

Autoreferat

Dr n. biol. Tomasz Paweł Mikołajczyk

**Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum**

Kraków 2016

1. Imię i Nazwisko:

Tomasz Paweł Mikołajczyk

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

- 2004-2009** Studia doktoranckie na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego;
opiekun naukowy: prof. dr hab. med. Juliusz Pryjma;
dyplom doktora nauk biologicznych – październik 2009;
Rozprawa doktorska pt. „Interakcje monocytów z apoptotycznymi granulocytami obojętnochłonnymi” otrzymała wyróżnienie;
- 1999-2004** Studia magisterskie na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego;
opiekun naukowy: prof. dr hab. med. Juliusz Pryjma;
dyplom mgr biologii – czerwiec 2004.

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

- 2010** Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi, Wydział Lekarski,
- obecnie Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, początkowo jako asystent, a od października 2015 jako adiunkt.

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego: **cykl prac** pod tytułem:

„Mechanizmy zapalne dysfunkcji naczyniowej”

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

- 1. Mikołajczyk TP, Osmenda G, Batko B, Wilk G, Krezelok M, Skiba D, Śliwa T, Pryjma JR, Guzik TJ: „Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus” Lupus 2016; 25: 18-27;**

IF= 2.118, MNiSW= 25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, zaprojektowaniu badania, zaplanowaniu doświadczeń, kierowaniu projektem obejmującym badania opisane w pracy, a także na wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej. Ponadto mój udział polegał na opracowaniu i interpretacji wyników, analizie statystycznej i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

2. **Mikolajczyk TP**, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, Sagan A, Wu J, Vinh A, Marvar PJ, Guzik B, Podolec J, Drummond G, Lob HE, Harrison DG, Guzik TJ: „Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T cell accumulation and vascular dysfunction in hypertension” *FASEB J.* 2016; 30: 1987-99;

IF= 5.299, MNiSW= 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, zaprojektowaniu badania, zaplanowaniu doświadczeń, koordynacji badań opisanych w pracy, a także na wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej. Ponadto uczestniczyłem w opracowaniu i interpretacji wyników, analizie statystycznej, przygotowaniu rycin i tekstu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

3. **Mikolajczyk TP**, Skiba D, Batko B, Krezelok M, Wilk G, Osmenda G, Pryjma J, Guzik T: „Characterization of the impairment of the uptake of apoptotic polymorphonuclear cells by monocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus” *Lupus* 2014; 23(13): 1358-69;

IF= 2.197, MNiSW= 25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji, zaprojektowaniu badania, zaplanowaniu doświadczeń, kierowaniu projektem obejmującym badania opisane w pracy, a także na wykonaniu oznaczeń metodą cytometrii przepływowej. Wykonywałem również oznaczenia stężenia cytokin metodą ELISA. Ponadto mój udział polegał na opracowaniu i interpretacji wyników, analizie statystycznej i przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4. Guzik TJ, **Mikolajczyk T**: „In Search of the T Cell Involved in Hypertension and Target Organ Damage” *Hypertension* 2014; 64(2):224-6; (Komentarz na zaproszenie)

IF= 6.48, MNiSW= 45

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu schematu oddziaływań międzykomórkowych i przygotowaniu ryciny obrazującej rolę IL-17A i limfocytów T $\gamma\delta$, w zależnym od Angiotensyny II modelu nadciśnienia. Uczestniczyłem również w przygotowaniu tekstu artykułu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

