

AUTOREFERAT

OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ

NAUKOWYCH

dr Mariusz Kusztal

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny
Transplantacyjnej

Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław



UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Mariusz Kusztal

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

28.06.2001 – **dyplom lekarza**, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna we Wrocławiu.

27.10.2006 – **doktor nauk medycznych**, Wydział Lekarski Kształcenia Podyplomowego, Akademia Medyczna we Wrocławiu.

Tytuł rozprawy doktorskiej „Polimorfizm genu CTLA-4 u biorców przeszczepu nerki; powiązanie z częstością ostrego odrzucania i odległą funkcją przeszczepionej nerki”.

Promotor: Prof. dr hab. Marian Klinger

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

Studia podyplomowe

2002 - 2006 Studia Doktoranckie, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM we Wrocławiu

2003 - 2007 Studium Medycyny Molekularnej, Warszawa

Zatrudnienie

2005 - 2009 Asystent, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM we Wrocławiu

2009 - obecnie Adiunkt, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej UM we Wrocławiu

W 2008r. uzyskałem tytuł specjalisty chorób wewnętrznych, a w 2011 tytuł nefrologa.

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.):

Wykaz publikacji będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie tytułu dr habilitowanego w dziedzinie medycyny:

Rozprawa Habilitacyjna obejmuje 5 publikacji o łącznym **IF=8,064**; punkty MNiSZW = 102.

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

1. Mariusz Kusztal, Katarzyna Kościelska-Kasprzak, Dominika Drulis-Fajdasz, Maria Magott-Procelewska, Dariusz Patrzalek, Dariusz Janczak, Paweł Chudoba, Marian Klinger.: The influence of CTLA-4 gene polymorphism on long-term kidney allograft function in Caucasian recipients. *Transplant Immunol.* 2010 Vol.23 no.3; s.121-124

IF₂₀₁₀=1,9121.

2. Mariusz Kusztal, Małgorzata Radwan-Oczko, Katarzyna Kościelska-Kasprzak, Maria Boratyńska, Dariusz Patrzalek, Marian Klinger.: Possible association of CTLA-4 gene polymorphism with cyclosporine-induced gingival overgrowth in kidney transplant recipients. *Transplant.Proc.* 2007 Vol.39 no.9; s.2763-2765

IF₂₀₀₇=1,027

3. Mariusz Kusztal, Agata Kosmaczewska, Maria Magott-Procelewska, Irena Frydecka, Lidia Cizak, Dorota Boćko, Dariusz Patrzalek, Marian Klinger.: CD28 downregulation on CD4+ T cells is associated with age of kidney transplant recipient. *Transplant Int.* 2008 Vol.21 no.7; s.661-668

IF₂₀₀₈=3,115

4. Mariusz Kusztal, Renata Kłak, Magdalena Krajewska, Maria Boratyńska, Dariusz Patrzalek, Marian Klinger.: Application of extracorporeal photopheresis in kidney transplant recipients: technical considerations and procedure tolerance. *Transplant.Proc.* 2011 Vol.43 no.8; s.2941-2942

IF₂₀₁₁=1,005

5. Mariusz Kusztal, Katarzyna Kościelska-Kasprzak, W. Gdowska, M. Żabińska, M. Myszka, Renata Kłak, Magdalena Krajewska, Maria Boratyńska, Piotr Szyber, Paweł Chudoba, Dariusz Patrzalek, Marian Klinger.: Extracorporeal photopheresis as an antirejection prophylaxis in kidney transplant recipients: preliminary results. *Transplant.Proc.* 2011 Vol.43 no.8; s.2938-2940

IF₂₀₁₁=1,005

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

Tematyka Rozprawy Habilitacyjnej dotyczy badania odpowiedzi immunologicznej na aloprzeszczep nerki oraz prób oddziaływania na tą odpowiedź poprzez zabiegi fotoferezy pozaustrojowej. Omówione zostaną następujące cele naukowe:

- A. Badanie wpływu polimorfizmów cząsteczek kostymulujących (CD28, CTLA-4), odgrywających rolę w odpowiedzi T-komórkowej, na przeżycie i czynność alograftu nerki (1), oraz na przerost dziąseł u biorców przeszczepu nerki przyjmujących cyklosporynę A (2).
- B. Określenie zależności między wiekiem biorców przeszczepu przyjmujących leki immunosupresyjne a stopniem ekspresji cząsteczek kostymulujących na limfocytach T krwi obwodowej (3).
- C. Pierwsze zastosowanie fotoferezy pozaustrojowej u biorców aloprzeszczepu nerki jako terapii/profilaktyki immunomodulującej odpowiedź układu odpornościowego (4, 5).

Ad. A)

Zachowanie odpowiedniej równowagi w procesach odpowiedzi immunologicznej jest konieczne po to, by przeszczepiona nerka została zaakceptowana przez organizm biorcy i nie była niszczone w wyniku zapalenia i innych procesów immunologicznych.

Przeszczepienie narządu wywołuje odpowiedź immunologiczną na aloantygeny, wynikającą z różnic genetycznych pomiędzy dawcą a biorcą. Naukowcy i klinicyści próbują wyhamowywać procesy konieczne do aktywacji i proliferacji limfocytów T. Dobrze poznany i kluczowy komponent aktywacji odpowiedzi T-komórkowej to kostymulacja (II sygnał, po interakcji kompleks MHC-TCR). Jest ona wynikiem interakcji ligandów rodziny B7 na komórce prezentującej antygen z receptorami kostymulującymi (aktywującymi) CD28, ICOS po stronie limfocyta T. Przekazanie drugiego sygnału tą drogą powoduje klonalną ekspansję komórek T oraz ich różnicowanie. Cząsteczka CD152(CTLA-4) jest ważnym elementem ko stymulującym limfocyta, biorącym udział w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej. Receptor CTLA-4 utrzymuje odpowiedzi odpornościowe w dynamicznej równowadze poprzez hamowanie zarówno wstępnych, jak i końcowych etapów aktywacji limfocytów (ma wielokrotnie większe powinowactwo do liganda B7 niż CD28).

