzy oligonukleotydowych w przypadku 7 genów. Geny te poprzez aktywację różnych procesów biologicznych uczestniczą prawdopodobnie w rozwoju przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Przedstawione badania prowadzone były we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacjach pt.: „A microarray study of gene expression profiles in nasal polyps” (*Auris Nasus Larynx*, 2011) (II.A. 13) oraz „Zróźnicowanie polipów nosa w badaniach techniką mikromacierzy oligonukleotydowych” (*Otolaryngol.Pol.*, 2008) (II.D.12).

Ocena ekspresji receptorów kin oraz receptorów czynnika martwicy nowotworu α (TNF α) w polipach nosa

Kininy są ważnymi hormonami tkankowymi uczestniczącymi w inicjacji i progresji procesów zapalnych w wielu tkankach w tym błonie śluzowej jamy nosa. Swoje funkcje kininy realizują poprzez dwa typy receptorów (receptor B1 i B2), których aktywacja indukuje produkcję szeregu czynników prozapalnych.

Celem badań była ocena profilu ekspresji receptorów dla kinin na poziomie transkrypcji w polipach nosa oraz niezmienionej zapalnie błonie śluzowej jamy nosa.

W pracy wykazano obecność mRNA genów receptora B1 i B2 zarówno w polipach nosa i w zdrowej błonie śluzowej. Różnica w natężeniu transkrypcji nie była istotna statystycznie. Natężenie ekspresji genów *B1* i *B2* było natomiast wyraźnie choć wciąż nieistotnie wyższe w polipach eozynofilowych w porównaniu do grupy kontrolnej. Przy użyciu techniki mikromacierzy oligonukleotydowych przeanalizowano również ekspresję 92 genów kodujących białka uczestniczące w szlakach sygnałowych powiązanych z receptorami B1 i B2. Spośród przeanalizowanych genów 3 różnicowały pacjentów z polipami od grupy kontrolnej. Gen kodujący tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1 (TIMP1) jako jedyny wykazał statystycznie wyższą ekspresję w polipach nosa w porównaniu do grupy kontrolnej. Geny *FOS* i *PTGS1* (syntazy endoperoksydazy prostaglandynowej-1) miały wyższą ekspresję w niezmienionej błonie śluzowej (odpowiednio 3.82 i 4.27 razy) w porównaniu do polipów nosa.

Inhibitor TIMP1 ma właściwości stymulujące proliferację komórkową co wykazano w wielu rodzajach komórek. Dodatkowo, podwyższona aktywność inhibitora TIMP1 jest również wiązana ze wzmożonym procesem włóknienia tkanek w dolnych dróg oddechowych u pacjentów z astmą

oskrzelowa. Podobną rolę TIMP1 może odgrywać w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych z polipami.

Pomimo że w opisanych badaniach nie stwierdzono istotnych różnic w nasileniu ekspresji receptorów B1 i B2 w polipach nosa nie wyklucza to, że mogą one odgrywać istotną rolę w rozwoju tej choroby. W prezentowanym badaniu po raz pierwszy analizowano ekspresję receptorów kinin w polipach nosa. Wykazanie ich obecności w komórkach pochodzących z polipów nosa otwiera potencjalne możliwości terapeutyczne. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Transcriptional activity of genes-encoding kinin B1 and B2 receptors and kinin-dependent genes in nasal polyps (Adv.Med.Sci., 2009) (II.A.9).

Powstawaniu polipów nosa towarzyszy miejscowe podwyższenie poziomów wielu różnych mediatorów prozapalnych i cytokin. Jedną z cytokin która odgrywa kluczową rolę w tym procesie i wykazuje ekstremalnie szerokie spektrum bioaktywności jest czynnik martwicy nowotworu α (TNF α).

Celem kolejnych badań była ocena profilu transkrypcji genów kodujących czynnik TNF α i dwóch jego receptorów (TNF-R1 i TNF-R2) w polipach nosa oraz w niezmiętej błonie śluzowej jamy nosa.