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

Celem naukowym wyżej wymienionego cyklu prac było poszukiwanie mechanizmów zapalnych odpowiedzialnych za rozwój dysfunkcji naczyniowej w przebiegu schorzeń sercowo-naczyniowych, takich jak nadciśnienie tętnicze, jak i również typowych schorzeń o podłożu autoimmunologicznym (na przykładzie toczenia rumieniowatego układuowego, SLE). Śródbłonek stanowi barierę oddzielającą naczynia od przepływającej krwi. Jest on jednocześnie jednym z największych organów parakrynnych ustroju i uczestniczy w produkcji wielu substancji warunkujących prawidłową funkcję homeostatyczną naczyń. Dlatego zaburzenie produkcji substancji naczynioochronnych, takich jak tlenek azotu (NO), prostacyklina, jak i nadmiar substancji prozapalnych i warunkujących skurcz naczyń (wolne rodniki tlenowe, endotelina, tromboksany) określane jest mianem dysfunkcji śródbłonka naczyniowego. Stan taki bezpośrednio poprzedza rozwój miażdży, jak i nadciśnienia tętniczego. Kluczową rolę w regulacji funkcji naczyń krwionośnych odgrywa tlenek azotu. Zależna od NO funkcja rozkurczowa naczyń uważana jest za główny wykładnik funkcji śródbłonka. Wpływa to na opór naczyniowy, a tym samym na regulację ciśnienia tętniczego krwi. Dysfunkcja śródbłonka stanowi także element łączący nadciśnienie tętnicze z miażdżycą. Wynika to z niedoboru szeregu lokalnych, przeciwmiażdżycowych działań NO, do których można zaliczyć: antyoksydacyjne, przeciwzapalne (hamowanie aktywacji leukocytów i ekspresji cząsteczek adhezyjnych), anty-proliferacyjne (hamowanie proliferacji mięśniówki gładkiej) oraz efekty przeciwplytkowe (hamowanie aktywacji i agregacji). Wpływ czynników zapalnych na komórki śródbłonka stanowi jeden z podstawowych potencjalnych mechanizmów dysfunkcji śródbłonka obok działania czynników promiażdżycowych, takich jak ox-LDL (ang. oxidized low-density lipoprotein) lub angiotensyna II. Mechanizmy zapalne obserwowane w regulacji ciśnienia tętniczego i miażdżycy nie zostały w pełni poznane. Pierwsze obserwacje wskazujące na zaburzenia, zależnej od limfocytów T, odporności w nadciśnieniu polegały na nasileniu reakcji nadwrażliwości typu późnego na antygeny naczyniowe lub nerkowe. Ponadto zaobserwowano, że usunięcie grasicy, prowadzące do niedoboru limfocytów T, skutkuje obniżeniem ciśnienia w modelach spontanicznego nadciśnienia. Podobnie działa leczenie immunosupresyjne zarówno w modelach zwierzęcych oraz badaniach klinicznych. Co więcej podanie zwierzętom normotensyjnym, pochodzących od zwierząt z nadciśnieniem limfocytów prowadziło do rozwoju nadciśnienia. Istotna przyczynowa rola układu

immunologicznego w przebiegu indukowanego angiotensyną II nadciśnienia została wykazana u myszy pozbawionych limfocytów B i T (RAG1^{-/-}), które nie rozwijały nadciśnienia pomimo działania czynników pro-nadciśnieniowych takich jak angiotensyna II. Jednocześnie re-populacja narządów limfatycznych i krwi u tych zwierząt przez wprowadzenie limfocytów T, ale nie komórek B, pochodzących od zwierząt kontrolnych prowadzi zarówno do wzrostu ciśnienia tętniczego, jak i dysfunkcji naczyniowej, indukowanych wlewem angiotensyny II. Obserwacja ta ma istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów rozwoju miażdżycy i dysfunkcji naczyniowej towarzyszących nadciśnieniu tętniczemu. Co więcej pomaga zrozumieć związki pomiędzy schorzeniami autoimmunologicznymi, a dysfunkcją naczyniową. Dlatego kluczowe jest zrozumienie mechanizmów stanu zapalnego modulującego funkcję śródbłonna naczyniowego.

