

**dr n. med. Maria Fornal**  
**Katedra Chorób Wewnętrznych i Gerontologii**  
**Collegium Medicum**  
**Uniwersytet Jagielloński**  
**Kraków**

**ZAŁĄCZNIK 2**

## **AUTOREFERAT**

**do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego**

**Kraków**

**Listopad 2013**

## SPIS TREŚCI

1. Dane osobowe .....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu .....	4
4. Wskazanie osiągnięcia .....	5
4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego .....	5
4.2 Cykl prac monotematycznych (tytuły, autorzy, rok wydania, nazwa wydawnictwa).....	5
4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	6
- Kontekst oraz cel badań. ....	6
- Zastosowane techniki pomiarowe .....	8
- Badanie sztywności erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej .....	10
- Badanie korelacji pomiędzy własnościami reologicznymi erytrocytów i zmianami narządowymi u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej .....	11
- Struktura błony i cytoszkieletu erytrocytów a zdolność przepuszczalności dla O <sub>2</sub> u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej.....	15
- Zależności pomiędzy rozpiętością rozkładu objętości erytrocytów a markerami zapalnymi i zmianami narządowymi u pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym.....	16
- Podsumowanie .....	17
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych .....	19
5.1 Prace badawcze nie wchodzące w zakres osiągnięcia .....	19
- Epidemiologia białaczek w Krakowie i na obszarze obecnego woj. małopolskiego.....	19
- Choroba Wilsona i jej diagnostyka .....	21
- Wpływ promieniowania jonizującego na erytrocyty .....	21
- Badania struktury cytoszkieletu różnych rodzajów komórek za pomocą AFM .....	22
- Epidemiologia i profilaktyka chorób układu sercowo-naczyniowego .....	23
5.2 Udział w projektach badawczych.....	25
5.3 Referaty wygłoszone na konferencjach międzynarodowych .....	26
5.4 Członkostwo w towarzystwach naukowych .....	26
5.5 Współczynniki bibliometryczne .....	27
6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna .....	27

## Autoreferat

1. **Imię i Nazwisko:**     **MARIA FORNAL**
  
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**
  - 24.06.1982**           dyplom lekarza Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej im. M. Kopernika w Krakowie (L. 6291/77/82)
  
  - 22.11.1989**           dyplom pierwszego stopnia specjalizacji w zakresie chorób wewnętrznych wydany przez Wydział Zdrowia i Opieki Społecznej Urzędu Miasta Krakowa (Nr 130. 1989)
  
  - 19.04.1995**           dyplom specjalisty drugiego stopnia w zakresie chorób wewnętrznych wydany przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie (Nr 17686/6/I/1995)
  
  - 20.11.1998**           obrona pracy doktorskiej „*Zachorowalność i przeżycia na białaczki w Krakowie w latach 1981-1990*” oraz uzyskanie stopnia „doktora nauk medycznych” w Collegium Medicum UJ; promotor: Prof. dr hab. n. med. Kazimierz Janicki
  
  - 29.04.2009**           dyplom specjalisty w dziedzinie geriatrici wydany przez Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi (Nr 0744/ 2009.1/4)

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

- 1982** ukończyłam studia na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej im M. Kopernika w Krakowie
- 1982 - 1988** pracowałam jako lekarz w ZOZ nr 4 „Podgórze” w Krakowie oraz odbywałam wolontariat w I Klinice Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej im Mikołaja Kopernika w Krakowie
- 1985 - 1987** odbywałam praktykę kliniczną (w ramach wolontariatu) w Szpitalu Uniwersyteckim w Padwie, we Włoszech - Ospedale Universitario di Padova
- 1988 - 1990** pracowałam na stanowisku asystenta w I Klinice Chorób Wewnętrznych AM w Krakowie na etacie Państwowego Szpitala Klinicznego
- 1990 - 1999** byłam zatrudniona jako asystent w I Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika (od 1993 r. w Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego) w Krakowie oraz w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie
- 1991 - 1992** odbyłam staż naukowy w Biomedical Engineering Department, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA: udział w eksperymentalnych przeszczepach naczyń u zwierząt. Jednocześnie gromadziłam dane statystyczne dotyczące epidemiologii białaczek w stanach Indiana i Iowa potrzebne do przygotowywanej rozprawy doktorskiej
- 1999 - 2009** pracowałam jako adiunkt w I Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (przemianowanej później na Katedrę Chorób Wewnętrznych i Gerontologii CM UJ) oraz jako starszy asystent w Szpitalu Uniwersyteckim
- od 2009** pracuję na stanowisku starszego wykładowcy w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Gerontologii CM UJ (1/2 etatu) oraz starszego asystenta w Poradni Podstawowej Opieki Zdrowotnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

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.):**

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl ośmiu prac monotematycznych: „**Własności reologiczne i morfologiczne erytrocytów a zmiany narządowe i naczyniowe u pacjentów z wybranymi czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Modyfikacja własności błony i cytoszkieletu erytrocytu w nadciśnieniu tętniczym**”.

4.2 Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

1. Lekka M., **Fornal M.**, Pyka-Fościak G., Lebed K., Styczeń J., Grodzicki T., Wizner B.: *Erythrocyte Elasticity Probed Using Atomic Force Microscope*. *Biorheology* 2005, 42 (4): 307-317. **IF: 1.414**
2. **Fornal M.**, Lekka M., Pyka-Fościak G., Lebed K., Styczeń J., Grodzicki T., Wizner B.: *Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with Atomic Force Microscope*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2006, 35 (1-2): 273-276. **IF: 1.242**
3. **Fornal M.**, Korbut R.A., Lekka M., Pyka-Fościak G., Wizner B., Styczeń J., Grodzicki T.: *Rheological properties of erythrocytes in patients with high risk of cardiovascular disease*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2008, 39(1-4): 213-9. **IF: 1.814**
4. **Fornal M.**, Korbut R.A., Królczyk J., Grodzicki T.: *Left ventricular geometry and rheological properties of erythrocytes in patients at cardiovascular disease risk*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2009, 43(3), 201-206. **IF: 1.780**
5. **Fornal M.**, Korbut R.A., Królczyk J., Grodzicki T.: *Evolution of rheological properties of erythrocytes and left ventricular geometry in cardiovascular disease risk patients*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2010, 45(2-4), 155-9. **IF: 2.838**
6. **Fornal M.**, Korbut R.A., Grodzicki T.: *Relevance of erythrocyte deformability to the concentration of soluble cell adhesion molecules and glomerular filtration rate in patients with untreated essential hypertension*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2011, 49, 323–329. **IF: 3.398**
7. Kaczmarek M., **Fornal M.**, Messerli F.H., Korecki J., Grodzicki T., Burda K.: *Erythrocyte Membrane Properties in Patients with Essential Hypertension*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, published online [ahead of print]: 15 May 2013. **IF: 1.912**
8. **Fornal M.**, Wizner B., Cwynar M., Królczyk J., Kwater A., Korbut R.A., Grodzicki T.: *Association of red blood cell distribution width, inflammation markers and morphological as well as rheological erythrocyte parameters with target organ damage in hypertension*. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, published online [ahead of print]: 29 May 2013.

Sumaryczny „impact factor” prac stanowiących osiągnięcie naukowe: **14.398**

#### 4.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przedstawiony cykl prac zawiera opis oraz wyniki programu badań, który zaproponowałam i rozwinęłam w Katedrze Chorób Wewnętrznych i Gerontologii CM UJ, począwszy od 2004 r., we współpracy: z grupą Pani Prof. Małgorzaty Lekkiej z Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie, z grupą Pani Prof. Květoslavy Burdy z Akademii Górniczo Hutniczej w Krakowie oraz z grupą Pana Prof. Ryszarda Korbuta z Katedry Farmakologii CM UJ. Poniżej zaprezentowane są założenia, cele oraz główne wyniki tego programu badawczego. W badaniach wykorzystano nowatorskie metody oceny własności reologicznych, morfologicznych i biochemicznych erytrocytów u osób z nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią lub cukrzycą.

#### **Kontekst oraz cel badań**

Prawidłowy erytrocyt jest komórką bezjądrzastą, w kształcie dwuwklęsłego dysku o średnicy około 7,5  $\mu\text{m}$  i o powierzchni ok. 120  $\mu\text{m}^2$ . Otoczony jest podwójną asymetryczną błoną lipidową, zawierającą w swoim składzie fosfolipidy, cholesterol i glikolipidy, rozpostartą na elastycznej sieci białek cytoszkieletu. Błona komórkowa bogata jest również w różnego rodzaju białka: niektóre z nich znajdują się tylko na powierzchni błony (białka kontaktowe lub receptorowe), inne natomiast penetrują w głąb, dochodząc do cytoszkieletu. Te wewnętrzne białka błony, szczególnie białko pasma 3 (zw. białkiem przenoszącym aniony) i cztery spośród pięciu glikoforyn (A-D), mocują błonę komórkową do cytoszkieletu i odgrywają znaczącą rolę w utrzymaniu integralności erytrocytu. Ponadto glikoforyny, a w szczególności glikoforyna A, ze względu na obecność kwasu sialowego, nadają błonie ujemny ładunek, umożliwiając erytrocytom przemieszczanie się w krwiobiegu, bez przylegania do innych komórek i do śródbłonna naczyniowego. Elastyczny cytoszkielet białkowy utworzony jest z sieci białek, do których należą m.in.: spektryna, aktyna, ankiryne, białka 4,1, 4,2, 4,9, p55 oraz adducyna. To właśnie białka cytoszkieletu odpowiedzialne są za dwuwklęsły kształt erytrocytu.