W moich badaniach szczególną uwagę poświęciłem właśnie cząsteczkom kostymulującym CD28 i CTLA-4, które pomimo braku specyficzności antygenowej są najważniejsze w promowaniu lub ograniczaniu odpowiedzi T-komórkowej.

Geny kodujące obie cząsteczki posiadają wiele miejsc polimorficznych o udowodnionym znaczeniu klinicznym, wpływających na stopień aktywacji limfocytu (różny poziom mRNA w stymulowanych i niestymulowanych limfocytach, niestabilność transkryptu, stopień ekspresji cząsteczki) oraz jego proliferacji.

Doświadczenia i wnioski płynące z realizacji doktoratu (m.in. uwzględnianie zjawiska nierównoważenia sprzężeń pomiędzy różnymi miejscami polimorficznymi w genie, znaczenie układu genotypów tylko w niektórych sytuacjach klinicznych) skłoniły mnie do dalszej pracy nad znaczeniem polimorfizmu molekuł kostymulujących w transplantologii. Wybrane geny i ich funkcjonalne polimorfizmy powinny być analizowane jednocześnie, a nie pojedynczo. Tą przesłanką kierowałem się w dalszych badaniach. Dodatkowym argumentem za wyborem właśnie tych cząsteczek jest obecnie silny nurt w postępowaniu terapeutycznym, polegający na długotrwałym blokowaniu drogi kostymulacji za pomocą humanizowanego przeciwciała CTLA-4-Ig. Takie leki biologiczne są obecnie dostępne w praktyce klinicznej.

W pracy [1] analizowałem wpływ polimorfizmów cząsteczek kostymulujących CD28 (IVS3 +17T>C), CTLA-4 (-318C>T, +49A>G, mikrosatelitarny 3'UTR na eksonie 4) na przeżycie i czynność alograftu nerki u 314 biorców. Jest to pierwsze w światowej literaturze badanie asocjacyjne polimorfizmu genu CTLA-4/CD28 z tak długim okresem obserwacji biorców - mediana wynosi 97.5 miesięcy. Przeprowadzone jedno- i wieloczynnikowe analizy nie wykazały wpływu badanych polimorfizmów (CD28 i CTLA-4) na przeżycie biorców oraz nerek przeszczepionych. W oparciu o znany wpływ polimorfizmu genu CTLA-4 (wiarygodne dane publikacyjne) na aktywację limfocytu T zdefiniowano badane układy genotypów jako „korzystne” AA/LL (homozygota AA w pozycji +49 eksonu 1 i homozygota niskiej liczby powtórzeń AT w mikrosatelicie 3'UTR na eksonie 4) i „niekorzystne” GG/HH (homozygota GG w +49 i homozygota wysokiej liczby powtórzeń AT w mikrosatelicie) pod względem ograniczania odpowiedzi immunologicznej. Nerki pacjentów posiadających kombinację „korzystną” AA/LL cechowały się istotnie lepszą funkcją odległą wyrażoną wyliczonym eGFR (wielkość filtracji kłębuszkowej na podstawie MDRD) niż pacjentów z układem GG/HH. Wyższy eGFR (ml/min/1.73m²) stwierdzano po roku (56.4 vs 51.4; p=0.033), po 5 latach (56 vs 50; p=0.057), po 8 latach (50.5 vs 35; p=0.003) jak i po 10 latach (53.5 vs 35; p=0.003) od przeszczepienia. W całej analizowanej kohorcie „korzystny” układ genotypów, związany z lepszą czynnością nerki, miało 24.2% biorców, natomiast „niekorzystny” stwierdzono u 16.9% pacjentów.

Obserwacja kliniczna biorców przeszczepu nerki z przerostem dziąseł przyjmujących cyklosporynę A wskazywała na możliwość przetrwałej reakcji zapalnej w przyzębiu. Stwierdzone w badaniach histologicznych nacieki z obecnością limfocytów skłaniały do poszukania jej zależności od polimorfizmu cząsteczek kostymulujących (CTLA-4), interleukiny 2 i TNF-alfa. W opublikowanej pracy [2] zauważono istotnie częstsze występowanie przerostu dziąseł biorców posiadających allel A w pozycji +49 genu CTLA-4, co może być dodatkowym czynnikiem podtrzymującym stan zapalny. Allel +49 G występował dwa razy rzadziej u chorych z przerostem, niż bez ($p=0.008$). Nie stwierdzono różnic w dystrybucji alleli innych polimorfizmów w obrębie genów CTLA-4, IL-2 i TNF-alfa.

Ad. B)

Dane dostępne z międzynarodowych rejestrów na temat przeszczepienia nerek jasno wskazują, że główną przyczyną utraty przeszczepu są powikłania sercowo-naczyniowe, nowotwory i zakażenia, a nie reakcja odrzucania. W wielu publikacjach z badań klinicznych można znaleźć dane mówiące, iż grupę starszych biorców cechuje niższy odsetek reakcji ostrego odrzucania, a jeśli już do niej dochodzi, to ma ona mniejsze nasilenie niż w młodszej grupie. Taka obserwacja może wskazywać na większą tolerancję osób starszych na aloantygenu.