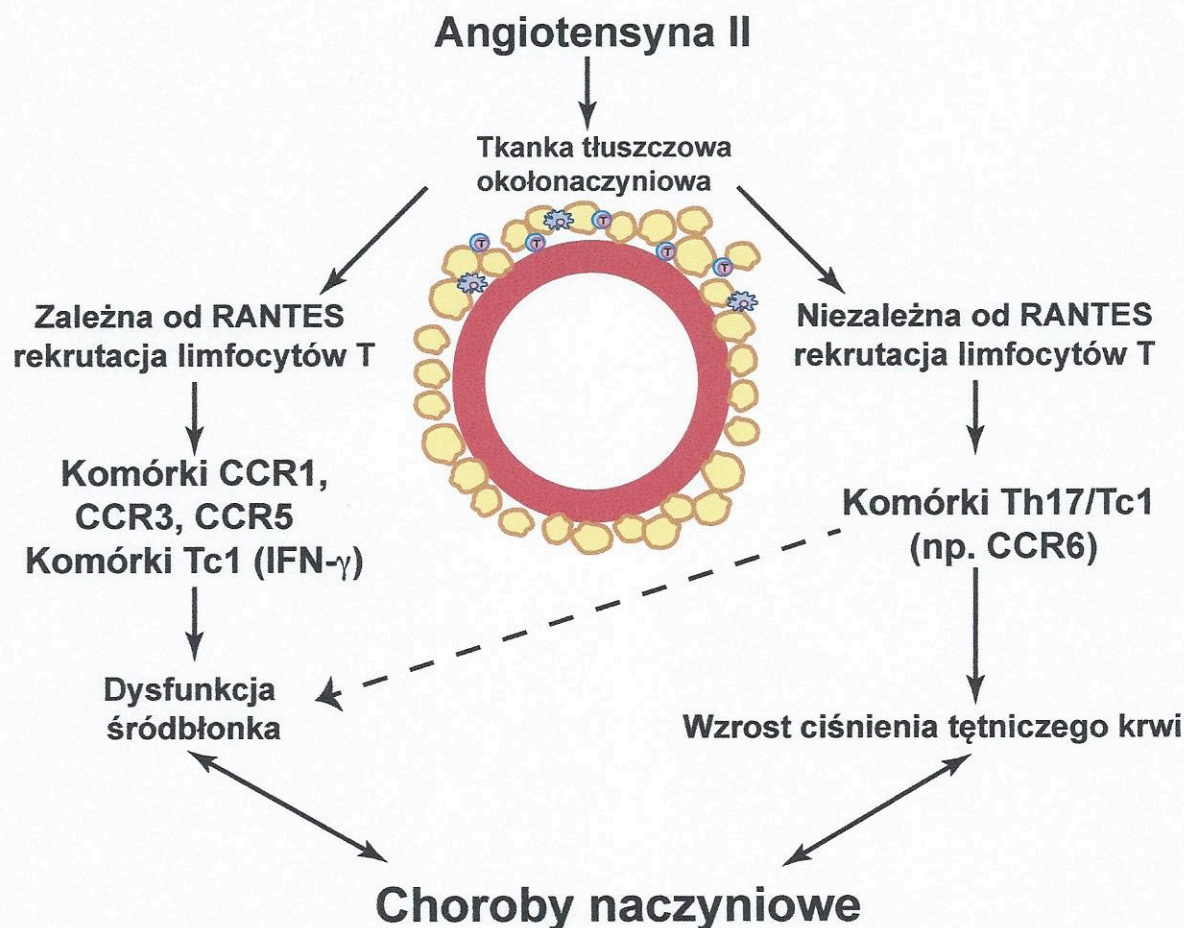
Osiągnięcie naukowe pt. „**Mechanizmy zapalne dysfunkcji naczyniowej**” stanowi cykl 4 prac, koncentrujących się na roli komórek układu immunologicznego (zarówno limfocytów T, jak i monocytów) w rozwoju dysfunkcji naczyniowej zarówno w patogenezie pierwotnego nadciśnienia tętniczego (praca 2 i 4), jak i mechanizmów tocznia rumieniowatego trzewnego, w którym opisywana jest znacznie zwiększona podatność na rozwój dysfunkcji naczyniowej i miażdżycy (praca 1 i 3).

Praca pt. „**Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T cell accumulation and vascular dysfunction in hypertension**” opublikowana w czasopiśmie FASEB Journal w 2016 roku stanowi szerokie studium nad rolą chemokiny RANTES (ang. Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted) w regulacji okołonaczyniowego stanu zapalnego i zwiększonej akumulacji limfocytów T, w przebiegu nadciśnienia tętniczego. W pracy tej, pokazałem wzrost liczby leukocytów, w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej (pVAT, ang. perivascular adipose tissue), w modelu zależnego od angiotensyny II, nadciśnienia u myszy. Wzrost ten był szczególnie widoczny w przypadku limfocytów T, makrofagów i komórek dendrytycznych, ale nie limfocytów B. Interesująca jest obserwacja wskazująca, że limfocyty T naciekające pVAT wykazują zwiększoną ekspresję receptorów CCR1 (ang. C-C chemokine receptor 1), CCR3 oraz CCR5 dla RANTES. Jednocześnie zaobserwowałem, że ekspresja mRNA dla chemokiny RANTES, w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej była zwiększona w toku rozwoju nadciśnienia, a zmiany te nie były obserwowane w innych przedziałach tkanki tłuszczowej takich jak tkanka tłuszczowa, wisceralna czy brunatna. Wzrost ekspresji chemokiny RANTES w pVAT został również potwierdzony stosując immunohistochemię. W kolejnym etapie wykazałem, że wlew angiotensyny II nasilał migrację limfocytów T, ale nie komórek B, w kierunku RANTES.