Spektryna, główne białko cytoszkieletu, stanowiąca 75% jego masy, zbudowana jest z dwóch stabilnych dimerów polipeptydowych, sprzężonych w tetramery. Białka te tworzą dwuwymiarowe struktury penta-, hexa- i hepta-gonalne, pozostające w łączności z białkami integralnymi błony lipidowej erytrocytu poprzez dwa główne kompleksy białek kotwiczących. Za stabilność struktur heksagonalnych odpowiadają m. in. połączenia spektryna-aktyna-adducyna. Wnętrze erytrocytu wypełnione jest roztworem wodnym hemoglobiny, która, będąc połączeniem białka z cząsteczką hemu, odgrywa podstawową rolę w procesie przenoszenia tlenu w organizmie.

Zdolność docierania do wszystkich tkanek w organizmie zapewniają erytrocytom ich unikalne własności mechaniczne, tj. możliwość odkształcania pozwalająca na szybką i odwracalną zmianę

kształtu podczas ekspozycji na działanie wewnątrznaczyniowych naprężeń ścinających (shear stress), czy też w czasie przeciskania się przez naczynia włosowate o średnicy 1-2.5  $\mu\text{m}$ . Podstawowymi czynnikami determinującymi wysoką odkształcalność erytrocytów są: a) duża wartość powierzchni komórki w stosunku do jej objętości, b) wyjątkowa stabilność i płynność błony komórkowej, c) stosunkowo mała lepkość cytoplazmy, d) elastyczny cytoszkielet, który może swobodnie rotować wokół cytoplazmy. Dotychczasowe prace wykazały także, że na odkształcalność erytrocytów duży wpływ mają połączenia cytoszkieletu z białkami błony komórkowej, jak i stężenie hemoglobiny w cytoplazmie, którego wzrost pogarsza przepływ erytrocytów przez kapilary.

Transport tlenu cząsteczkowego do tkanek za pośrednictwem erytrocytów jest m. in. determinowany przez zdolność przyłączania  $\text{O}_2$  do cząsteczek hemoglobiny w płucach i oddawania go na obwodzie. Proces w dużej mierze zależy od przepuszczalności błony erytrocytu dla  $\text{O}_2$ , którą warunkuje z kolei struktura błony i cytoszkieletu krwinek.

Pierwotne własności fizyko-chemiczne erytrocytów nabyte w procesie erytropoezy podlegają ciągłym modyfikacjom, wynikającym z niekorzystnych zmian w homeostazie naczyniowej spowodowanej m. in. dysfunkcją śródbłónka naczyniowego (erytrocyty poddawane są działaniu substancji biorących udział w regulacji procesów zapalnych oraz w oddziaływaniach między komórkami i ścianą naczyń, substancji wpływających na procesy krzepnięcia i fibrylizy, a także substancji o działaniu wazoaktywnym).

O ile wiadomo jest, że dysfunkcja śródbłónka naczyniowego prowadzi do złożonych zaburzeń metabolicznych, których konsekwencją są niepożądane zmiany narządowe obserwowane m. in. w chorobach układu sercowo-naczyniowego, miażdżycy, cukrzycy, czy w dyslipidemiach, o tyle udział erytrocytów w tych procesach jest mało znany. Szczególne znaczenie mogą mieć zmiany własności reologicznych czerwonych krwinek. Erytrocyty o pogorszonej odkształcalności, przeciskając się z trudem przez kapilary o przeciętnej średnicy 1 – 2.5  $\mu\text{m}$ , zaburzają przepływ krwi i transport tlenu, co w konsekwencji może prowadzić do upośledzenia perfuzji tkankowej i wtórnych zmian narządowych. Dane dostępne w literaturze na temat istnienia związku przyczynowego pomiędzy zaburzeniami własności reologicznych czerwonych krwinek a zmianami narządowymi u osób z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego nie są jednoznaczne.

Także wrodzone lub nabyte zmiany własności fizyko-chemicznych błony lub cytoszkieletu erytrocytu mogą pogarszać wymianę  $\text{O}_2$  i tym samym prowadzić do obwodowej hipoksji i wtórnych zmian narządowych. Związek pomiędzy występowaniem nadciśnienia tętniczego i zaburzeniami transferu tlenu z hemoglobiny do tkanek nie jest jednak w pełni zbadany.

Oba przedstawione wyżej zagadnienia stanowiły przesłankę do zaproponowania i poprowadzenia przeze mnie programu badawczego, który miał na celu zbadanie istnienia zależności pomiędzy:

- a) zmianami własności reologicznych erytrocytów a stopniem niekorzystnych zmian narządowych u pacjentów z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego takimi jak: nadciśnienie tętnicze, hipercholesterolemia i cukrzyca,
- b) zmianami własności morfologicznych erytrocytów a stopniem zaawansowania zmian narządowych u osób z nowo rozpoznanym i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym oraz zaburzeniami lipidowymi,
- c) własnościami fizyko-chemicznymi błony i cytoszkieletu erytrocytów, w szczególności strukturą sieci białek cytoszkieletu, a zdolnością wymiany  $O_2$  przez błonę u pacjentów z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym.

Stwierdzenie istnienia wymienionych zależności z jednej strony dostarczyłoby informacji na temat nowych przyczyn zmian narządowych u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, z drugiej strony stanowiłoby istotną informację kliniczną, którą należałoby uwzględnić podczas podejmowania działań terapeutycznych.

### Zastosowane techniki pomiarowe

Badania prowadziliśmy z wykorzystaniem zarówno innowacyjnych technik pomiarowych i diagnostycznych, jak i metod tradycyjnych. Sztywność erytrocytów oraz topografię ich struktur powierzchniowych określaliśmy za pomocą **mikroskopu sił atomowych** (*Atomic Force Microscope – AFM*). Technika ta umożliwia prowadzenie pomiaru w warunkach fizjologicznych. Erytrocyty, zanurzone w roztworze PBS, zostają przytwierdzone do podłoża polimerowego a następnie są próbkowane ostrzem AFM. Sztywność krwinki w miejscu nacisku wyznacza się, analizując zależność siły nacisku od wielkości ugięcia powierzchni erytrocytu (tzw. krzywe siłowe) i wyraża się ją poprzez wartość modułu Younga (YM) w paskalach (Pa). W danej próbce krwi pomiarowi poddaje się zwykle kilkadziesiąt przypadkowo wybranych erytrocytów, z których każdy próbkuje się w obrębie zaznaczonej powierzchni o rozmiarze średnio  $1 \mu m^2$ , zbierając ok. 100 krzywych siłowych. Sumarycznie otrzymuje się kilka tysięcy wartości YM dla badanej próbki krwi. Wyniki przedstawia się w postaci histogramu modułu Younga, który charakteryzuje daną próbkę krwi – odzwierciedla on nie tylko średnią sztywność krwinek, ale także zróżnicowanie ich sztywności w mierzonej próbce.

Za pomocą AFM prowadzone było także precyzyjne obrazowanie powierzchni erytrocytów. Pomiaru wykonywane były w ciekłej komorze przy użyciu modu pracy „non-kontakt”. Uwidoczniona została przestrzenna struktura powierzchni z rozdzielczością około 2 nm. AFM umożliwił także wgląd w budowę cytoszkieletu. Ponieważ pomiary były prowadzone przy częściowym odwodnieniu komórek, na sporządzonej mapie topograficznej erytrocytu uwidoczniły się (poprzez błonę erytrocytu, której grubość wynosi około 4 nm) struktury siatki cytoszkieletu. Na podstawie analizy mapy topograficznej można było wyciągać wnioski na temat organizacji tej siatki, a tym samym na temat układu połączeń spektryna-aktyna-adducyna.

Odkształcalność erytrocytów, czyli ich podatność na wydłużenie przy danym naprężeniu ścinającym, mierzyliśmy za pomocą **laserowego dyfraktometru** (Rheodyn), w którym wykorzystywane jest światło laserowe rozpraszane na krwinkach. Światło lasera, przechodząc przez warstwę krwinek czerwonych zawieszonych w roztworze PBS umieszczonym pomiędzy rotującymi tarczami, ulega ugięciu, dając obraz dyfrakcyjny na ekranie projekcyjnym. Kształt obrazu dyfrakcyjnego zależy od wartości naprężenia ścinającego działającego na krwinkę podczas rotacji. Dla niskich prędkości obrotowych, czyli małych wartości naprężeń ścinających, obraz jest okręgiem. W miarę wzrostu prędkości rotacji, a tym samym naprężeń, kształt obrazu dyfrakcyjnego staje się coraz bardziej wydłużoną elipsą. Na podstawie obrazu dyfrakcyjnego rejestrowanego przez komputer, automatycznie wyznaczane są długości osi długiej „a” i krótkiej „b” elipsy oraz wyliczany jest indeks deformacyjności,  $DI=(a-b)/(a+b)$ , przy danym naprężeniu ścinającym. Indeks deformacyjności jest miarą odkształcalności krwinek czerwonych.

Część jąder atomów żelaza, 2.119%, wchodzących w skład hemu jest izotopem  $^{57}\text{Fe}$  o liczbie masowej 57, dla którego obserwuje się zjawisko bezdrzutowej emisji i absorpcji promieniowania gamma. Stąd też do badania m. in. przekazywania przez erytrocyt  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  idealnie nadaje się **spektroskopia mössbauerowska**. Metoda ta zapewnia wysoką czułość detekcji zmian stanów hemoglobiny w erytrocytach poprzez monitorowanie stanu walencyjnego i spinowego atomów żelaza oraz otoczenia chemicznego ich pierwszej sfery koordynacyjnej. Można w ten sposób określać np. ilość hemoglobiny utlenowanej, OxyHb, w stosunku do odtlenowanej, DeoxyHb. Spektroskopię mössbauerowską zastosowaliśmy do badania przepuszczalności błony erytrocytów dla  $\text{O}_2$  oraz odwracalności wiązania cząsteczki tlenu przez odtlenowaną hemoglobinę. Próbki do pomiaru widm były zagęszczane (ok.  $8 \times 10^8$  komórek/ml) i przechowywane w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ . Tuż przed pomiarem mössbauerowskim próbka była przedmuchiwana przez 30 minut w strumieniu par azotu celem odtlenowania znajdującej się w niej hemoglobiny, a następnie zamykana i zamrażana do temperatury ciekłego azotu. Później, pozostając ciągle w niskiej temperaturze, umieszczana była w powietrzu, co zapewniało dyfuzję  $\text{O}_2$  do hemoglobiny. W trakcie procesu dyfuzji rejestrowano widma mössbauerowskie (pomiar trwał po 30 minut) w odstępach 60 minut, co pozwalało na monitorowanie zmian stosunku ilości hemoglobiny OxyHb do hemoglobiny DeoxyHbOH w funkcji czasu. Proces dochodził do równowagi po upływie 6-8 godzin. Wynikiem pomiaru były czasowe zależności procentowych zawartości OxyHb i DeoxyHbOH w hemoglobinie.