W przedstawionym badaniu, będącym wynikiem współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu [3], oceniano ekspresję receptorów kostymulujących (CD28, CD40L, CTLA-4) na limfocytach T (CD4) krwi obwodowej w spoczynku oraz po stymulacji *ex vivo* (anty-CD3+rIL-2). Limfocyty izolowano od grupy 78 biorców przeszczepu nerki w różnym wieku (przedział 17-68 lat). U wszystkich badanych stwierdzano stabilną czynność nerki (stężenie kreatyniny w surowicy 1.5 mg/dl) i nie podejrzewano procesu odrzucania ani zakażenia (prawidłowe CRP). Mediana obserwacji (od przeszczepienia) wynosiła 20 miesięcy. W złożonej analizie wieloczynnikowej uwzględniano wpływ następujących czynników: liczba niezgodnych antygenów HLA, czas zimnego niedokrwienia, stopień uczulenia przed przeszczepem (PRA), rodzaj i dawka leków immunosupresyjnych (w dniu pobrania krwi).

Uzyskane wyniki wykazały istotną ujemną korelację między wiekiem a spoczynkową ekspresją CD28 ($r -0.4$; $p=0.0004$) na komórkach CD4, a także istotną dodatnią korelację między wiekiem biorcy a ekspresją CTLA-4 po stymulacji ($r 0.34$; $p=0.008$). Ligand CD40 nie wykazywał zróżnicowania ekspresji na limfocytach CD4 u biorców w różnym wieku.

Stwierdziliśmy istotnie niższą częstość komórek CD4/CD28 w świeżo pobranej krwi od starszych pacjentów. Po stymulacji za pomocą anty-CD3+rIL-2 różnice w odsetku komórek CD28+ pomiędzy grupami wiekowymi były jeszcze większe. Przemawia to za zależnym od wieku ograniczeniem odpowiedzi T-komórkowej na mitogen. W grupie starszej (56-68 lat) w świeżo pobranej krwi zauważyliśmy nieznacznie niższy odsetek komórek z CD4 z ekspresją CTLA-4 na powierzchni komórki niż w grupach młodszych. Natomiast po stymulacji doszło do zmiany ekspresji cząsteczki CTLA-4 zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowej - w grupie starszej utrzymywała się wyraźna tendencja do wyższej ekspresji, w porównaniu z pozostałymi. Ta obserwacja tłumaczy skłonność do „nieodpowiadania” komórek T u osób starszych. Z obserwacji innych badaczy wiadomo, iż wysoka ekspresja CTLA-4 na powierzchni limfocytów skutkuje anergią.

Wyniki wskazują, że różny poziom ekspresji cząsteczek kostymulujących (zmniejszona ekspresja CD28 i zwiększona zdolność do postymulacyjnej ekspresji CTLA-4) jest związany z wiekiem. Taka sytuacja może sprzyjać akceptacji przeszczepu. Ujemną stroną tego zjawiska może być gorsza odpowiedź na zakażenie.

Ad.C)

Nadmierna immunosupresja przyczynia się do rozwoju infekcji oportunistycznych oraz nowotworów. Objawy uboczne leków immunosupresyjnych zwiększają ryzyko schorzeń sercowo-naczyniowych lub nasilają zaburzenia metaboliczne. Stale prowadzone są poszukiwania sposobów indukcji tolerancji immunologicznej, które umożliwiłyby redukcję lub rezygnację z immunosupresji, co pozwoliłoby uniknąć powikłań z nią związanych i poprawiło odległe wyniki przeszczepiania narządów. Jedną z testowanych terapii immunomodulacyjnych jest fotofereza pozaustrojowa (FP).

Istnieją pojedyncze doniesienia świadczące o skuteczności zabiegów fotoferezy zarówno w leczeniu odrzucania, jak i w jego profilaktyce. Terapia ta była stosowana w przypadkach braku odpowiedzi na klasyczne leki przeciwozdrzuceniowe (steroidy, ATG) lub przeciwwskazań do ich stosowania (np. infekcja wirusowa). Podczas leczenia FP nie przerywa się podawania leków immunosupresyjnych, chociaż zabiegi FP wykonywane bezpośrednio po terapii limfocytolitycznej mogą być mniej skuteczne.

Zabieg fotoferezy polega na pozaustrojowym naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym A (UVA) leukocytów poddanych działaniu leku fotouczulającego - 8-metoksypsoralenu (8-MOP). Po naświetlaniu leukocyty powracają do krwiobiegu pacjenta. W kilku powtarzanych cyklach niespecyficznego leukoferezy (3–6 cykli w zależności od masy ciała

pacjenta) na drodze wirowania krew pełna zostaje rozdzielona na dwie frakcje. Pierwsza z nich, pozbawiona leukocytów, od razu wraca do organizmu pacjenta. Druga frakcja, bogata w leukocyty, zawiera komórki i osocze. Do frakcji tej, zwanej kożuszką leukocytarną, wstrzykuje się 8-MOP (Uvadex), a następnie poddaje się działaniu promieniowania o długości fali 320 - 400 nm. Podczas każdego zabiegu fotoferezy wykonywanego za pomocą systemu UVAR XTS podaje się 3 – 5 ml sterylnego preparatu Uvadex (8-MOP). Lek wstrzykuje się podczas pierwszego cyklu bezpośrednio do worka, w którym przed fotoaktywacją gromadzony jest kożuszek leukocytarny z osoczem. W celu aktywacji 8-MOP rozcieńczony roztwór leukocytarny przepływa przez sterylną kasetę emitującą UVA, w której znajdują się 1-milimetrowe przezroczyste rurki, zwiększające powierzchnię naświetlania. Komórkami poddawany procedurze fotoferezy są leukocyty jednojądrzaste (limfocyty i monocyty), których liczba podczas sesji może być różna, w zależności od całkowitej liczby leukocytów. Cała procedura zabiegu FP trwa około 3 godzin i może być wykonywana zarówno w warunkach hospitalizacji, jak i w trybie ambulatoryjnym.