Limfocyty T podwójnie ujemne (DN T, ang. Double Negative T cell) wykazywały największy stopień migracji, w porównaniu z klasycznymi limfocytami o fenotypie CD4+ i CD8+. Stosując media pochodzące z hodowli pVAT pokazałem, że limfocyty T wykazują zwiększoną migrację w kierunku tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej pochodzącej od zwierząt hipertensyjnych, w porównaniu z migracją obserwowaną w kierunku tkanki tłuszczowej uzyskanej od zwierząt normotensyjnych. Angiotensyna II nasilała migrację zarówno limfocytów CD4, jak i CD8. Zastosowanie przeciwciał anti-RANTES hamowało zależną od angiotensyny II migrację w kierunku pVAT, ale nie w kierunku tkanki tłuszczowej pochodzącej od zwierząt normotensyjnych. Następnie wykazałem, że angiotensyna II indukowała dysfunkcję naczyniową u myszy kontrolnych C57BL/6, natomiast naczynia pochodzące od myszy RANTES^{-/-} wykazywały funkcję ochronną, co korespondowało również ze zmniejszoną produkcją anionorodnika ponadtlenkowego. Stosując telemetryczną, 24-godziną metodę pomiaru ciśnienia tętniczego krwi pokazaliśmy, że myszy RANTES^{-/-} wykazywały podobny wzrost ciśnienia, indukowanego wlewem angiotensyny II, jak myszy kontrolne. W pracy tej zbadaliśmy również związek pomiędzy stężeniem chemokiny RANTES, w surowicy pacjentów z zespołem metabolicznym i innymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, a klinicznie ocenianą funkcją śródbłoka naczyniowego (FMD, ang. flow mediated dilatation). Badania te wykazały odwrotną korelację pomiędzy FMD, a poziomem RANTES w surowicy. Jednocześnie wykazaliśmy dodatnią korelację pomiędzy RANTES, a czynnikiem von Willebranda, będącego krążącym markerem dysfunkcji śródbłoka.

W pracy pt. „Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T cell accumulation and vascular dysfunction in hypertension” udowodniłem, że myszy RANTES^{-/-} wykazywały zmniejszoną infiltrację tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej przez leukocyty, a zwłaszcza limfocyty T i w mniejszym stopniu makrofagi, w zależnym od angiotensyny II rozwoju nadciśnienia w porównaniu z myszami kontrolnymi. Angiotensyna II nasilała ekspresję receptorów CCR5, w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej u myszy kontrolnych. Myszy RANTES^{-/-} wykazywały zmniejszoną infiltrację limfocytów T CCR5+, pod wpływem angiotensyny II, w porównaniu z kontrolą. W toku rozwoju nadciśnienia dochodziło również do zwiększonej infiltracji tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej przez limfocyty CD4+ produkujące IL-17A. Zjawisko to obserwowane było w podobnym stopniu u myszy kontrolnych, jak i u myszy RANTES^{-/-}. Stosując cytometrię przepływową pokazałem, że angiotensyna II indukowała wzrost odsetka limfocytów CD8, a także limfocytów T o fenotypie podwójnie ujemnym (DN T) produkujących IFN- γ (ang. Interferon gamma) w