Zmiany narządowe i naczyniowe u pacjentów z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, czy hipercholesterolemią oceniane były za pomocą dostępnych metod diagnostycznych:

- badania echokardiograficznego dwuwymiarowego z oceną dopplerowską - badano parametry geometrii i dynamiki lewej komory serca,
- badania ultrasonograficznego tętnic szyjnych z oceną kompleksu błony środkowej i wewnętrznej (Intima Media Thickness - IMT),

- badania własności elastycznych ścian dużych naczyń tętniczych z wykorzystaniem tonometrii aplanacyjnej (Pulse Wave Velocity - PWV).

Funkcję śródbłonna oceniano na podstawie oznaczenia w surowicy krwi markerów (metodą ELISA): IL-6, IL-18, 6-keto-prostaglandyny  $F1\alpha$  ( $PGF1\alpha$ ) oraz cząsteczek adhezyjnych: selektyny E, sICAM-1, sVCAM-1, a także oznaczenia wskaźnika aktywności fibrynolitycznej osocza PAI-1.

### **Badanie sztywności erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo naczyniowej**

Pierwszym przedsięwzięciem badawczym w ramach zaproponowanego programu było pionierskie zastosowanie techniki pomiaru sztywności obiektów biologicznych opartej o mikroskop sił atomowych do wyznaczania sztywności erytrocytów. Badaniom poddaliśmy krew pacjentów leczonych z powodu co najmniej jednego z następujących schorzeń: choroby niedokrwiennej serca, nadciśnienia tętniczego, cukrzyca, niewydolności serca (44 osoby) [**PRACA 1: „Erythrocyte Elasticity Probed Using Atomic Force Microscope”**]. Identyczne pomiary zostały przeprowadzone także dla 13 osób zdrowych. W przypadku każdego pacjenta próbkowane było około 20 erytrocytów, przy czym każdy erytrocyt w około 20 punktach. Jako wynik otrzymaliśmy średnie wartości i rozkłady modułu Younga czerwonych krwinek dla każdej próbki krwi. Analiza statystyczna uzyskanych danych wykazała, w stosunku do osób zdrowych, istotnie wyższą sztywność erytrocytów (wyrażoną poprzez średnią wartość modułu Younga) u pacjentów z cukrzycą ( $p < 0.009$ ) oraz u osób palących ( $p < 0.002$ ) i była skorelowana z wiekiem ( $p < 0.03$ ). Podobnie, szerokość rozkładu wartości modułu Younga erytrocytów była wyższa w przypadku pacjentów z cukrzycą ( $p < 0.03$ ) oraz osób palących papierosy ( $p < 0.003$ ). Zmiany sztywności błony erytrocytu mogą z jednej strony wynikać ze zmian składu samej błony, z drugiej strony z reorganizacji białek cytoszkieletu (ostrze mikroskopu ugina błonę do ok. 500 nm głębokości). Zwiększenie sztywności erytrocytów, a tym samym zmniejszenie ich własności sprężystych i zdolności do odkształcania u pacjentów z cukrzycą, może, zgodnie z dostępną wiedzą, wynikać: a) ze zmiany struktury chemicznej błony (w szczególności ze zmiany stosunku fosfolipidów i cholesterolu w błonie, czy degradacji ankiryny poprzez reaktywne formy tlenu), b) ze zmiany aktywności  $Na^+K^+$ -ATPazy, c) z nasilonej nieenzymatycznej glikozylacji globiny hemoglobiny oraz białek błony erytrocytu. Wzrost sztywności czerwonych krwinek zaobserwowany u osób palących idzie z kolei w parze z wcześniejszymi doniesieniami o niekorzystnym wpływie palenia tytoniu na odkształcalność erytrocytów, prawdopodobnie poprzez wzrost stężenia hemoglobiny oraz poprzez niekorzystny wpływ białek odczynu zapalnego na błonę.

W szerszej perspektywie, przeprowadzone badania pokazały, że za pomocą mikroskopu sił atomowych można zmierzyć nie tylko średnią wartość sztywności erytrocytów w badanej próbce krwi, ale też rozkład wartości tej sztywności. Uzyskane w ten sposób informacje dostarczają nowej,

wcześniej niedostępnej wiedzy dotyczącej własności elastycznych błony komórkowej oraz cytoszkieletu czerwonych krwinek.

Nowo opracowaną technikę pomiaru sztywności erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych zastosowaliśmy do celowanych pomiarów u pacjentów z zaawansowaną cukrzycą typu II (7 osób) oraz osób zdrowych (8 osób) stanowiących grupę kontrolną [**PRACA 2: „Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with Atomic Force Microscope”**]. Wyniki pokazały, że sztywność erytrocytów wyrażona poprzez średnią wartość modułu Younga u osób chorujących na cukrzycę,  $YM_{av} = 14.3 \pm 1.4$  kPa, jest wyższa około 3.3 razy w stosunku do grupy kontrolnej, w której  $YM_{av} = 4.4 \pm 0.6$  kPa. Podobnie, szerokość rozkładu wartości modułu Younga,  $W_{av}$ , okazała się być ponad 4 razy wyższa u pacjentów z cukrzycą,  $W_{av} = 13.0 \pm 2.0$  kPa, w porównaniu z osobami zdrowymi, gdzie  $W_{av} = 3.0 \pm 0.6$  kPa. Warto zauważyć, że stosując klasyczną technikę dyfraktometrii laserowej, pomiary odkształcalności czerwonych krwinek w cukrzycy pokazują pogorszenie odkształcalności w granicach 20-50% w stosunku do pacjentów zdrowych. Wobec tego sztywność erytrocytów określana za pomocą mikroskopu sił atomowych jest, w przypadku cukrzycy, bardziej czułym parametrem reologicznym.

#### **Badanie korelacji pomiędzy własnościami reologicznymi erytrocytów i zmianami narządowymi u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej**

Kolejna część programu badawczego polegała na kompleksowej analizie danych laboratoryjnych i klinicznych w grupie osób z podwyższonym ryzykiem choroby sercowo-naczyniowej (*cardiovascular disease* – CVD). Celem było poszukiwanie zależności pomiędzy parametrami określającymi własności reologiczne erytrocytów takimi jak odkształcalność, czy agregacyjność, oraz a) poziomem markerów funkcji śródbłonna: selektyny E, sICAM-1, sVCAM-1, interleukiny-6 (IL-6), 6-keto-prostaglandyny  $F1\alpha$  (PGF $1\alpha$ ), b) parametrami morfologii krwi, c) parametrami opisującymi geometrię lewej komory serca, d) wynikami pomiarów ultrasonograficznych tętnic szyjnych z uwzględnieniem kompleksu intima-media. Pełny komplet wyników zgromadzono dla 53 pacjentów [**PRACA 3: „Rheological properties of erythrocytes in patients with high risk of cardiovascular disease”**]. Większość osób w przebadanej grupie stanowili chorzy na nadciśnienie tętnicze – 37 przypadków, spośród których 20 otrzymywało leczenie hypotensyjne, w tym 14 osób wyłącznie inhibitory konwertazy (IACE). U 17 osób stwierdzono cukrzycę typu II a u 35 osób podwyższony poziom cholesterolu. 19 pacjentów miało nadwagę a 6 osób było otyłych. W grupie było też 14 palaczy tytoniu.

Już na pierwszym etapie analizy zaobserwowaliśmy istnienie wyraźnej zależności pomiędzy odkształcalnością i agregacyjnością erytrocytów a wartością hematokrytu: wyższym wartościami hematokrytu towarzyszyło wyraźne pogorszenie odkształcalności ( $\beta = -3.2$ ,  $p < 0.006$ ) i wzrost

agregacyjności ( $\beta=2.1$ ,  $p<0.01$ ). Wynik ten sugerował, że w przypadku badań hemoreologicznych z udziałem osób z czynnikami ryzyka CVD pomiary reologicznych własności czerwonych krwinek muszą uwzględniać wartość hematokrytu jako jeden z niezależnych parametrów.

Następne obserwacje dotyczyły osób z leczonym i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym. Stwierdziliśmy, że o ile pomiędzy pacjentami normotensyjnymi i osobami z nieleczonym nadciśnieniem nie było istotnych różnic w wartościach odkształcalności i agregacyjności erytrocytów, o tyle erytrocyty pacjentów z nadciśnieniem tętniczym leczonych IACE wykazywały lepszą odkształcalność, 52.3% vs. 45.4% (w analizie wieloparametrycznej:  $\beta=5.3$ ,  $p<0.03$ ) i mniejszą zdolność agregacji, 16.3 vs. 21.2 MEA (w analizie wieloparametrycznej  $\beta=-3.1$ ,  $p<0.05$ ) w porównaniu z osobami zdrowymi. Dalsza analiza pokazała, że poprawa ta jest skorelowana ze wzrostem poziomu stabilnego metabolitu prostacykliny 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  w surowicy - poziom jest wyższy u pacjentów poddanych terapii w porównaniu z grupą kontrolną: 1556 vs. 994 pg/ml,  $p<0.05$ . Ten uzyskany w warunkach klinicznych wynik jest potwierdzeniem hipotezy mówiącej, że u pacjentów przyjmujących IACE za poprawę reologicznych własności erytrocytów może być odpowiedzialna prostacyklina, której stężenie w osoczu krwi wzrasta w wyniku korzystnego działania IACE na śródbłonek.