Mechanizm działania FP wiązany jest z indukcją tolerancji immunologicznej (Transfusion 2006;46:6). Najnowsze doniesienia mówią o długoterminowym, istotnym wzroście liczby komórek regulatorowych u biorców przeszczepu nerki, u których wykonano jedynie 6 zabiegów fotoferezy w pierwszym miesiącu po przeszczepieniu (Transplantation 2007;83:1393). Immunomodulacyjne działanie fotoferezy ma polegać na generacji antygenowo specyficznych regulatorowych komórek T (J Immunol. 2005;15:5968). Leukocyty oddawane w ostatniej fazie FP zwiększają pro-tolerogenną czynność wyciszonych komórek dendrytycznych (KD) i prawdopodobnie makrofagów. Leukocyty po zabiegu FP dostają się do śledziony i wątroby, gdzie ulegają internalizacji przez rezydujące w tkankach makrofagi i niedojrzałe KD. Leukocyty te wydzielają IL-10, ograniczając ekspresję cząsteczek kostymulujących na KD (Transplantation 2009:846–850).

W badaniu [4] uczestniczyło kolejnych 20 biorców (10 par) przeszczepu nerki od dawcy zmarłego. Dziesięciu z nich poza standardową immunosupresją miało wykonywane zabiegi FP, rozpoczynając schemat w pierwszym lub drugim tygodniu po przeszczepie nerki. Wszyscy biorcy otrzymywali standardowe schematy immunosupresji (mykofenolan + inhibitor kalcyneuryny + prednizon). Schemat : 2 zabiegi (w kolejnych dniach) raz w tygodniu przez pierwsze 2 tygodnie, a następnie co 2 tygodnie (najczęściej 12-16 zabiegów). Średni wiek biorców w grupie leczonej FP wyniósł $47,4 \pm 12$ l. (6M, 4K), BMI $25,4 \pm 4$, a liczba niezgodnych antygenów HLA - 3,25. Charakterystyka grupy kontrolnej: wiek 50 ± 13 l. (7M, 3K), BMI $25,2 \pm 1$, a liczba niezgodnych antygenów HLA - 3.

Fotofereza pozaustrojowa była wykonywana na aparacie UVAR XTS (Therakos, USA). Poszczególne etapy zabiegu przebiegają w sposób zautomatyzowany, w układzie zamkniętym.

Wykonano w sumie ponad 115 zabiegów FP u 10 biorców przeszczepu nerki (12-16 sesji na pacjenta) bez istotnych powikłań [5]. Najczęstszy dostęp naczyniowy stanowiły: przetoka tętniczo-żylna - 89, cewnik tunelizowany w żyłę centralnej - 12, żyła obwodowa - 20, proteza PTFE - w 6 zabiegach. Średnia szybkość przepływu krwi wyniosła 35.5 ± 5 ml/min. Jeden zabieg FP trwał średnio 175.5 ± 35 min (zakres: 120-277), włącznie z fotoaktywacją (33.3 ± 30 min). Objętość poddawana fotoaktywacji (kożuszek leukocyтары) wynosiła 228.4 ± 34 ml na sesję. Całkowita ilość płynu podawanego podczas przeciętnego zabiegu wyniosła 449.5 ± 60 ml, a średnia dawka heparyny 5979 ± 530 jednostek. Objawy niepożądane bezpośrednio związane z FP: hipotonia – 2 przypadki, wzrost temperatury ciała (do $37,5^{\circ}\text{C}$) - 4 przypadki, utrata erytrocytów (ok. 100 ml) przy 3 zabiegach (wykrzepnięty układ wraz z wkładem wirówki, techniczny problem z reinfuzją).

Ostre odrzucanie wystąpiło u jednego pacjenta z grupy kontrolnej i u dwóch pacjentów w grupie badanej. Wszystkie epizody odrzucania były rozpoznane na podstawie badania histopatologicznego wycinka nerki i leczone pulsami metyloprednizolonu. W grupie badanej (FP) odrzucanie (AR Banff IB: i 2, t 2, g 0-1, v 0, ah 0) pojawiło się w obu przypadkach po 6 miesiącu od przeszczepu czyli 2 miesiące od zakończenia cyklu zabiegów fotoferezy. W grupie kontrolnej wystąpił 1 epizod ostrego odrzucania (AR Banff IB: i 2, t 2, g 0-1, v 0, ah 1) w 1. miesiącu po przeszczepie. U jednego biorcy z grupy FP, u którego doszło do odrzucania, stwierdzono wahające się stężenia cyklosporyny w pierwszych 6 miesiącach, a z powodu permanentnie niskich wartości leukocytów krwi obwodowej mógł on nie odpowiedzieć na zabiegi FP (niska efektywność aferezy jednojądrzastych leukocytów). Mimo ograniczeń statystycznych (małe liczby, krótki czas obserwacji) szacowane GFR wskazują na tendencję do nieco wyższych wskaźników filtracji kłębuszkowej u pacjentów poddanych FP. Średnia wartość eGFR w

6. miesiącu w grupie FP wyniosła 67.5 ± 10 ml/min, natomiast w grupie kontrolnej - 53.6 ± 3 ml/min ($p=0.03$). Z kolei w 12 miesięcy po przeszczepie wartości te wynosiły odpowiednio 64.4 ± 8 i 59.5 ± 3 ml/min ($p=0.09$ w teście Wilcoxon'a porównania par).

Analiza powikłań w rocznej obserwacji wypada nieco gorzej w grupie kontrolnej: zgon w drugim miesiącu z powodu pneumocystozy płuc u jednego z biorców i nawracająca choroba cytomegaliczna u kolejnego. Ponadto u jednego biorcy z grupy kontrolnej stwierdzono cukrzycę polekową. Powikłań tych nie stwierdzano w grupie FP. Można przypuszczać, że opisane powikłania w dużej mierze stanowiły pochodną nadmiernej immunosupresji.