pVAT u myszy kontrolnych. Nie mniej jednak zjawisko to nie było obserwowane u myszy RANTES^{-/-}. Jednocześnie obniżona ekspresja mRNA dla IFN- γ została potwierdzona u myszy RANTES^{-/-}, pod wpływem angiotensyny II, w porównaniu z myszami kontrolnymi stosując real-time PCR. Interesująca jest obserwacja nasilenia dysfunkcji naczyniowej, po uprzedniej preinkubacji naczyń pochodzących od myszy kontrolnych z IFN- γ . Efekt ten był częściowo odwracalny stosując PEG-SOD (ang. Polyethylene glycol-superoxide dismutase). W pracy tej wykazaliśmy również, że zastosowanie met-RANTES indukuje poprawę funkcji śródbłonna, zmniejszenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, a także zmniejszoną infiltrację tkanki tłuszczowej okołonaczyniowej przez limfocyty T, w zależnym od angiotensyny II modelu nadciśnienia. Rola okołonaczyniowego stanu zapalnego, a także chemokiny RANTES w przebiegu indukowanego angiotensyną II nadciśnienia została przedstawiona schematycznie na **Rycinie**.



Rycina

Rola okołonaczyniowego stanu zapalnego w przebiegu indukowanego angiotensyną II nadciśnienia i innych chorób sercowo-naczyniowych

Wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, 2 kolejne prace, dotyczą związku pomiędzy zapaleniem, obserwowanym w przebiegu schorzeń o podłożu autoimmunologicznym, a funkcją naczyń u pacjentów z toczeniem rumieniowatym trzewnym.

Toczeń rumieniowaty układowy (SLE, ang. Systemic Lupus Erythematosus) jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną przebiegającą z zajęciem wielu organów. Jednym z charakterystycznych objawów SLE jest uszkodzenie naczyń krwionośnych, zwiększona podatność na miażdżycę oraz zapadalność na choroby sercowo-naczyniowe. Podstawową cechą choroby jest zanik tolerancji na własne antygeny i obecność przeciwciał przeciw chromatynie jądrowej. Mechanizmy zapalne, a także obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciw komórkom śródbłonna indukują zapalny fenotyp tych komórek i jednocześnie doprowadzają do dysfunkcji naczyniowej obserwowanej w SLE. Zaburzenia w procesie

programowanej śmierci komórki (apoptozy), a także wzrastający poziom autoantygenów, u pacjentów z SLE, związane są z defektem w usuwaniu komórek apoptotycznych. Nie mniej jednak patomechanizm tego zjawiska nie jest w pełni wyjaśniony. W pracy pt. **„Characterization of the impairment of the uptake of apoptotic polymorphonuclear cells by monocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus“** opublikowanej w czasopiśmie *Lupus* w 2014 roku podjąłem próbę wyjaśnienia patomechanizmu odpowiedzialnego za nieefektywne rozpoznanie i usuwanie komórek apoptotycznych, w przebiegu tocznia rumieniowatego trzewnego. W pracy tej wykazałem, że granulocyty obojętnochłonne wyizolowane od pacjentów z SLE, w większym stopniu wchodziły w stan programowanej śmierci komórkowej (apoptozy), w porównaniu z tymi samymi komórkami, pochodzącymi od zdrowych dawców. Monocyty krwi obwodowej pacjentów z SLE wykazywały zmniejszoną zdolność do rozpoznawania apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych, w układzie autologicznym. Nie mniej jednak komórki te efektywnie rozpoznawały apoptotyczne granulocyty obojętnochłonne pochodzące od zdrowych dawców. Monocyty o fenotypie CD14^{high}CD16⁺ i CD14^{dim}CD16⁺ efektywniej internalizowały apoptotyczne granulocyty obojętnochłonne, w porównaniu z monocytami CD14^{high}CD16⁻. Obserwowane zjawisko dotyczyło zarówno monocytów pochodzących od pacjentów z SLE, jak i komórek wyizolowanych od zdrowych dawców. Monocyty pacjentów z SLE wykazywały obniżoną ekspresję CD35 (CR1, ang. complement receptor type 1) i CD91 (receptor dla kalretikuliny) oraz wzrost ekspresji TIM-3 (ang. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3). Nie mniej jednak opisane różnice w ekspresji tych receptorów dotyczyły zwłaszcza monocytów o fenotypie CD16⁺, a defekt w usuwaniu komórek apoptotycznych widoczny był we wszystkich subpopulacjach monocytów krwi obwodowej. W opublikowanej pracy, wykazałem, że w następstwie kontaktu aktywowanych LPS jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC, ang. peripheral blood mononuclear cells) z apoptotycznymi granulocytami, w układzie autologicznym lub heterologicznym, dochodzi do wzrostu produkcji antyzapalnej cytokiny IL-10 (ang. Interleukin). Nie mniej jednak obserwowane zjawisko było w mniejszym stopniu nasilone, w hodowlach PBMC z apoptotycznymi granulocytami obojętnochłonnymi pochodzącymi od pacjentów z SLE, w porównaniu do hodowli komórek jednojądrzastych z apoptotycznymi komórkami pochodzącymi od zdrowych dawców. Obserwowane zjawiska mogą mieć związek z dysfunkcją naczyniową i miażdżycą dlatego w kolejnej pracy pt. **„Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus“** opublikowanej w czasopiśmie *Lupus* w