Wykazano, że średni poziom mRNA dla czynnika TNF α w polipach nosa był nieistotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (82229 kopii/ μ g vs 74869 kopii/ μ g). Transkrypcja genu kodującego czynnik TNF α była natomiast istotnie bardziej nasiloną w polipach eozynofilowych niż w polipach nie-eozynofilowych ($p < 0.01$). W polipach eozynofilowych i nie-eozynofilowych w porównaniu do niezmiętej błony śluzowej jamy nosa ekspresja receptora TNF-R1 była istotnie wyższa niż receptora TNF-R2 zarówno na poziomie mRNA ($p < 0.01$) jak i białka ($p < 0.05$).

Wyniki badań wskazują, że dominującym typem receptora dla czynnika TNF α w polipach nosa jest receptor TNF-R1. Prawdopodobnie ten typ receptora odpowiedzialny jest za prozapalne działanie czynnika TNF α w polipach nosa. Różnice w poziomie ekspresji czynnika TNF α i jego receptorów pomiędzy polipami eozynofilowymi i nie-eozynofilowymi wskazują, że badane białka mogą uczestniczyć w kształtowaniu typu nacieku zapalnego w tym schorzeniu. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Quantification of the mRNA encoding Tumor Necrosis Factor α (TNF α) and its receptors in human nasal polyps (Adv.Med.Sci., 2008) (II.A.22).

Przedstawione badania prowadzone były we współpracy z Katedrą i Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Sosnowcu.

Ocena występowania biofilmu bakteryjnego w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych

Rola bakterii w rozwoju i progresji przewlekłego zapalenia zatok przynosowych nie jest w pełni wyjaśniona i wciąż szeroko dyskutowana. Jedną z teorii tłumaczącą małą skuteczność celowanej antybiotykoterapii oraz trudności w eradykacji bakterii w przewlekłym zapaleniu zatok zakłada

obecność biofilmu bakteryjnego. Mikroorganizmy żyjące w biofilmie wykazują bowiem wysoką oporność na czynniki bakteriobójcze i tym samym ich eliminacja jest dużym wyzwaniem terapeutycznym. Celem badań była ocena częstości występowania biofilmu bakteryjnego na błonie śluzowej zatok przynosowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych.

Uzyskane obrazy ze skaningowego mikroskopu elektronowego wykazały obecność struktur wskazujących na biofilm bakteryjny u 47% analizowanych pacjentów z zapaleniem zatok. W przypadkach tych na powierzchni nabłonka widoczne były agregaty zawierające elementy przypominające bakterie. Wyniki zostały potwierdzone w elektronowym mikroskopie transmisyjnym.

Analizując wymazy posiewów u 87% pacjentów stwierdzono obecność bakterii w aspiratach lub wymazach z zatok przynosowych. Badania wykazały obecność w zatokach przynosowych 26 różnych gatunków grzybów i bakterii. Dominującymi bakteriami były gronkowce występujące głównie jako element flory mieszanej. W dwóch przypadkach stwierdzono dodatkowo grzyby *Candida albicans*. Wyniki potwierdziły również wcześniejsze obserwacje, że bakterie beztlenowe są sporadycznie spotykane w obrębie zatok przynosowych - w badanym materiale tylko u 13% pacjentów stwierdzono bakterie beztlenowe - z rodzaju *Propionibacterium*.

Otrzymane wyniki wskazują, że biofilm bakteryjny jest często spotykany u pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych. Identyfikacja biofilmu bakteryjnego jest trudna co tłumaczy wysokie ryzyko wyników fałszywie ujemnych. Rola biofilmu w rozwoju zapalenia zatok wymaga jednak dalszych badań. Badania prowadzone były we współpracy z Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wyniki zostały przedstawione w publikacji pt.: Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis (Folia Microbiol., 2009) (II.A.10).

Ocena wpływu witaminy D i jej pochodnej na produkcję interleukin prozapalnych w fibroblastach polipów nosa

Celem badań była ocena wpływu 1alpha,25-dihydroksywitaminy D3 (kalcytriol) and 1alpha,24(R)-dihydroksywitaminy D3 (takalcytol) na produkcję dwóch ważnych interleukin IL-6 i IL-8 w hodowli fibroblastów z polipów nosa. W ramach eksperymentu hodowle komórkowe fibroblastów traktowano roztworem takalcytolem lub kalcytriolem w stężeniach od 10(-7) M do 10(-4) M). Poziom ekspresji IL-6 i IL-8 oceniono w supernatantach metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

W pracy wykazano, że zarówno kalcytriol jak i takalcytol hamują syntezę IL-6 i IL-8 w fibroblastach polipów nosa w sposób zależny od dawki. Wpływ obu substancji na produkcję interleukin był wyraźniejszy po zastosowaniu kalcytriol i takalcytol w wyższych stężeniach tj. 10(-5) M i 10(-4) M w przypadku kalcytriolu i 10(-4) M dla takalcytolu.