W szóstym miesiącu po przeszczepie pacjenci poddani FP mieli wyższą liczbę limfocytów w porównaniu z grupą kontrolną (1812 vs 1670/uł; $p=0,06$), głównie T: CD4+ (723 vs 538/uł; $p=0.06$) i CD8+ (517 vs 359/uł; $p=0.06$). U wszystkich pacjentów w okresie 6 miesięcy od

przeszczepu obserwowano przyrost subpopulacji CD8⁺ CD28⁻ (Treg indukowane), z nieco wyższymi wartościami w grupie FP (nieistotnie statystycznie). W okresie obserwacji nie zauważono znamiennych różnic w liczbie komórek dendrytycznych i Treg pomiędzy grupami biorców. Pewne różnice obserwowano w poszczególnych punktach czasowych od przeszczepu.

W trzecim miesiącu (zakończenie cyklu zabiegów FP) obserwowano różnice w odsetkowym udziale limfocytów CD3 wśród Treg pomiędzy grupą FP a kontrolną (9.4 ± 15 vs 3 ± 1 , $p=0.01$).

W grupie FP po 3 miesiącach więcej mieloidalnych komórek dendrytycznych (immBDCA1,3) miało fenotyp niedojrzały w porównaniu z grupą kontrolną (87% vs 67% i 87% vs 70%, $p=0.05$; odpowiednio dla BDCA1 i BDCA3).

We wnioskach należy stwierdzić, że dodanie cyklu zabiegów FP do standardowej immunosupresji nie uchroniło wszystkich biorców przeszczepu nerki przed odrzucaniem, ale wiązało się z nieco lepszą czynnością alograftu w okresie 12 miesięcy od przeszczepu. Nie zauważono znamiennych różnic pomiędzy grupami, pod względem liczby komórek dendrytycznych, regulatorowych, limfocytów B i NK w okresie obserwacji. W wyniku zabiegów PF (zakończone przed 3 miesiącem) zauważono nieco wyższy odsetek mieloidalnych komórek dendrytycznych (immBDCA1,3) o fenotypie niedojrzałym w porównaniu z grupą kontrolną. Po 3 miesiącach procentowy udział limfocytów CD3 wśród Treg był także znamienne większy w grupie FP niż w kontroli. Ponieważ większość różnic fenotypowych komórek dendrytycznych i regulatorowych zaobserwowano bezpośrednio po zakończeniu cyklu FP (brak różnic po 6 miesiącach), a epizody odrzucania w tej grupie pojawiły się w 6. miesiącu, postuluje się nietrwały efekt przeciwoodrzucający po zakończeniu zabiegów. Nie można wykluczyć, że przy innym schemacie powtarzania zabiegów (np. dodatkowo 2-4 zabiegi po 6 miesiącach) efekt przeciwoodrzucający byłby pełniejszy.

Podsumowanie

W transplantologii poszukuje się obecnie wskaźników, które przewidywałyby tolerancję przeszczepionego narządu. Pozwoliłoby to na precyzyjniejszy dobór siły i rodzaju immunosupresji, a w konsekwencji zmniejszyłoby częstość zachorowania na nowotwory i ciężkie zakażenia. Z wyżej przedstawionych prac wynika, iż w doborze immunosupresji u biorcy przeszczepu nerki należy uwzględnić jego wiek – u starszych osób słabsza immunosupresja (słabsza odpowiedź T-komórkowa; niższa ekspresja CD28 i wyższa indukowana CTLA-4). Podzielam także pogląd, że u osób starszych przy stabilnej czynności

nerki przeszczepionej można z czasem bezpiecznie redukować immunosupresję, a w niektórych sytuacjach (np. nawracające zakażenia) jest to wręcz konieczne.

Zidentyfikowanie korzystnego/niekorzystnego wariantu polimorfizmu genu CTLA-4 mającego wpływ na odległą czynność aloprzeszczepu nerki, może być z kolei wykorzystane w konstruowaniu wieloczynnikowego modelu prognostycznego wskazującego na protolerogenną reakcję układu immunologicznego na aloprzeszczep.

Pozostając w nurcie minimalizowania immunosupresji i poszukiwania dla niej alternatywy przedstawiłem wyniki pionierskich prób immunomodulacji po zabiegu przeszczepienia nerki, polegających na zastosowaniu fotoferezy pozaustrojowej. U 10 biorców otrzymujących standardową immunosupresję zabiegi okazały się bezpieczne, wiązały się z dobrą wczesną czynnością nerki przeszczepionej i niską liczbą powikłań infekcyjnych w porównaniu do kontroli. W przypadku dalszego rozwoju tej obiecującej metody, niezwykle ważna jest z technicznego punktu widzenia możliwość wykorzystania istniejącego, stałego dostępu naczyniowego (przetoki z naczyń własnych lub cewnika tunelizowanego), który do momentu wykonania przeszczepu nerki był używany w hemodializie.

3. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Po wyłączeniu 5 prac oryginalnych stanowiących podstawę Rozprawy Habilitacyjnej mój dorobek naukowy obejmuje (załączniki):

- 29 prac oryginalnych (w tym 24 w języku angielskim)
- 3 prace przeglądowe
- 12 innych prac (5 opisów przypadków, 6 listów do redakcji, 1 praca kontrybutorska)
- 94 doniesienia konferencyjne i wykłady

w tym po uzyskaniu stopnia naukowego **doktora nauk medycznych**:

- 17 prac oryginalnych
- 3 prace przeglądowe
- 12 innych prac
- 59 doniesień konferencyjnych i wykładów

Wyżej wymienione prace oryginalne i przeglądowe zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach, zarówno krajowych jak i zagranicznych (załączniki). W 12 publikacjach jestem pierwszym a w 5 - drugim autorem.

Analiza bibliometryczna moich publikacji daje łączną punktację **IF=50,969**, a punktacja MNiSZW wynosi 658. Po odjęciu 5 prac oryginalnych stanowiących Rozprawę Habilitacyjną punktacja wynosi odpowiednio IF=42,905 i MNiSZW=556.