Dane zgromadzone dla badanej grupy chorych, poszerzone o kolejnych 13 pacjentów (łącznie 66 osób), posłużyły jako materiał do analizy zależności pomiędzy własnościami reologicznymi erytrocytów a parametrami określającymi geometrię lewej komory serca uzyskanymi w badaniu echokardiograficznym [PRACA 4: „**Left ventricular geometry and rheological properties of erythrocytes in patients at cardiovascular disease risk**”]. Uwzględniając wszystkie kontrolowane w badaniu czynniki, które mogły wpływać na badaną zależność, wykazaliśmy statystycznie znaczący wzrost indeksowanej masy lewej komory (*left ventricle mass index* – LVMI) u osób z gorszą odkształcalnością erytrocytów i ich zwiększoną zdolnością agregacji: a) przy spadku indeksu deformacyjności, DI, o każdy 1%, LVMI wzrastało o 1.0 g/m<sup>2</sup> ( $\beta=-1.0$ ) i korelacja ta była istotna statystycznie,  $p<0.04$ , b) przy wzroście wartości agregacyjności o jednostkę MEA, LVMI zwiększało się o 1.3 g/m<sup>2</sup> ( $\beta=1.3$ ,  $p<0.05$ ).

Wyniki te wskazują na istnienie ścisłego związku pomiędzy zaburzeniami reologicznymi erytrocytów a zmianami narządowymi. Pogorszenie własności hemoreologicznych, wynikające m. in. z gorszej odkształcalności erytrocytów i ich zwiększonej agregacyjności (wzrostu lepkości krwi), prowadzi do pogorszenia perfuzji obwodowej i do upośledzenia wymiany tlenowej w mikrokrążeniu, a w konsekwencji do wzrostu oporu obwodowego. Następstwem jest wzrost obciążenia następczego serca, który skutkuje przerostem mięśnia lewej komory, a tym samym wzrostem wartości indeksowanej masy lewej komory. Działania terapeutyczne w leczeniu schorzeń stanowiących czynniki ryzyka CVD powinny być zatem ukierunkowane również na poprawę własności

reologicznych erytrocytów. Można w tym celu wykorzystać np. te IACE, o których wiadomo, że przyczyniają się do stabilizacji błony komórkowej erytrocytu poprzez zmiany w transporcie błonowym jonów i poprzez efekt antyoksydacyjny, poprawiając tym samym jej własności elastyczne.

Starając się odpowiedzieć na pytanie, czy redukcja przerostu lewej komory serca może być osiągnięta poprzez poprawę własności reologicznych erytrocytów (informacji na temat tego zagadnienia jest stosunkowo niewiele w literaturze), kontynuowaliśmy przez okres 2 lat monitorowanie pacjentów włączonych wcześniej do programu. Kontakt został utrzymany z 29 osobami, u których zastosowano terapię zgodnie z obowiązującymi standardami. Po dwóch latach leczenia powtórzyliśmy kompleksowe badania i poddaliśmy analizie wyniki pod kątem zmian, które zaszły w okresie monitorowania [**PRACA 5: „Evolution of rheological properties of erythrocytes and left ventricular geometry in cardiovascular disease risk patients”**]. Stwierdziliśmy, że w grupie (12 osób), w której, dzięki stosowanej terapii, uzyskano normalizację ciśnienia tętniczego, poziomu LDL i poziomu glukozy, nastąpiła także poprawa średniej odkształcalności erytrocytów o 17% ( $p < 0.025$ ) i była ona stowarzyszona ze zmniejszeniem się średniej wartości indeksowanej masy lewej komory serca o 8%. W grupie drugiej (17 osób), w której pomimo leczenia wartości analizowanych parametrów pozostawały w zakresach patologicznych, nastąpiło pogorszenie średniej odkształcalności erytrocytów o 15% ( $p < 0.00001$ ) oraz zwiększenie średniej indeksowanej masy lewej komory serca o 18%. Wyniki badań pokazały zatem, że istnieje związek pomiędzy własnościami reologicznymi krwi, przerostem lewej komory i skutecznością stosowanej terapii. Poprzez zastosowanie odpowiedniej terapii skierowanej na poprawę własności reologicznych krwi w chorobach będących czynnikami ryzyka CVD, mogliśmy zapobiec przerostowi mięśnia lewej komory serca, zmniejszając tym samym ryzyko chorobowości i śmiertelności sercowo-naczyniowej

Opisane do tej pory badania prowadziliśmy na grupie pacjentów, z których większość poddawana była terapii. Kolejny cykl badań miał na celu analizę związku pomiędzy rozwojem niekorzystnych zmian narządowych i naczyniowych a własnościami reologicznymi i morfologicznymi krwinek czerwonych u osób ze świeżo rozpoznanym i wcześniej nieleczonym nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią, albo cukrzycą. Chcieliśmy znaleźć odpowiedź na pytanie, na jak wczesnym etapie choroby można zauważyć wspomniane wyżej korelacje. Szczególną uwagę zwróciliśmy na dobór pacjentów, który gwarantował minimalizację wpływu innych czynników na wyniki badań laboratoryjnych i klinicznych. Dodatkowo, pacjenci nie mogli być leczeni z powodu innych chorób, których przebieg lub leczenie mogłoby wpłynąć na efekty planowanej terapii, nie mogli też przyjmować żadnych leków.

Realizacja projektu przebiegła w dwóch fazach. Faza I objęła rekrutację pacjentów oraz przeprowadzenie przewidzianej serii badań i pomiarów. Na podstawie wstępnego badania klinicznego i testów laboratoryjnych osoby były kwalifikowane do czterech grup: a) grupy z nadciśnieniem tętniczym (37 osób), b) grupy z hipercholesterolemią (29 osób), c) grupy z cukrzycą (10 osób), d)

grupy osób zdrowych dopasowanych pod względem struktury wiekowej (35 osób). Po zakwalifikowaniu (przed włączeniem leczenia), u każdego pacjenta przeprowadzono badania: a) przedmiotowe i podmiotowe, b) laboratoryjne krwi żyłnej (komplet), c) własności reologicznych oraz biofizycznych erytrocytów, d) parametrów funkcji śródbłonna, e) echokardiograficzne, f) ciśnienia tętniczego za pomocą ABPM, g) grubości kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej (IMT), h) własności elastycznych ścian dużych naczyń tętniczych (PWV). Pierwsza faza trwała około 1.5 roku od czasu rozpoczęcia projektu. Jednorodność procesu kwalifikacji była zapewniona przez fakt, że przeprowadzała go jedna osoba (M. Fornal). Osoby zakwalifikowane do projektu zostały poddane odpowiedniej terapii zgodnie z obowiązującymi standardami.

Faza II polegała na powtórzeniu wszystkich badań u każdego pacjenta po upływie około 1.5 roku od momentu włączenia go do programu. W skali czasowej trwania projektu faza II objęła okres 1.5 - 3 lat. Pomiary prowadzone podczas realizacji zarówno fazy I, jak i fazy II, wykonywane były przez te same osoby.

Pierwszą analizę materiału pomiarowego przeprowadzono jeszcze w czasie trwania fazy I projektu [**PRACA 6: „Relevance of erythrocyte deformability to the concentration of soluble cell adhesion molecules and glomerular filtration rate in patients with untreated essential hypertension”**]. W grupie pacjentów z nieleczonym, świeżo rozpoznanym nadciśnieniem tętniczym zaobserwowaliśmy zależność pomiędzy indeksem odkształcalności erytrocytów i wskaźnikiem przesączania kłębuszkowego (*estimated glomerular filtration rate* - eGFR) - pogorszenie odkształcalności krwinek czerwonych skorelowane było z mniejszą wartością eGFR ( $R=0.60$ ,  $p<0.005$ ). Dodatkowo stwierdziliśmy, że związek ten współistnieje z zależnością odkształcalności erytrocytów od niektórych markerów zapalnych śródbłonna, sVCAM-1 i sICAM-1: wyższy poziom sVCAM-1 i sICAM-1 korelował z gorszą deformacyjnością erytrocytów (dla sVCAM-1  $\beta=-0.043$ ,  $p<0.0016$ , dla sICAM-1  $\beta=-0.118$ ,  $p<0.03$ ). Nie zaobserwowaliśmy natomiast związków pomiędzy wymienionymi parametrami w pozostałych grupach pacjentów, tj. wśród osób z hipercholesterolemią (dla DI% vs. sVCAM-1:  $p<0.35$ , a dla DI% vs. sICAM-1:  $p<0.79$ ) i osób zdrowych (DI% vs. sVCAM-1:  $p<0.57$ , DI% vs. sICAM-1:  $p<0.54$ ), pomimo że zakresy wartości indeksu deformacyjności i parametrów funkcji śródbłonna były zbliżone do tych, które zmierzone zostały u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Przypuszczalnie procesy zapalne związane z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego oddziałują również na krążące erytrocyty, powodując zmiany w strukturach błony pogarszające odkształcalność krwinek. Można spekulować, że w nadciśnieniu tętniczym, po pierwsze, odkształcalność erytrocytów może służyć jako marker funkcji śródbłonna, po drugie, erytrocyty mogą być mediatorami niekorzystnych zmian w nerkach: w związku z wazokonstrykcją towarzyszącą nadciśnieniu, przepływ erytrocytów z pogorszoną odkształcalnością przez kapilary kłębuszka nerkowego jest utrudniony i prowadzi do pogorszenia filtracji kłębuszkowej.

Tak więc, w praktyce klinicznej warto zwrócić uwagę na odkształcalność erytrocytów jako jeden z czynników, który może wpływać na stopień wydolności nerek u osób z nadciśnieniem tętniczym i może być pomocny w identyfikacji asymptomatycznych pacjentów z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego.