Wyniki badań wskazują, że witamina D i jej pochodna wpływają na ekspresję interleukin prozapalnych w fibroblastach polipów nosa. Badane substancje poprzez modulację reakcji

immunologicznych m.in poziomu IL-6 i IL-8 mogłyby być potencjalnie przydatne w profilaktyce i leczeniu przewlekłego zapalenia zatok. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures (Adv.Med.Sci., 2010) (II.A.11).

Ocena synergistycznego działania witaminy D i budezonidu R w hodowli fibroblastów z polipów nosa

Procesowi zapalnemu w obrębie zatok przynosowych towarzyszy zwiększona proliferacja fibroblastów które są ważnymi elementami struktury polipa nosa. Celem badań była ocena wpływu 1alpha,25-dihydroksywitaminy D3 (kalcytriolu) i 1alpha,24(R)-dihydroksywitaminy D3 (takalcytolu) na fibroblasty z polipów nosa użytych w monoterapii oraz w kombinacji z budezonidem R.

Kalcytriol i takalcytol w monoterapii zastosowano w stężeniach od 10^{-9} M do 10^{-3} M. Dodatkowo użyto mieszanin zawierających kalcytriol lub takalcytol i budezonid R w stosunku 1:1, 1:3 lub 3:1, wszystkie substancje w stężeniach od 10^{-5} M do 10^{-3} M. Statystycznie istotne ograniczenie proliferacji komórkowej stwierdzono po zastosowaniu kalcytriolu i takalcytolu w stężeniach 10^{-4} M i 10^{-3} M. Kalcytriol obniżał proliferację o 30%, a takalcytol o 60% w porównaniu do grupy kontrolnej. Połączenie kalcytriolu lub takalcytolu w stężeniu 10^{-4} M w proporcji 1:1 z budezonidem R pozwoliło osiągnąć maksymalne ograniczenie proliferacji fibroblastów (odpowiednio 82% i 69%).

Połączenie witaminy D lub jej analogu z budezonidem R skutkowało zwiększeniem aktywności anty-proliferacyjnej terapii w porównaniu do skuteczności działania obu leków w monoterapii. Zastosowanie mieszaniny pozwoliło dodatkowo na obniżenia stężenia zastosowanej witaminy D co zmniejsza toksyczność produktu. Z tego samego powodu wydaje się, że wyższy profil bezpieczeństwa zapewni takalcytol niż kalcytriol. Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji pt.: Influence of vitamin D3 analogues in combination with budesonid R on proliferation of nasal polyp fibroblasts (Acta Biochim. Pol., 2009) (II.A.8).

Przedstawione badania prowadzone były we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Farmaceutycznego ŚUM w Sosnowcu.

Ocena wiarygodności tomografii komputerowej w diagnostyce przewlekłego zapalenia zatok przynosowych

W ramach tych badań kontynuowany został temat diagnostyki radiologicznej w zapaleniu zatok w aspekcie możliwości ograniczenia częstości wykonywania badań metodą tomografii komputerowej (TK). TK zatok przynosowych jest metodą diagnostyczną umożliwiającą obiektywne potwierdzenie lub wykluczenie obecności zmian zapalnych w obrębie zatok przynosowych. U pacjentów z ograniczonymi dolegliwościami oraz u osób z zapaleniem zatok bez polipów badanie TK jest