Na dzień 21 listopada moja liczba cytowań wynosi 122 a index **H=6**.

Dopełnienie dorobku naukowego stanowią także listy do redakcji i streszczenia doniesień konferencyjnych z punktacją MNiSZW=197 i IF=24,596 oraz praca kontrybutorska (IF 38,278).

Jestem członkiem następujących komitetów redakcyjnych:

- World Journal of Nephrology (Baishideng Publishing Group) - członek rady naukowej od V.2012
- NDT-educational.org (portal edukacyjny Europejskiego Towarzystwa Nefrologicznego ERA-EDTA) - członek rady naukowej, konsultant działu hemodializoterapia od 2011

Wykonuję recenzje publikacji dla redakcji czasopism medycznych o zasięgu międzynarodowym. Poniżej znajduje się lista czasopism oraz liczba wykonanych recenzji.

- Archives of Medical Science –18 , od 2008
- Nephrology – 5, od 2006
- OMICS –2 , 2012
- PLOS one –2, 2012
- Archives of Oral Biology – 2, od 2008
- Cytokine –2, od 2011
- DNA and Cell Biology –1, 2010
- Transplant Immunology - 1 , 2006
- International Urology and Nephrology –1, 2010
- Journal of Medical Case Reports – 1, 2007

Moje zainteresowania naukowe i prowadzone badania koncentrują się na kilku tematach:

1. Wpływ czynników immunogenetycznych i klinicznych na funkcję alograftu nerki
2. Indukcja tolerancji i immunomodulacja w transplantologii
3. Problemy hemodializoterapii: dostęp naczyniowy, ocena stanu nawodnienia za pomocą bioimpedancji, pletyzmografia w ocenie ukrwienia ręki
4. Jakość życia zależna od zdrowia, depresja w leczeniu nerkozastępczym

Ad.1 i 2.

Prace i zagadnienia odnoszące się do 1. i 2. tematu w większości przedstawiono w części opisującej rozprawę (punkt 4. autoreferatu). W innych pracach z zakresu transplantologii klinicznej zajmowałem się znaczeniem nacieku eozynofilowego w biopsji nerki, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej a także uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym.

W pracy zainicjowanej przez profesora Jakuba Kuźniara ocenialiśmy stopień aktywacji granulocytów obojętnochłonnych w wyniku procesu reperfuzji, który łączył się z ich masywnym napływem do niedokrwionej nerki. Po raz pierwszy opisaliśmy, że kompleks elastaza i jej inhibitor, oznaczany w osoczu i w moczu, jest czułym wskaźnikiem około przeszczepowej aktywacji granulocytów obojętnochłonnych. Wykazano, że ta aktywacja jest zjawiskiem specyficznym dla uszkodzenia reperfuzyjnego nerki i nie występuje po zabiegach naczyniowych nie obejmujących tego obszaru. Zaobserwowano, że nowy, niestosowany dotąd u biorców przeszczepu, wskaźnik aktywacji granulocytów ma dużą przydatność kliniczną. Wyższe stężenia elastazy i jej inhibitora w moczu w 1 i 3 dniu po zabiegu wiązały się z opóźnionym podejmowaniem czynności przez przeszczepioną nerkę i częstszym występowaniem ostrego odrzucania.

Ad.3.

Optymalny dostęp naczyniowy jest jednym z najważniejszych elementów warunkujących dłuższe przeżycie osób z niewydolnością nerek wymagających hemodializoterapii. W wielu pracach, prowadzonych pod kierunkiem profesora Wacława Weyde i profesora Mariana Klingera, zajmowałem się problemami dostępu naczyniowego występującymi u chorych obciążonych najwyższym ryzykiem niepowodzenia: w podeszłym wieku, chorujących na cukrzycę, ludzi otyłych oraz z zaawansowaną miażdżycą. Stosując odpowiednią strategię postępowania i technikę zabiegu (nawet kilkietapową) udaje się u większości chorych wytworzyć najlepszy dostęp naczyniowy – przetokę tętniczo-żylną z naczyń własnych.

W opublikowanej analizie wieloletnich wyników dotyczących wytwarzania przetok tętniczo-żylnych u osób po 75 r.ż. okazało się, że pomimo istnienia licznych trudności związanych z chorobami towarzyszącymi i wiekiem udaje się jednak u wielu pacjentów uzyskać funkcjonującą przetokę. Warunkiem jest indywidualne podejście do pacjenta, co nierzadko wiąże się z wieloma próbami wytworzenia przetoki i stosowaniem różnych technik chirurgicznych. Oryginalnym osiągnięciem zespołu pracującego pod kierunkiem profesora Wacława Weyde jest opracowanie jednej z metod wytwarzania przetoki tętniczo-żylną (z wykorzystaniem żyły przeszywającej) jako alternatywy w przypadku zniszczenia żył przedramienia. W pracy opublikowanej na łamach American Journal of Kidney Disease przedstawiono technikę zabiegu, warianty anatomiczne oraz odległe w czasie wyniki.

Wykonując badania pletyzmograficzne ustaliłem, że podeszły wiek (>75 r.ż.) nie zwiększa istotnie ryzyka wystąpienia niedokrwienia ręki z przetoką tętniczo-żylną na przedramieniu. Kolejnymi problemami związanymi z dostępem naczyniowym, którymi się również zajmowałem, były możliwości uzyskania dostępu naczyniowego u osób otyłych oraz „naprawa” starej przetoki u chorych z niewydolnym alograftem nerki.

W jednym z listów do Nephrology Dialysis Transplantation przedstawiłem przypadek hemofilika poddawanego hemodializie, omawiając zarazem problem antykoagulacji podczas zabiegu.