### **Struktura błony i cytoszkieletu erytrocytów a zdolność przepuszczalności dla O<sub>2</sub> u pacjentów z czynnikami ryzyka CVD**

Szczególnym rodzajem pomiarów, które przeprowadziliśmy dla losowo wybranych osób z wyżej zdefiniowanych badanych grup, było obrazowanie powierzchni erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych, a także pomiary przepuszczalności błony erytrocytów dla tlenu przeprowadzone *in vitro* za pomocą spektroskopii Mössbauera [PRACA 7: „**Erythrocyte Membrane Properties in Patients with Essential Hypertension**”]. W tych przypadkach przygotowanie materiału, proces pomiaru oraz obróbka danych była czasochłonna i w rezultacie podczas pierwszej fazy projektu udało się przebadać próbki 5 pacjentów z grupy nadciśnienia, 6 z grupy hipercholesterolemii oraz 10 osób z grupy zdrowych.

Badania przeprowadzono przy częściowym odwodnieniu erytrocytów, co dało możliwość uwidocznienia sieci białek szkieletu błonowego. Stwierdziliśmy, że u osób zdrowych posiada on strukturę „plastra miodu” („honeycomb”), natomiast u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym przyjmuje formę „kolby kukurydzy” („corncob”). Erytrocyty pacjentów z hipercholesterolemią z kolei nie różnią się pod tym względem od krwinek czerwonych osób zdrowych. W celu ilościowego opisu zaobserwowanych różnic, wykonaliśmy analizę powierzchni komórek, uwzględniając zmiany w regularności błony. Na błonie erytrocytów osób zdrowych zidentyfikowaliśmy: a) drobne wypuklenia o wysokości ok.  $44 \pm 13$  nm, b) długie struktury ok.  $94 \pm 36$  nm, c) wgłębienia o średnicy ok.  $54 \pm 20$  nm. Błona erytrocytów pacjentów z nadciśnieniem tętniczym posiadała: a) drobne wypuklenia o wysokości ok.  $54 \pm 22$  nm, b) dwie różnej długości struktury „corncob”:  $82 \pm 38$  nm oraz  $188 \pm 53$  nm, c) wgłębienia o średnicy ok.  $51 \pm 21$  nm. Zaobserwowana różnica pomiędzy rozmiarami długich struktur w obu grupach pacjentów jest istotna statystycznie ( $94$  nm vs.  $188$  nm,  $p < 0.00001$ ). W oparciu o obecną wiedzę na temat budowy cytoszkieletu erytrocytów, zaobserwowane w obu grupach długie struktury,  $94 \pm 36$  nm oraz  $82 \pm 38$  nm, odpowiadają dimerom spektryny, natomiast najdłuższe struktury o rozmiarach  $188 \pm 53$  nm, stwierdzone jedynie u osób chorych na nadciśnienie tętnicze, są prawdopodobnie związane z tetramerami spektrynowymi. To one mogą być odpowiedzialne za powstanie struktur typu „kolby kukurydzy” w wyniku zaniku struktury heksagonalnej, związanego z utratą stabilności połączenia spektryna-aktyna-adducyna.

Nasunęło się pytanie, czy zmiana struktury cytoszkieletu u osób z nadciśnieniem tętniczym może być przyczyną zaburzenia dyfuzji gazów, a w szczególności tlenu przez błonę komórkową.

W celu sprawdzenia przepuszczalności błony erytrocytów dla  $O_2$  oraz odwracalności wiązania cząsteczki tlenu przez odtlenowaną hemoglobinę, zmierzono widma mössbauerowskie w zależności od czasu (opis procedury w rozdziale „Techniki pomiarowe”) dla próbek krwi osób z badanych grup. W przypadku erytrocytów osób zdrowych udział OxyHb w widmie mössbauerowskim wzrastał od początkowej wartości ok. 26-40%, do wartości ok. 78-82%, podczas gdy udział DeoxyHbOH z początkowego poziomu ok. 60-74% malał do poziomu ok. 18-22%. W przypadku erytrocytów pacjentów z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym zachowanie było odmienne - udział OxyHb i DeoxyHbOH pozostawał przez cały czas pomiaru na stałym poziomie, przyjmując wartości odpowiednio 82-88% i 12-18%. Można stąd wnioskować, że erytrocyty pacjentów z nieleczonym nadciśnieniem tętniczym nie są w stanie w zadanych warunkach eksperymentalnych niskiego ciśnienia  $O_2$ , ani uwolnić, ani przyjąć tlenu w przeciwieństwie do erytrocytów osób zdrowych. Ponieważ nie stwierdziliśmy różnicy pomiędzy wartościami parametrów nadsubtelnych obu form hemoglobiny w przypadkach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (NT) i osób zdrowych, należy przypuszczać, że obserwowane różnice w przyłączaniu  $O_2$  są przede wszystkim związane z zaburzeniami transportu tlenu cząsteczkowego przez błonę erytrocytów u pacjentów z NT, co z kolei może być wynikiem modyfikacji struktur błonowych obserwowanych w obrazowaniu AFM.

Można sądzić, że utrudnienia w oddawaniu tlenu przez erytrocyt u pacjentów z NT mogą prowadzić do obwodowej hipoksji, która wtórnie może stymulować wzrost ciśnienia tętniczego. Możliwy jest też scenariusz, że zaburzenia przekazywania przez erytrocyt tlenu do tkanek są pierwotne w stosunku do występowania nadciśnienia tętniczego i mogą wręcz przyczyniać się do rozwoju tego schorzenia.

#### **Zależności pomiędzy rozpiętością rozkładu objętości erytrocytów a markerami zapalnymi i zmianami narządowymi u pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym**

Rozpiętość rozkładu objętości erytrocytów (*red blood cell distribution width – RDW*) jest parametrem morfologicznym krwi, który został ostatnio uznany za marker niekorzystnych zmian w układzie sercowo-naczyniowym. Zadaliśmy więc sobie pytanie, czy RDW będzie również odzwierciedlała stopień zaawansowania takich schorzeń jak nadciśnienie tętnicze lub hipercholesterolemia w badanych grupach chorych [**PRACA 8: „Association of red blood cell distribution width, inflammation markers and morphological as well as rheological erythrocyte parameters with target organ damage in hypertension”**]. Do analizy statystycznej wykorzystaliśmy dane laboratoryjne i kliniczne pacjentów ze świeżo rozpoznanymi i nieleczonymi: nadciśnieniem tętniczym, hipercholesterolemią lub cukrzycą (około 50 parametrów dla każdej osoby). Stopień zaawansowania zmian naczyniowych określiliśmy na podstawie wyników badań grubości blaszki miażdżycowej (IMT) oraz prędkości fali tętna (PWV). W związku z zaobserwowaną

zależnością RDW od stężenia hemoglobiny w erytrocycie (zależność ujemna), do rozważań włączyliśmy także MCHC.

Wieloparametryczna analiza statystyczna wykazała istnienie statystycznie istotnych korelacji pomiędzy RDW i PWV, a także pomiędzy MCHC i IMT, ale wyłącznie w grupie osób z nadciśnieniem tętniczym: RDW wzrasta wraz ze wzrostem PWV ( $\beta=0.092$ ,  $p=0.037$ ), natomiast MCHC jest ujemnie skorelowane z IMT ( $\beta=-2.02$ ,  $p=0.043$ ). Ponadto RDW i MCHC wykazują też statystycznie istotną zależność od markerów zapalnych: fibrynogenu oraz interleukiny 6 (IL-6), ale znowu jedynie w grupie nadciśnienia tętniczego: RDW jest dodatnio skorelowane z fibrynogenem ( $\beta=0.254$ ,  $p=0.007$ ) oraz IL-6 ( $\beta=0.271$ ,  $p=0.030$ ), natomiast korelacja pomiędzy MCHC i IL-6 jest ujemna ( $\beta=-0.525$ ,  $p=0.030$ ). (W pozostałych grupach, tj. u osób z hipercholesterolemią i zdrowych, nie obserwowaliśmy żadnych znaczących zależności.)

Wzrost wartości RDW, mówiący o większym zróżnicowaniu wielkości erytrocytów i skorelowany z nim spadek wartości MCHC, mogą być wyrazem zaburzeń procesu erythropoezy w szpiku kostnym. Zaobserwowane zatem u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym korelacje pomiędzy: z jednej strony RDW i MCHC, a z drugiej strony zmianami naczyniowymi (PWV i IMT) oraz markerami zapalnymi (fibrynogen i IL-6), świadczyć mogą o udziale procesów zapalnych w patogenezie nadciśnienia tętniczego poprzez uszkadzający wpływ na naczynia oraz na przebieg erythropoezy w szpiku kostnym. Obserwacja ta należy do tych wyników badań klinicznych, które są zgodne z odkryciem znaczącej roli procesów zapalnych w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

### Podsumowanie

W ramach prowadzonego przeze mnie na przestrzeni ostatnich 10 lat programu badawczego wprowadziliśmy do badań własności fizyko-chemicznych erytrocytów nowe techniki pomiarowe oparte o mikroskop sił atomowych i spektroskopię mössbauerowską oraz przeprowadziliśmy za ich pomocą pomiary w grupach pacjentów z różnymi czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej. Na podstawie nowych technik pomiarowych opracowaliśmy metody wyznaczania:

- a) sztywności erytrocytu charakteryzowanej przez moduł Younga,
- b) struktury sieci błonowej białek w erytrocycie,
- c) przepuszczalności błony erytrocytu dla tlenu cząsteczkowego.

Stosując do pomiarów własności erytrocytów zarówno te nowo opracowane techniki, jak i metody tradycyjne, zidentyfikowaliśmy u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej szereg korelacji pomiędzy parametrami opisującymi własności reologiczne, morfologiczne i biofizyczne erytrocytów, a parametrami charakteryzującymi stan kliniczny pacjenta,

włączając w to zmiany narządowe lub naczyniowe. Zaproponowaliśmy też interpretacje zaobserwowanych zależności.