wykonywane często na początku procesu diagnostycznego w celu weryfikacji diagnozy co nie jest zgodne z aktualnymi rekomendacjami sugerującymi wykorzystanie tej metody dopiero przy braku poprawy po leczeniu farmakologicznym lub w ramach przygotowań do zabiegu operacyjnego. Zdarza się więc, że lekarz stoi przed decyzją czy powtórzyć badanie obrazowe. Celem pracy była ocena jak zmienia się nasilenie choroby na obrazach TK u nieleczonych pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych bez polipów. Do badania zakwalifikowano którzy mieli co najmniej dwa razy wykonane badanie TK twarzoczaszki w różnych odstępach czasu i w okresie pomiędzy badaniami nie byli leczeni. Nasilenie stanu zapalnego oceniono na obrazach TK z użyciem skali Lund-Mackay i zmodyfikowanej skali Lund-Mackay. Odstęp czasu pomiędzy badaniami TK wahała się od 31 do 1162 dni (średnio 338 dni). Zaawansowanie zmian zapalnych w pierwszym badaniu TK korelowało istotnie statystycznie z wynikiem drugiego badania TK ($r=0.86$; $p<0.05$). W porównaniu do pierwszego badania nasilenie zmian w drugim badaniu TK pozostało takie same u 39% pacjentów, zwiększyło się u 25% i zmniejszyła się u 36%. Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy zmianą nasilenia choroby i odstępem czasu pomiędzy badaniami. Wyniki wskazują, że nasilenie zmian zapalnych w obrębie zatok przynosowych u nieleczonych pacjentów jest stabilne w krótkiej i średnio-długiej perspektywie czasu i niezależne od początkowego nasilenia choroby. Dodatkowo kolejne badanie TK nie wpływa na zmianę zakresu planowanego zabiegu operacyjnego. Wyniki pozwalają stwierdzić, że powtarzanie badania TK u objawowych, nieleczonych pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok przynosowych bez polipów nie jest w pełni uzasadnione i wymaga poważnego przemyślenia. Wyniki zostaną przedstawione w publikacji: M. Frączek, M. Masalski, M. Guziński. Reliability of computed tomography scans in the diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Adv.Clin.Exp.Med.* (w druku)

5.1 Udzielone patenty krajowe:

Jestem współautorem 3 patentów i jednego rozpatrywanego wniosku o patent:

1. Tytuł: „Proteza kosteczek słuchowych”; nr zgłoszenia 406084; rok udzielenia patentu: 2016; zakres terytorialny ochrony patentowej: Polska
2. Tytuł: „Proteza kosteczek słuchowych”; nr zgłoszenia 406083; rok udzielenia patentu: 2016; zakres terytorialny ochrony patentowej: Polska
3. Tytuł: „Uchwyt do mocowania kości, zwłaszcza skroniowej”; nr zgłoszenia: 394957; rok udzielenia patentu: 2015; zakres terytorialny ochrony patentowej: Polska
4. Tytuł patentu: „Łyżka szczęk-rozwieracza”; numer zgłoszenia P.412824

5.2. Podręczniki i monografie mojego współautorstwa:

1. Rozdział „Bóle głowy” w monografii „Laryngologia w praktyce lekarza rodzinnego” pod redakcją T. Kręcickiego i M. Zalesskiej-Kręcickiej; Warszawa: Blackhorse, 2006; s.41-45
2. Podręcznik „Indirect autofluorescence laryngoscopy” Tuttlingen, Germany: Endo Press, 2009; 30 s. ISBN 978-3-89756-157-1

3. Rozdział „The importance of autofluorescence and contact endoscopy in the diagnosis of laryngeal lesions” w monografii: „Laryngeal diseases: symptoms, diagnosis and treatments”; pod redakcją Oldrich Nemecek i Viktor Mares. Seria „Otolaryngology Research Advances”. New York, USA: Nova Science Publishers, Inc., 2010; s.113-128. ISBN 978-1-60876-107-4
4. Rozdział „Choroby górnych dróg oddechowych” w podręczniku „Alergia, choroby alergiczne, astma” T.2 ; pod redakcją Andrzeja M. Fala; Kraków: Medycyna Praktyczna, 2011; s.279-293; ISBN 978-83-7430-278-4
5. Rozdział „Diagnostyka endoskopowa w otorynolaryngologii” w podręczniku „Otolaryngologia kliniczna” [T.]1; pod redakcją Kazimierza Niemczyka i wsp.; Warszawa: MediPage Sp. z o.o., 2015; s.325-337 ISBN 978-83-61104-83-4