W pracy opublikowanej na łamach Blood Purification przedstawiłem wyniki zastosowania bioimpedancji w ocenie stanu nawodnienia/przewodnienia pacjentów hemodializowanych. Oprócz danych uzyskanych z pomiaru bioimpedancji analizowałem inne parametry stanu nawodnienia jak np. ANP, średnica żyły czczej dolnej, wielkość erytrocytu. Ważnym spostrzeżeniem było stwierdzenie znamienne większego przewodnienia w przedziale wewnątrzkomórkowym w grupie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym niż w grupie z normotensją. Pacjenci hemodializowani z nadciśnieniem tętniczym w celu uzyskania normowolemii powinni mieć prawdopodobnie dłuższy tygodniowy czas dializy.

Ad.4.

Badaniem jakości życia zależnej od zdrowia (skrót ang. HRQoL) zainteresowałem się pod koniec studiów medycznych, działając w studenckim kole naukowym. Efektem były dwa badania kwestionariuszowe: przeprowadzane wśród pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek wymagających dializowania, a także wśród pacjentów z przelykiem zrekonstruowanym z powodu schorzeń nienowotworowych. Ustaliłem, że w przypadku osób dializowanych po 65 r.ż. w 5 na 7 ocenianych kategorii jakości życia nie doszło do istotnego pogorszenia wyników w porównaniu z ich zdrowszymi rówieśnikami bez choroby nerek. Znaczne różnice

dotyczące praktycznie wszystkich domen HRQoL obserwowano w populacji młodszej (<65 r.ż.).

Badanie oceniające HRQoL (kwestionariusz SF-36) u pacjentów z zrekonstruowanym przełykiem (schorzenia nienowotworowe) okazało się na tyle pionierskie, że wyniki zostały opublikowane w 2004r. na łamach American Journal of Surgery. Jakość życia tej grupy pacjentów, zazwyczaj bez innych schorzeń przewlekłych, w większości zbadanych domen była porównywalna ze zdrowymi rówieśnikami.

Innym ważnym problemem osób dializowanych jest depresja, a także ból. Badania prowadzone we współpracy z dr Ewą Trafidło z zastosowaniem baterii narzędzi psychometrycznych (m.in. HADS, SF-36, VAS, VRS) wykazały, że objawy depresyjne występują u prawie 30%, a ból przewlekły o różnym nasileniu u prawie połowy dializowanych. Najczęściej chorzy skarżyli się na ból kostno-stawowy. W tej grupie częściej stwierdzano depresję, a także wysokie stężenie PTH, będące wyrazem wtórnej nadczynności przytarczyc. Wstępne wyniki tych badań przedstawiano na międzynarodowych konferencjach w formie doniesień oraz listu do redakcji (Kidney Int.)

Badania naukowe, w ramach których powstała większość moich opracowań, były lub są prowadzone w oparciu o następujące źródła finansowania:

1. Grant KBN nr 2PO5B04826 (2004-2006, zakończony): "Badanie powiązań między polimorfizmem genu CTLA4 a wystąpieniem reakcji ostrego i przewlekłego odrzucania u biorców przeszczepów nerek" (wykonawca grantu).
2. Grant MNiSW nr N402178934 (2008-2011, zakończony): „Zastosowanie fotoferezy pozaustrojowej w indukcji tolerancji immunologicznej i leczeniu odrzucania alop przeszczepu nerki” (kierownik grantu)

Granty w ramach badań własnych Uczelni:

3. 2004-2005r. „Ocena występowania kompleksów immunologicznych zawierających przeciwciała przeciw HSP90 w wycinkach nerek od chorych na toczeń trzewny układowy w powiązaniu z typem morfologicznym wg klasyfikacji WHO i przebiegiem klinicznym nefropatii toczniowej.” (wykonawca grantu).
4. 2005-2007, „Zastosowanie pletyzmografii powietrznej i fotopletyzmografii w ocenie stanu nawodnienia chorych dializowanych a także w diagnostyce zespołu podkradania związanego z przetoką tętniczo-żylną” (wykonawca grantu)

5. 2007-2009r. „Wpływ wysiłku fizycznego podczas zabiegu hemodializy na istotne parametry biochemiczne i kliniczne chorych na schyłkową niewydolność nerek” (kierownik grantu)
6. 2008-2010, „Alloprzeszczepy nerek - ocena wpływu właściwości genetycznych odpowiedzi immunologicznej na bezpośrednią i odległą funkcję przeszczepionej nerki” (wykonawca grantu)
7. 2008-2010, „Określenie znaczenia nowych wskaźników zagrożenia powikłaniami sercowo-naczyniowymi u pacjentów w programie hemodializacji”, (wykonawca grantu)
8. 2011-2012, „Alloprzeszczepy nerek - monitorowanie odpowiedzi immunologicznej biorcy przeszczepu” (wykonawca grantu)
9. 2012r. „Ocena przydatności nowego wskaźnika adekwatności dializy Kt/R (klirens x czas dializy /rezystancja bioelektryczna) w indywidualizacji dializoterapii” (kierownik grantu)

Nagrody i wyróżnienia

1. Ministra Zdrowia zespołowa za publikację „Plasma and urine leukocyte elastase- α 1 protease inhibitor complex as a marker of early and long-term kidney graft function”, Warszawa, 26.09.2011
2. Ministra Zdrowia zespołowa za publikację „IL-18 is involved in vascular injury in end-stage renal disease patients”, Warszawa, 19.12.2009
3. Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu zespołowa za cykl monotematycznych publikacji o dostępie naczyniowym w hemodializie, 2009
4. Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu zespołowa za cykl prac dotyczących leczenia schyłkowej niewydolności nerek za pomocą przeszczepienia nerki, 2007
5. Rektora Akademii Medycznej we Wrocławiu zespołowa za cykl prac na temat leczenia nerkozastępczego, 2006
6. Europejskiego Towarzystwa Nefrologicznego (ERA-EDTA) za pracę zaprezentowaną na kongresie Monachium, 28.06.2010