- Pokazaliśmy, że za pomocą mikroskopu sił atomowych można wyznaczyć rozkład wartości sztywności erytrocytów. Rozkłady takie zostały zmierzone dla pacjentów z różnymi czynnikami ryzyka CVD i wykazały, że sztywność erytrocytów pacjentów z cukrzycą oraz osób palących jest dużo wyższa niż w pozostałych grupach badawczych. Zwiększenie sztywności erytrocytów u pacjentów z cukrzycą, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, może wynikać ze zmiany struktury chemicznej błony, zmiany aktywności  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPazy, czy też z nasilonej nieenzymatycznej glikozylacji globiny hemoglobiny oraz białek błony erytrocytu.
- Stwierdziliśmy wzrost indeksowanej masy lewej komory serca skorelowany z pogarszającą się odkształcalnością erytrocytów i ich większą zdolnością agregacji u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym lub cukrzycą lub hipercholesterolemią. Pogorszenie własności reologicznych erytrocytów i związany z tym wzrost lepkości krwi prowadzi do pogorszenia perfuzji obwodowej, upośledzenia wymiany tlenowej a w konsekwencji do wzrostu oporu obwodowego. Następstwem jest wzrost obciążenia następczego serca, który skutkuje przerostem mięśnia lewej komory, a tym samym wzrostem wartości indeksowanej masy lewej komory.
- Pokazaliśmy, że u osób z czynnikami ryzyka CVD, u których terapia była skuteczna (doprowadziła do normalizacji ciśnienia tętniczego, poziomu LDL i poziomu glukozy), nastąpiła poprawa średniej odkształcalności erytrocytów i poprawa ta skorelowana była ze zmniejszeniem się wartości wskaźnika indeksowanej masy lewej komory serca. Natomiast u osób, u których, pomimo leczenia, wartości analizowanych parametrów pozostawały w zakresach patologicznych, nastąpiło pogorszenie średniej odkształcalności erytrocytów oraz zwiększenie średniej indeksowanej masy lewej komory serca. Zależności te wspierają wysuniętą wcześniej hipotezę o związku własności reologicznych krwi z geometrią lewej komory serca.
- U pacjentów ze świeżo zdiagnozowanym i nieleczonym nadciśnieniem tętniczym pogorszenie odkształcalności krwinek czerwonych skorelowane jest ze spadkiem wartości wskaźnika przesączania kłębuszkowego - eGFR (w hipercholesterolemii i u osób zdrowych efekt ten nie występuje). Zmiany te idą w parze z dysfunkcją śródbłónka naczyniowego monitorowaną za pomocą wskaźników sVCAM-1 i sICAM-1. Można przyjąć, że w nadciśnieniu tętniczym, z jednej strony odkształcalność erytrocytów może służyć jako marker funkcji śródbłónka, z drugiej strony erytrocyty mogą być mediatorami niekorzystnych zmian w nerkach: w związku z wazokonstrykcją towarzyszącą nadciśnieniu, przepływ erytrocytów z pogorszoną

odkształcalnością przez kapilary kłębuszka nerkowego jest utrudniony i prowadzi do pogorszenia filtracji kłębuszkowej.

- Na podstawie pomiarów topografii powierzchni erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych stwierdziliśmy, że u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym zaburzona jest struktura białek błonowych. Stosując u tych samych pacjentów spektroskopię mössbauerowską, zaobserwowaliśmy także nieprawidłowości w oddawaniu i przyjmowaniu tlenu przez erytrocyt. Ponieważ struktura hemoglobiny (monitorowana również za pomocą spektroskopii mössbauerowskiej) nie ulega patologicznym zmianom, za zaburzenia w przekazywaniu tlenu mogą być odpowiedzialne zaobserwowane różnice w strukturze cytoszkieletu. Można przypuszczać, że powyższe zaburzenia w oddawaniu tlenu przez erytrocyt u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, prowadząc do obwodowej hipoksji, wtórnie stymulują wzrost ciśnienia tętniczego. Możliwy jest też scenariusz, że zmiany w przekazywaniu przez erytrocyt tlenu do tkanek są pierwotne w stosunku do występowania nadciśnienia tętniczego i mogą wręcz przyczyniać się do rozwoju tego schorzenia.
- Zaobserwowane u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym korelacje pomiędzy: z jednej strony RDW i MCHC, a z drugiej strony zmianami naczyniowymi (PWV i IMT) oraz markerami zapalnymi (fibrynogen i IL-6), świadczyć mogą o udziale procesów zapalnych w patogenezie nadciśnienia tętniczego poprzez uszkodzający wpływ na naczynia oraz na przebieg erytropoezy w szpiku kostnym..

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych**

### **5.1 Prace badawcze nie wchodzące w zakres osiągnięcia**

#### *Epidemiologia białaczek w Krakowie i na obszarze obecnego województwa małopolskiego*

Po rozpoczęciu pracy w I Klinice Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Krakowie w 1988 roku, włączyłam się do prowadzonych przez grupę prof. Janickiego badań nad epidemiologią białaczek. Samodzielnie zebrałam dane dotyczące zachorowalności na białaczki w Krakowie i na obszarze obecnego województwa małopolskiego w latach 1980-1990. Uzyskałam także informacje o przeżywalności do roku 1997 osób, które zachorowały na białaczkę w Krakowie w okresie 1980-1990. W celu porównania wyników z Krakowa z sytuacją w odmiennym rejonie geograficznym, zgromadziłam podczas stażu naukowego w Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA, (dla analogicznego okresu czasu 1980 – 1990) materiał, dotyczący zachorowalności na białaczki w stanach

Indiana i Iowa w USA. W wyniku analizy statystycznej danych uzyskałam współczynniki zachorowalności w zależności od typu cytologiczno-klinicznego białaczki, roku kalendarzowego, wieku chorego oraz jego miejsca zamieszkania. Zaobserwowałam skokowy wzrost sumarycznej zachorowalności w roku 1983 w Krakowie ze stałego poziomu 6.3/100 tys. mieszkańców w latach 1980-82, do wyższego, stałego poziomu 9.0/100 tys. dla lat 1983-90.

Porównanie danych krakowskich z częstością zachorowań na białaczki w przeważającej części rolniczym Iowa, pokazało wyższą zachorowalność w tym amerykańskim stanie: wynosiła ona 10.9/100 tys. mieszkańców. Być może związane to było z lepszą wykrywalnością choroby w USA lub mogło wynikać z większej ilości czynników onkogennych obecnych w środowisku.

Biorąc pod uwagę dane z końca 1997 roku, w dalszej części analizy dla wszystkich osób, które zachorowały na białaczkę w latach 1980-1990 i mieszkały w Krakowie, ustalone zostały czasy przeżycia lub czasy cenzorowe. W obrębie każdego typu cytologiczno-klinicznego białaczki, stosując model Cox'a, przeprowadziliśmy analizę ryzyka zgonu w zależności od okresu, w którym rozpoznano chorobę (wyróżniono dwa przedziały czasowe 1980-1985 i 1986-1990), od płci oraz od miejsca zamieszkania (dzielnicy) chorego. Praktycznie we wszystkich typach białaczek zaobserwowaliśmy wyraźny wzrost prawdopodobieństw przeżyć pacjentów, u których stwierdzono chorobę (a więc i rozpoczęto leczenie) w drugim okresie, tj. w latach 1986-1990. Czasy przeżycia dla białaczki limfoblastycznej ostrej u dzieci, limfatycznej przewlekłej i granulocytowej przewlekłej wzrosły w drugiej połowie lat 80-tych do poziomu notowanego w krajach wysoko rozwiniętych. Te korzystne zmiany w przeżyciach osób chorych na białaczkę w drugiej połowie lat 80-tych (w porównaniu z pierwszym okresem 1980-1985) zinterpretowaliśmy jako wynik postępu w diagnostyce (rozpoznanie choroby na wczesnym etapie) i terapii (wprowadzenie nowoczesnych schematów leczenia i udoskonalenie leczenia wspomagającego) tej choroby w Krakowie. Zaobserwowana korelacja pomiędzy ryzykiem zgonu w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci, a miejscem zamieszkania chorych, być może związana była ze specyficznym kształtowaniem się kompleksu czynników środowiskowych w badanych obszarach Krakowa.

Wyniki prowadzonych przeze mnie badań, dotyczące epidemiologii białaczek, zawarte zostały w mojej pracy doktorskiej „Zachorowalność i przeżycia na białaczki w Krakowie w latach 1980-1990”, którą obroniłam w 1998 r. Zaowocowały one również pracami „Zachorowalność na białaczki w Krakowie w latach 1980-1990” (Przegl. Lek. 1997) oraz „Ewolucja przeżycia chorych na białaczki w Krakowie - przypadków zarejestrowanych w latach 1980-1990” (Przegl. Epidemiol. 2003).

### *Choroba Wilsona i jej diagnostyka*

Kolejny etap mojej działalności naukowej dotyczył poszukiwania nowych metod diagnostycznych dla rozpoznawania zaburzeń gospodarki miedzią w organizmie ludzkim. Zainteresowanie tą tematyką zawdzięczam jednemu z przypadków klinicznych zdiagnozowanej przeze mnie choroby Wilsona u 25 letniej pacjentki, u której, poza cechami niewielkiego stopnia uszkodzenia wątroby, nie stwierdzano istotnych zmian w obrazie klinicznym. Jest to rzadka jednostka chorobowa (częstość 1-3/100 000), uwarunkowana genetycznie, dotycząca defektu białka transportującego miedź, zlokalizowanego w błonie hepatocytów. Mutacja genu APT7B na chromosomie 13 powoduje zaburzenie wiązania miedzi – rośnie poziom swobodnych jonów miedzi w surowicy krwi, których nadmiar gromadzi się w różnych narządach (wątroba, mózg, nerki, rogówka), dając późne objawy kliniczne. Kryterium rozpoznania choroby są: zmniejszenie stężenia ceruloplazminy w surowicy  $<0.1\text{g/l}$  i występowanie pierścienia Kaysera i Fleischera w rogówce. (W specjalistycznych ośrodkach wykonuje się badanie DNA.)