5.3 Otrzymane nagrody:

- 2013 Zespołowa Nagroda JM Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu „za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej” tj. cykl publikacji pt.: „Badania nad patogenezą i farmakoterapią polipów nosa”
- 2012 Zespołowa Nagroda Naukowa I stopnia JM Rektora Akademii Medycznej w Katowicach za cykl prac dotyczących badań transkryptomicznych w poszukiwaniu molekularnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w diagnostyce klinicznej
- 2009 Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu „za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej” tj. cykl publikacji dotyczących etiopatogenezy raka płaskonabłonkowego krtani
- 2009 Zespołowa Nagroda Naukowa JM Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu „za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej” tj. cykl publikacji pt. „Patogeneza i farmakoterapia polipów nosa”
- 2005 Zespołowa Nagroda Ministra Zdrowia RP za cykl publikacji dotyczących genetycznych podstaw raka krtani
- 2004 Wyróżnienie Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Akademii Medycznej we Wrocławiu za rozprawę doktorską pt.: „Ekspresja białek regulacyjnych cyklu komórkowego fazy G1, G1/S i S w raku krtani”
- 2002 Najlepsza prezentacja: „Autofluorescence imaging of normal and malignant laryngeal tissue” podczas 4th European Laryngological Society Meeting, 5-7 Września 2002, Bruksela, Belgia

5.4. Udział w projektach badawczych

Projekty badawcze prowadzone w ramach KBN i NCN:

- 2010 - 2013, wykonawca grantu N N401423439 pt.: Ekspresja genów w raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi: poszukiwanie sygnatur genowych o znaczeniu rokowniczym z wykorzystaniem badania w próbkach guza utrwalonych w formalinie. Centrum Onkologii w Gliwicach. Kierownik grantu: prof. Adam Maciejewski

2009 - 2011, wykonawca grantu N N401236034 pt.: Profil hypermetylacji wybranych wysp CpG w odniesieniu do ekspresji mRNA metyltransferaz DNA i białek wiążących metyl-CpG oraz globalnej hypometylacji w pierwotnych i przerzutowych płaskonabłonkowych rakach głowy i szyi. Akademia Medyczna we Wrocławiu. Kierownik grantu: dr n. med Agnieszka Stembalska

2004 - 2007, wykonawca grantu 3T11F01226 pt.: Opracowanie algorytmów analizy komputerowej obrazów autofluorescencyjnych krtani. Akademia Medyczna we Wrocławiu. Kierownik grantu: prof. Tomasz Kręcicki

Projekty naukowe w ramach badań własnych i środków z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu:

2013-2015 (ST-792) Etiopatogeneza przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Wykonawca zadania

2010-2013 (ST-496) Analiza ekspresji wybranych genów procesu karcinogenezy raka płaskonabłonkowego krtani. Kierownik zadania

2010-2012 (ST-494) Zastosowanie optycznego tomografu koherentnego w diagnostyce zmian skórnych i śluzówkowych regionu głowy i szyi. Wykonawca zadania

2006-2008 (ST-174) Analiza ekspresji wybranych onkogenów i genów supresorowych uczestniczących w karcinogenezie i progresji raka krtani w aspekcie znaczenia prognostycznego. Kierownik zadania

5.5 Recenzje publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych:

Recenzowałem prace naukowe do następujących czasopism:

- International Forum of Allergy & Rhinology (IF 2.350)
- Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (IF 2.464)
- Advances in Medical Sciences (IF 1.211)
- Standardy Medyczne - Problemy Chirurgii Dziecięcej
- Annals of Clinical Case Reports

5.6 Członkostwo w komitetach redakcyjnych i naukowych czasopism:

Jestem członkiem komitetu naukowego czasopisma Austin Otolaryngology, Austin Publishing Group (USA), ISSN: 2473-0645.

5.7 Działalność organizacyjna

Obecnie zostałem wybrany na członka Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego w latach 2016-2020.

Byłem członkiem komitetów organizacyjnych 3 konferencji naukowych.

- 2000, The International Intensive Course in Oncology SOCRATES/ERASMUS, „Recent Advances in the knowlegde of cancer” part II, Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław, 2-16 września

- 1999, The International Intensive Course in Oncology SOCRATES/ERASMUS, „Recent Advances in the knowledge of cancer” part I, Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław, 3-17 września
- 1997, Ogólnopolskie Sympozjum Onkologii Dziecięcej, Akademia Medyczna we Wrocławiu, Książ, 5-7 czerwca

5.8 Działalność dydaktyczna

Byłem kierownikiem specjalizacji z otorynolaryngologii dwóch lekarzy i obecnie jestem kierownikiem kolejnych dwóch rezydentów.