2016 roku podjąłem próbę wyjaśnienia związku pomiędzy subkliniczną miażdżycą ocenianą jako grubość kompleksu błony wewnętrznej i środkowej IMT (ang. intima-media thickness), dysfunkcją naczyniową, a fenotypem monocytów krwi obwodowej u pacjentów z SLE. W pracy tej wykazałem, że pacjenci z toczniem rumieniowatym układowym wykazują zwiększoną grubość kompleksu błony wewnętrznej i środkowej (IMT) tętnic szyjnych wspólnych, w porównaniu z grupą kontrolną dobraną pod względem wieku, płci oraz głównych czynników ryzyka obejmujących nadciśnienie, cukrzycę, hipercholesterolemię, a także występowanie choroby: wieńcowej (CAD, ang. coronary artery disease), tętnic obwodowych (PAD, ang. peripheral arterial disease), przemijającego niedokrwienia mózgu (TIA, ang. transient ischemic attack) oraz zawału serca (MI, ang. myocardial infraction). Jednocześnie pacjenci z SLE wykazywali nasiloną dysfunkcję śródbłonna określaną na podstawie pomiaru zależnej od przepływu rozszerzalności tętnicy ramiennej (FMD), w porównaniu z grupą kontrolną. Analogicznie, w pomiarze funkcji śródbłonna po zastosowaniu nitrogliceryny - NMD (ang. nitroglycerin mediated dilatation) nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą pacjentów z SLE a kontrolą. W pracy tej pokazałem również wzrost zarówno odsetka, jak i liczby monocytów CD14^{high}CD16⁺ na mm³ krwi u pacjentów z SLE, w porównaniu z grupą kontrolną. W pracy opublikowanej w 2016 roku w czasopiśmie *Lupus* wykazałem, że zarówno odsetek jak i liczba monocytów CD14^{dim}CD16⁺/mm³ krwi pozytywnie korelowała z grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej IMT u pacjentów z toczniem rumieniowatym trzewnym, przy jednoczesnym braku takiej obserwacji w grupie kontrolnej. Sugeruje to, że monocyty o fenotypie CD14^{dim}CD16⁺ mogą być związane ze zwiększonym ryzykiem wczesnego rozwoju miażdżycy u pacjentów z SLE, pomimo, że mechanizm tego zjawiska pozostaje niewyjaśniony. Nie jest wykluczone, że jest on związany z prozapalnym fenotypem tych komórek. Monocyty CD14^{dim}CD16⁺ wykazują zwiększoną zdolność do produkcji TNF- α (ang. tumor necrosis factor-alpha), w porównaniu z innymi subpopulacjami, podczas gdy produkcja przeciwzapalnych cytokin, takich jak IL-10 pozostaje na bardzo niskim poziomie. Jednocześnie obserwacje innych zespołów badawczych wskazują na związek pomiędzy stężeniem TNF- α w surowicy pacjentów z chorobą wieńcową, a zwiększonym odsetkiem monocytów o fenotypie CD14^{dim}CD16⁺.

Podsumowując, w pracy pt. „Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus” zasugerowałem, że obserwowano zjawisko może być związane ze zwiększoną zdolnością monocytów CD14^{dim}CD16⁺ do produkcji TNF- α i bezpośrednim działaniem tych komórek na progresję zmian miażdżycowych. Nie można również wykluczyć, że monocyty

CD14^{dim}CD16⁺ odgrywają istotną rolę w połączeniu z innymi patofizjologicznymi mediatorami w SLE, które z kolei nie są obecne w grupie kontrolnej. W pracy tej wykazałem brak związku pomiędzy subpopulacjami monocytów krwi obwodowej, a obserwowaną w przebiegu toczenia rumieniowatego trzewnego dysfunkcją naczyniową.