Poszukując nowej metody diagnostycznej, nawiązałam współpracę z grupą Pani Prof. Barbary Blicharskiej z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dotychczasowe badania zawartości miedzi w surowicy krwi, prowadzone za pomocą standardowych metod spektrofotometrii, nie pozwalały na rozróżnienie pomiędzy ilością związanych i swobodnych jonów  $\text{Cu}^{++}$ . Należało opracować sposób oznaczenia ilości niezwiązanych jonów miedzi w surowicy krwi.

Zastosowaliśmy spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego i badaliśmy protonową stałą relaksacji surowicy krwi w zależności od ilości swobodnych jonów  $\text{Cu}^{++}$ . W pierwszym etapie, wykorzystując krew zwierzęcą, wykazaliśmy, że: a) przy podwyższonym (w stosunku do poziomu fizjologicznego) stężeniu jonów  $\text{Cu}^{++}$  stała relaksacji ( $1/T(1)$ ) wyraźnie wzrasta, b) dodanie do surowicy substancji chelatującej, wiążącej  $\text{Cu}^{++}$ , powoduje spadek wartości stałej relaksacji do poziomu charakterystycznego dla surowicy krwi zawierającej fizjologiczną ilość jonów miedzi. W drugiej fazie badaliśmy krew pacjentów, u których zdiagnozowano chorobę Wilsona oraz krew osób zdrowych. Zaobserwowaliśmy statystycznie istotny efekt: po dodaniu do krwi substancji chelatującej, u osób z chorobą Wilsona stała relaksacji zmniejszała się o więcej niż  $0.06\text{ s}^{-1}$ , podczas gdy w grupie zdrowych zmiana ta wynosiła mniej niż  $0.06\text{ s}^{-1}$ . Uzyskany wynik może być wykorzystany w diagnostyce choroby Wilsona, która charakteryzuje się wzrostem poziomu swobodnych jonów miedzi w surowicy krwi. Opis badań oraz ich wyniki przedstawiłmy w pracy "*Estimation of free copper ion concentrations in blood serum using  $T(1)$  relaxation rates*" (Journal of Magnetic Resonance, 2008).

### *Wpływ promieniowania jonizującego na erytrocyty*

Badania własności fizyko-chemicznych erytrocytów osób z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, które stanowiły główną linię mojej działalności badawczej, sprzyjały rozwojowi innych projektów wykorzystujących krwinki czerwone jako sondę zmian w organizmie.

Erytrocyty, ze względu na dobrze poznaną ich budowę i brak organelli komórkowych, stanowią doskonały modelowy system do badań wpływu promieniowania jonizującego na komórki ssaków. W jednym z takich projektów badaliśmy wpływ małych dawek promieniowania neutronowego na hemoglobinę. Podczas kilkuminutowych ekspozycji naświetlaniu dawką rzędu 50  $\mu\text{Gy}$  poddawane były erytrocyty wyizolowane od osób zdrowych (zastosowane dawki były znacznie mniejsze od tych, dla których obserwowano zjawisko hormezy radiacyjnej, ale wyższe od dawek promieniowania tła). Do oceny zmiany stanu hemoglobiny wykorzystana była spektroskopia mössbauerowska. Zaobserwowaliśmy, że tylko dwie formy hemoglobiny: OxyHb i DeoxyHb, czyli te, które fizjologicznie uczestniczą w transporcie tlenu, są wrażliwe na działanie zastosowanych niskich dawek promieniowania neutronowego i przekształcają się w nową formę  $\text{Hb}_{\text{irr}}$ . Natomiast nieaktywna forma  $\text{HbOH}/\text{H}_2\text{O}$  (powstała z OxyHb) nie ulegała zmianom na skutek naświetlania. Wyniki opublikowane zostały w artykule „*Mössbauer studies of hemoglobin in erythrocytes exposed to neutron radiation*” (Hyperfine Interact. 2012).

W ramach kolejnego projektu badaliśmy, przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej, wpływ małych dawek promieniowania gamma (od 0.04 do 1.8 mGy) na stabilność erytrocytów pobranych od osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą. Zaobserwowane zostały wyraźne nieciągłości w przebiegu zależności stopnia hemolizy od dawki promieniowania gamma w obu grupach pacjentów, najprawdopodobniej związane z aktywacją enzymatycznych i chemicznych procesów w błonie na kolejnych etapach naświetlania. Wraz ze wzrostem dawki promieniowania gamma, w cukrzycy następuje globalny spadek stopnia hemolizy, podczas gdy u osób zdrowych hemoliza utrzymuje się w przybliżeniu na stałym poziomie. Dodatkowo, wartości dawki, przy których występują obserwowane nieciągłości badanych funkcji, są charakterystyczne dla danej grupy, ale różne w obu grupach. Można przypuszczać, że za stwierdzane różnice odpowiedzialna jest modyfikacja błony lipidowej i cytoszkieletu erytrocytów pacjentów z cukrzycą związana z zaburzeniami enzymatycznymi w przebiegu hiperglikemii. Obserwowane efekty nie wydają się być natomiast spowodowane zmianami w hemoglobinie, gdyż, za pomocą spektroskopii mössbauerowskiej wykazano, że jedynie najwyższe stosowane tutaj dawki promieniowania gamma powodują modyfikację hemoglobiny i to w podobny sposób u zdrowych, jak i chorych na cukrzycę osób. Wyniki opublikowane zostały w pracy „*Effects of low doses of gamma rays on the stability of normal and diabetic erythrocytes*” (Acta Biochimica Polonica, 2011)

#### *Badania struktury cytoszkieletu różnych rodzajów komórek za pomocą AFM*

Program badań sztywności erytrocytów za pomocą mikroskopu sił atomowych u pacjentów z czynnikami ryzyka choroby sercowo-naczyniowej, który prowadziłam we współpracy z Instytutem Fizyki Jądrowej PAN, i który opisałam przy omawianiu moich wiodących prac, pozwolił mi na włączenie się do innych eksperymentów dotyczących pomiarów sztywności komórek z AFM. Jeden z

cykli takich eksperymentów dotyczył sztywności zarówno fibroblastów, jak i erytrocytów w zależności od głębokości ugięcia spowodowanego naciskiem ostrza AFM („*Depth-sensing analysis of cytoskeleton organization based on AFM data*”, European Biophysics Journal 2012). Wykazano, że rozkłady wartości modułu Younga otrzymane dla niedużych głębokości ugięcia charakteryzują głównie wierzchnią warstwę sieci połączeń aktynowych, natomiast dla dużych głębokości ugięcia rozkłady modułu Younga opisują sztywność całej komórki. Otrzymane rezultaty pozwalają na ocenę niejednorodności cytoszkieletu, co może zostać wykorzystane do celów diagnostycznych np. komórek nowotworowych.

### *Epidemiologia i profilaktyka chorób układu sercowo-naczyniowego*

Poza pracą dydaktyczną i naukową w Collegium Medicum, jestem zatrudniona jako lekarz w Podstawowej Opiece Zdrowotnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Stąd też zostałam włączona do kilku programów mających na celu określenie częstości występowania modyfikowalnych czynników ryzyka chorób układu krążenia wśród osób zgłaszających się do lekarza pierwszego kontaktu.

Jednym z projektów była ogólnopolska akcja „Zmierz ciśnienie - oceń ryzyko”, prowadzona w ośrodkach podstawowej opieki zdrowotnej w Polsce w latach 2004–2005, w ramach którego wykazano, że wprowadzenie programów edukacyjnych oraz działań prewencyjnych wśród chorych, daje szansę zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego (J. Sulicka i inni, *Wybrane czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów podstawowej opieki zdrowotnej*, Naciski Tętnicze 2006).

Kolejny program badawczy dotyczył trafności oceny, przez lekarzy opieki ambulatoryjnej w Polsce, ryzyka sercowo-naczyniowego (CV) u chorych z niekontrolowanym nadciśnieniem tętniczym. Okazało się, że lekarze dokonują nieprecyzyjnej oceny ryzyka CV, co może wpływać na intensywność stosowanego leczenia (B. Gryglewska i inni, *Ryzyko sercowo-naczyniowe chorych z niekontrolowanym nadciśnieniem tętniczym i jego ocena w lecznictwie otwartym w Polsce*, Naciski Tętnicze 2007).

W ramach następnego projektu, przeprowadzonego w ośrodkach podstawowej opieki zdrowotnej w Polsce, poddano jednorazowej ocenie występowanie czynników ryzyka sercowo-naczyniowego u osób starszych. Okazało się, że największą rolę w zwiększeniu ryzyka CVD w tej grupie wiekowej odgrywała: a) obecność nadciśnienia tętniczego, a w szczególności nadciśnienia izolowanego skurczowego, b) dość duże rozpowszechnienie palenia tytoniu (wśród mężczyzn) oraz c) otyłość, zwłaszcza brzuszna (u kobiet). (B. Gryglewska i inni, *Czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego wśród starszych pacjentów podstawowej opieki zdrowotnej*. Prz. Lek. 2007).

W innym projekcie badawczym przeprowadzona została ocena ryzyka sercowo-naczyniowego u kobiet z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, w trakcie jednej wizyty u lekarza POZ. Analiza

zgrupowanych danych pokazała, że w młodszych grupach wiekowych ryzyko sercowo-naczyniowe było głównie związane z paleniem papierosów, w grupie starszych kobiet wzrastało wraz ze zwiększaniem się nadwagi, otyłości i otyłości brzusznej, a w najstarszej grupie wiekowej wiązało się z obecnością choroby sercowo-naczyniowej lub cukrzycy (B. Gryglewska i inni, *Women with prehypertension in primary care - Risk profile on the basis of selected cardiovascular risk factors*, Blood Pressure 2009).