Oprócz pracy naukowej od 2000 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami V i VI roku Wydziału Lekarskiego UM we Wrocławiu z zakresu otolaryngologii. W ramach powyższych zajęć prowadzę również ćwiczenia ze studentami anglojęzycznymi (*English Division*). W latach 2000-2007 prowadziłem zajęcia ze studentami V roku Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego UM. Okresowo prowadzę również wykłady z otolaryngologii dla studentów Wydziału Lekarskiego UM we Wrocławiu.

Uczestniczę w szkoleniu podyplomowym prowadząc wykłady w ramach organizowanych przez Klinikę Otolaryngologii UM kursów specjalizacyjnych CMKP „Onkologia w otolaryngologii”. Prowadziłem również zajęcia pt.: ”Wybrane problemy kliniczne w otorynolaryngologii” dla lekarzy specjalizujących się w medycynie rodzinnej.

Wielokrotnie prezentowałem referaty szkoleniowe na posiedzeniach naukowo-szkoleniowych dla lekarzy otolaryngologów w ramach cyklicznych spotkań Oddziału Dolnośląskiego Polskiego Towarzystwa Otolaryngologów Chirurgów Głowy i Szyi.

W ramach współpracy interdyscyplinarnej wygłaszałem wykłady na posiedzeniach Oddziału Dolnośląskiego Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego oraz Polskiego Towarzystwa Alergologicznego.

5.9 Stypendia naukowe:

Odbyte staże i otrzymane stypendia naukowe pozwoliły mi na bezpośredni kontakt z ekspertami z innych ośrodków naukowych głównie zagranicznych.

2014 Stypendium The American Austrian Foundation i Soros Foundation, Krankenhaus Hietzing, Wiedeń, Austria (1-19.XII)

2010-2011 Stypendium badawcze w ramach „Programu Rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu” finansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego, Kapitał Ludzki, Narodowa Strategia Spójności (XII.2010-IX.2011)

2010 Stypendium The American Austrian Foundation i Soros Foundation, OMI Salzburg Weill Cornell Seminar in Otolaryngology, Salzburg, Austria

2009 Stypendium naukowe Amplifon Center for Research and Studies, Gruppo Otologico, Piacenza, Włochy (01.VI-31.VII)

2007 Stypendium naukowe Instytutu Szwedzkiego, Instytut Karoliński, Sztokholm, Szwecja (1-30.VIII)

2005 Stypendium Open Structure by Ethicon, Oddział Otolaryngologii, University of Dundee, Wielka Brytania

2005 Stypendium im. dr E. Niedźwirskiego, Clinic Hirslanden, Center for Rhinology, Zurich, Szwajcaria (15.III-15.IV)

2004 Stypendium Erasmus/Socrates, Vrije University, Oddział Otolaryngologii, Amsterdam, Holandia (01.VIII-31.X)

2004 Stypendium Europejskiego Towarzystwa Rynologicznego, Oddział Otolaryngologii, Utrecht University, Holandia

1999 Summer Research Fellowship, Laboratory of Human Genetic, University of Campinas, Sao Paulo, Brazylia (VIII-IX)

6. Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje łącznie 48 publikacji, w tym 40 prac oryginalnych, 1 pracę poglądową oraz 7 opisów przypadków.

W 17 pracach jestem pierwszym autorem, w 13 pracach drugim autorem, a w 4 pracach jestem ostatnim autorem.

Sumaryczna punktacja za wszystkie prace oryginalne, poglądowe oraz opisy przypadków wynosi: 25,112 IF i 540 pkt. MNiSW.

Punktacja cyklu publikacji przedłożona jako rozprawa habilitacyjna, który obejmuje 8 prac oryginalnych wynosi: IF=9,032, pkt. MNiSW=148,0.

Aktualna liczba cytowań moich prac (bez autocytowań) wynosi 163, indeks Hirscha (wg Web of Science) wynosi 7.

Jestem współautorem 1 monografii naukowej w języku angielskim, 1 rozdziału w monografii w języku angielskim oraz 3 rozdziałów w podręcznikach lub monografiach w języku polskim.

Jestem współautorem 3 patentów krajowych.

Jestem współautorem 61 konferencyjnych doniesień naukowych w tym 21 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Wrocław, 22.08.2017 Marcin Frączek