7. Europejskiego Towarzystwa Nefrologicznego (ERA-EDTA) za pracę zaprezentowaną na kongresie Barcelona, 24.06.2007
8. Europejskiego Towarzystwa Nefrologicznego (ERA-EDTA) za pracę zaprezentowaną na kongresie Istanbuł, 7.06.2005
9. Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego zespołowa za cykl prac o łącznym IF 24,707, Kraków, 15.05.2009
10. Polskiego Towarzystwa Transplantacyjnego za wprowadzenie do praktyki klinicznej nowej metody - fotoferezy pozaustrojowej, Ossa, 9.06.2011

Poza licznymi prezentacjami ustnymi i plakatowymi prac oryginalnych na konferencjach byłem także zaproszony do wygłoszenia referatów:

I. Tours, Francja 14-15.06.2010: 6th International Meeting of the Vascular Access Society,

1. *"The ulnar-basilic fistula"*

2. *"Fistula superficialization"*

3. *"Rare fistulas"*

II. Praga, Republika Czeska 23.06.2011: ERA-EDTA CME Courses "Vascular Access"

1. *"Arteriovenous fistula superficialization"*

III. X Krakowskie Dni Dializoterapii 7.09.2012

1. *"Niedojrzała przetoka dializacyjna – strategia postępowania"*

Członkostwo w towarzystwach naukowych

European Renal Association (ERA-EDTA), 2006, 2009, 2012

The Transplantation Society 2012

Polskie Towarzystwo Transplantacyjne od 2006

Polskie Towarzystwo Nefrologiczne od 2005

Polskie Towarzystwo Immunogenetyczne od 2009

Działalność dydaktyczno-wychowawcza

Oprócz pracy naukowej prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami III, IV i V roku Wydziału Lekarskiego i Lekarsko-Stomatologicznego.

Do sukcesów w działalności dydaktycznej zaliczam moją inicjatywę i opracowanie kursu „Metodologia badań naukowych” dla słuchaczy studiów III stopnia w Akademii Medycznej we Wrocławiu w 2006r. Tego rodzaju program nie był wcześniej realizowany w mojej uczelni na żadnym etapie kształcenia lekarzy, nawet w kształceniu podyplomowym. Obecnie jestem jednym z prowadzących ten kurs (od 4 lat), a poszerzony program realizujemy na 3 semestrach.

Od 2011 r. jestem opiekunem Studenckiego Koła Naukowego przy Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej. Członkowie koła zdobyli 1. i 3. nagrodę na XVII Ogólnopolskiej Konferencji Studenckich Kół Naukowych Uczelni Medycznych we Wrocławiu za prezentacje w języku angielskim w sesji Case Reports.

W bieżącym roku (2012) studenci z SKN przygotowali pod moim nadzorem fotoreportaż pt. „Nerkowcy”, który ilustruje życie i pracę pacjentów dializowanych i po przeszczepie nerki. Fotoreportaż miał za zadanie szerzenie wśród wrocławian idei świadomego dawstwa narządów oraz zapoznanie z ograniczeniami życia codziennego osób z niewydolnymi nerkami. Wystawa miała miejsce w okolicach wrocławskiego Rynku oraz w gmachu Politechniki Wrocławskiej i Wydziału Farmaceutycznego UM we Wrocławiu.

Wraz z członkami Studenckiego Koła Nefrologii zorganizowaliśmy konferencję popularyzującą wiedzę na temat przeszczepiania narządów pt. „Studenci o Przeszczepach”. W konferencji, która odbyła się 14.12.2012, uczestniczyli studenci różnych uczelni, a także uczniowie szkół średnich. Mieli oni okazję usłyszeć od ekspertów w jaki sposób stwierdza się śmierć mózgu, jak przebiega procedura kwalifikacji do przeszczepu, kto może być dawca a kto biorcą narządów.

Aktywnie uczestniczę w szkoleniu podyplomowym lekarzy prowadząc wykłady w ramach kursów CMKP: „Diagnostyka i leczenie pierwotnych i wtórnych nefropatii”, „Dializoterapia”, „Transplantologia kliniczna”.

Tłumaczyłem rozdziały z języka angielskiego do polskich wydań następujących podręczników:

1. Eugene Braunwald. „Harrison's Advances In Cardiology”. McGraw-Hill 2003. Polskie wydanie – „Postępy w kardiologii Harrisona”- Wydawnictwo Czelej 2005

2. John T.Daugirdas, Peter G.Blake, Todd S. Ing. "Handbook of dialysis". Lippincott Williams 2007. Polskie wydanie – „Podręcznik dializoterapii”- Wydawnictwo Czelej 2008
3. Eugene Braunwald. „ Harrison's Principles of Internal Medicine”. McGraw-Hill 2008. Polskie wydanie – „Interna Harrisona”- Wydawnictwo Czelej 2009

Działalność organizacyjna i popularyzująca naukę

Od 2008 r. do chwili obecnej (druga kadencja) jestem członkiem Rady Wydziału Kształcenia Podyplomowego UM we Wrocławiu. Uczestniczę w komisjach wydziałowych (oceny kursów podyplomowych, obsady stanowisk kierowników klinik) oraz jestem sekretarzem komisji przeprowadzających obronę rozpraw doktorskich.

Od 2006 r. jestem wykładowcą Dolnośląskiego Festiwalu Nauki, gdzie przybliżam uczniom wrocławskich szkół problemy patofizjologii chorób nerek, transplantologii i nowoczesnych technologii medycznych.

W 2008 r. wziąłem udział w opracowaniu programu Riset „Transplantation Research Integration in Europe” - workshop on transplantation research in Europe.

W 2009 r. byłem członkiem Zespołu Ekspertów Zewnętrznych ds. Analiz Delphi Narodowego Programu Foresight Polska 2020 (certyfikat MNiSW).


.....

Wrocław, 31.12.2012