W latach 2003-2006 uczestniczyłam w realizacji międzynarodowego projektu EUROACTION mającego na celu zbadanie, czy multidyscyplinarny zespół koordynowany przez pielęgniarkę, stosujący odpowiedni prewencyjny program kardiologiczny, może poprawić standardy profilaktyki kardiologicznej w opiece medycznej. Projekt finansowany był przez European Society of Cardiology. Pełniłam w nim funkcję koordynatora dla przychodni Podstawowej Opieki Zdrowotnej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Program prowadzony był w ośmiu krajach Europy. W każdym z nich wytypowano po sześć par szpitali (dla części programu dotyczącej kardiologii interwencyjnej) i po sześć par przychodni medycyny rodzinnej (dla części programu dotyczącej podstawowej opieki zdrowotnej). Do programu kwalifikowani byli pacjenci z chorobą wieńcową i bezobjawowi chorzy z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym. Ustalono, że aby prowadzić skuteczne działania prewencyjne schorzeń układu sercowo-naczyniowego należy, biorąc pod uwagę specyfikę poszczególnych krajów, opracować specjalistyczny program prewencyjny możliwy do zastosowania we wszystkich szpitalach i przychodniach sprawujących opiekę nad pacjentami z chorobami układu sercowo-naczyniowego lub nad pacjentami bezobjawowymi, obciążonymi wysokim ryzykiem choroby sercowo-naczyniowej. Rezultaty zostały opublikowane w pracy D.A. Wood et al., *Nurse-coordinated multidisciplinary, family-based cardiovascular disease prevention programme (EUROACTION) for patients with coronary heart disease and asymptomatic individuals at high risk of cardiovascular disease: a paired, cluster-randomised controlled trial*, Lancet 2008.

## 5.2 Udział w projektach badawczych

### Projekty krajowe

Grant własny MNiSzW: „*Wpływ zaburzeń własności reologicznych erytrocytów na rozwój niekorzystnych zmian narządowych i naczyniowych u pacjentów z czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego*”; okres realizacji: **2009-2012**; **kierownik grantu**

Projekt statutowy CM UJ nr K/ZDS/003787: „*Zaburzenia składu pierwiastkowego erytrocytów w odniesieniu do zmian ich własności reologicznych oraz zmian w mikrokrążeniu skórnym u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym*”; okres realizacji: **2012-2015**; **kierownik projektu**

Projekt statutowy CM UJ nr K/ZDS/0001041: „*Zmiany własności fizyko-chemicznych erytrocytów w przebiegu choroby nadciśnieniowej, cukrzycy i hyperlipidemii oraz ich wpływ na geometrię lewej komory serca*”; okres realizacji: **2009-2011**; **kierownik projektu**

Projekt statutowy CM UJ nr 501/NKL/184L: „*Własności reologiczne erytrocytów a ryzyko choroby sercowo-naczyniowej*”; okres realizacji: **2006-2007**; **kierownik projektu**

Projekt własny CM UJ: „*Wpływ małych dawek aspiryny na zmianę sztywności ścian erytrocytów oraz na agregację erytrocytów*”; okres realizacji: **2005-2006**; **kierownik projektu**

Projekt statutowy CM UJ nr 501/NKL/137/L: „*Ocena powtarzalności pomiarów kompleksu intima-media tętnic szyjnych za pomocą dwuwymiarowego badania ultrasonograficznego*”; okres realizacji: **2005**; **kierownik projektu**

Projekt własny CM UJ, nr WŁ/580/KL/L, WŁ/NKL/19/L: „*Analiza epidemiologiczna nawrotowych zapaleń płuc u pacjentów hospitalizowanych w latach 1999-2002*”; okres realizacji: **2003-2004**; **kierownik projektu**

Grant KBN nr 6 P05D 002 20: „*Badania epidemiologiczne nad zwyczajami żywieniowymi jako czynnikami ryzyka w wybranych chorobach nowotworowych układu trawiennego*”; okres realizacji: **2001 - 2004**; **współwykonawca**

Projekt statutowy CM UJ nr: 501/KL/444/L: „*Analiza przepływów metodą Dopplera w układzie naczyniowo-kręgowym człowieka w aspekcie wpływu nitratów*”; okres realizacji: **2001-2002**; **kierownik projektu**

Projekt własny CM UJ nr 17/PKL/91: „*Zachorowalność na białaczkę u dorosłych i dzieci w rejonie krakowskim w okresie 1978-1991*”; okres realizacji: **1999-2001**; **kierownik projektu**

### Projekty międzynarodowe

Projekt: „*Epleronone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*” (Badanie oceniające bezpieczeństwo i efektywność leczenia eplerenonem u pacjentów z pozawałową niewydolnością serca), IND#51, 780, wg. protokołu Ie3-99-02-035; okres realizacji projektu: **1999 – 2004**; charakter udziału: Deputy Coordinator at the University Hospital in Kraków

Projekt European Society of Cardiology: „*Multidisciplinary, family-based cardiovascular disease prevention programme EUROACTION for patients with coronary heart disease and asymptomatic individuals at high risk of cardiovascular disease: a paired, cluster-randomised controlled trial*”, zarejestrowany pod numerem ISRCTN 71715857; okres realizacji projektu:

**2003-2006**; charakter udziału: Coordinator at the Primary Care Unit of the University Hospital in Kraków.

### 5.3 Referaty wygłoszone na konferencjach międzynarodowych

**M. Fornal**, M. Dubiel, M. Stompór, J. Królczyk, T. Grodzicki.  
"Impaired Microvascular Reactivity in Patients at High Cardiovascular Disease Risk".  
EUROPREVENT 2007: Annual Congress of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation, April 19-21, 2007, Madrid, Spain.

**M. Fornal**, R.A. Korbut, M. Lekka, G. Pyka-Fościk, B. Wizner, J. Styczeń, T. Grodzicki.  
"Deformability, Aggregability and Stiffness of Erythrocytes in Patients at High Cardiovascular Disease Risk".  
14<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 27 – 30, 2007, Dresden, Germany.

**M. Fornal**, R.A. Korbut, J. Królczyk, T. Grodzicki.  
"Evolution of rheological properties of erythrocytes and left ventricular geometry in cardiovascular disease risk patients".  
15<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 28 – July 2, 2009, Pontresina, Switzerland.

**M. Fornal**, R.A. Korbut, T. Grodzicki.  
"Relevance of erythrocyte deformability to the concentration of soluble cell adhesion molecules and glomerular filtration rate in patients with untreated essential hypertension".  
16<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, June 18 – 21, 2011, Monachium, Germany.

**M. Fornal**, B. Wizner, M. Cwynar, J. Królczyk, A. Kwater, R.A. Korbut, T. Grodzicki.  
"Red blood cell distribution width (RDW) and MCHC as probes of target organ damage and inflammation component in newly diagnosed hypertension".  
17<sup>th</sup> Conference of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, July 6 – 9, 2013, Pecs, Hungary.

### 5.4 Członkostwo w komitetach i towarzystwach naukowych

członek Advisory Committee of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, od 2011 r.,

członek:

International Society for Clinical Hemorheology, od 2008 r.

Towarzystwo Internistów Polskich

Polskie Towarzystwo Gerontologiczne

Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

European Society of Cardiology

Polskie Towarzystwo Alzheimerowskie

5.5 Współczynniki bibliometryczne  
(pełną analizę bibliometryczną zawiera osobny załącznik)

Sumaryczny „impact factor”: **22,374**

Współczynnik Hirscha (wg. bazy Web of Science): **4**

Punktacja KBN/MNiSW: **262**

„Indeks Copernicus”: **83,26**

„Impact factor” publikacji z udziałem w badaniach wielośrodkowych: **28,409**

Liczba cytowań (wg. ISI Web of Science z dnia 28.08. 2013): **63**

**6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna**

**od 1990** prowadzenie ćwiczeń i seminariów z zakresu propedeutyki chorób wewnętrznych dla studentów III roku Wydziału Lekarskiego CM UJ (do 1993 r. Akademii Medycznej im. M. Kopernika)

**1995 – 2005** prowadzenie ćwiczeń i seminariów z zakresu chorób wewnętrznych dla studentów VI roku Wydziału Lekarskiego CM UJ

**1997** prowadzenie zajęć z zakresu chorób wewnętrznych dla studentów zagranicznych IV roku Wydziału Lekarskiego CM UJ

**2000 – 2007** koordynowanie oraz opieka dydaktyczna nad lekarzami odbywającymi staż podyplomowy z zakresu chorób wewnętrznych w Klinice Chorób Wewnętrznych i Geriatrii (do 2001 r. w I Klinice Chorób Wewnętrznych) Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

**2007 – 2011** prowadzenie ćwiczeń i seminariów z zakresu chorób wewnętrznych i geriatrii dla studentów Szkoły Medycznej dla Obcokrajowców Wydziału Lekarskiego CM UJ

**od 2008** opieka dydaktyczna nad lekarzami odbywającymi staż podyplomowy z zakresu chorób wewnętrznych w ramach świadczenia usług zdrowotnych w Poradni Podstawowej Opieki Zdrowotnej SU w Krakowie

**2009 – 2011** prowadzenie ćwiczeń i seminariów z zakresu geriatrii dla studentów VI roku Wydziału Lekarskiego CM UJ

**od 2010** prowadzenie wykładów z zakresu geriatrii w ramach kursu specjalizacyjnego studiów podyplomowych Medycznego Centrum Kształcenia Podyplomowego CM UJ

**od 2012** prowadzenie wykładów i ćwiczeń z zakresu geriatrii dla studentów kierunku Dietetyka CMUJ

**2012** zorganizowanie zebrania założycielskiego Polskiego Towarzystwa Hemoreologii i Mikrokrążenia; koordynator rejestracji Towarzystwa

Kraków 7.11.2013

Miejsce i data

Maria Fornal

Maria Fornal