Kolejna z cyklu prac, wchodzących w skład tzw. osiągnięcia naukowego, to artykuł pt. **“In Search of the T Cell Involved in Hypertension and Target Organ Damage”** opublikowany w *Hypertension* w 2014 roku, który stanowi komentarz do pracy: Li Y, Wu Y, Zhang C, Li P, Cui W, Hao J, Ma X, Yin Z, Du J, pt. **“ $\gamma\delta$ T Cell-derived interleukin-17A via an interleukin-1 β -dependent mechanism mediates cardiac injury and fibrosis in hypertension”** *Hypertension* 2014, 64(2): 305-14. Prace tą załączam jako część osiągnięcia naukowego, gdyż choć stanowi ona relatywnie zwięzły komentarz, zostałem do niego zaproszony w związku z tym, iż zaproponowałem schemat oddziaływań międzykomórkowych łączących dysfunkcję naczyniową oraz mechanizmy zapalne z konsekwencjami tych procesów jakimi jest przebudowa ściany naczyń (remodelling). Omówiłem zapalne mechanizmy łączące dysfunkcję naczyniową z depozycją kolagenu i włóknienia, zarówno w mięśniu sercowym, jak i tkance otaczającej naczynia krwionośne, w toku przebiegu zależnego od angiotensyny II nadciśnienia. Centralną rolę w tym procesie odgrywają IL-17A i produkujące ją limfocyty T $\gamma\delta$. W następstwie interakcji pomiędzy monocytami (produkującymi IL-1 β), aktywowanymi komórkami dendrytycznymi (stanowiącymi źródło IL-23, IL-1 β , TNF- α), a limfocytami T $\gamma\delta$ dochodzi do wzmożonej produkcji IL-17A. W zaproponowanym schemacie IL-6 odgrywa istotną rolę w różnicowaniu fibrocytów do miofibroblastów, produkujących IL-6, TGF- β (ang. transforming growth factor beta), TNF- α i kolagan. W konsekwencji obserwowana jest depozycja kolagenu i zmiany zwłóknieniowe w mięśniu sercowym i tkance otaczającej naczynia krwionośne.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć poznawczych cyklu prac należy wymienić:

- 1. Wykazanie kluczowej roli chemokiny RANTES w przebiegu indukowanego angiotensyną II modelu nadciśnienia u myszy (*FASEB J*, 2016);**
- 2. Wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem chemokiny RANTES, a czynnikiem von Willebranda i odwrotnej korelacji pomiędzy stężeniem RANTES, a FMD u pacjentów z zespołem metabolicznym i innymi czynnikami ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (*FASEB J*, 2016);**

3. Pokazanie istotnej roli IFN- γ uwalnianego przez limfocyty naciekające ścianę naczynia, w indukcji dysfunkcji naczyniowej *in vitro* (*FASEB J*, 2016);
4. Wykazanie, że monocyty krwi obwodowej pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym wykazują defekt w rozpoznawaniu autologicznych apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych, nie mniej jednak są one zdolne do prawidłowego rozpoznawania i internalizacji komórek apoptotycznych pochodzących od zdrowych dawców (*Lupus*, 2014);
5. Pokazanie, że monocyty CD14^{dim}CD16⁺ dodatnio korelują z grubością kompleksu błony wewnętrznej i środkowej IMT u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym, przy jednoczesnym braku takiej obserwacji w grupie kontrolnej (*Lupus*, 2016);
6. Przedstawienie hipotezy dotyczącej interakcji międzykomórkowych w łączeniu dysfunkcji naczyniowej z remodellingiem, a w szczególności włóknieniem okołonaczyniowym (*Hypertension*, 2014).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo- badawczych (artystycznych)

5.1 Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych

Moje zainteresowania naukowe przed uzyskaniem stopnia doktora nauk biologicznych dotyczyły oceny właściwości fagocytarnych monocytów, w stosunku do komórek apoptotycznych. W pracy doktorskiej, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. med. Juliusza Pryjmy, pt. „Interakcje monocytów z apoptotycznymi granulocytami obojętnochłonnymi” wykazałem, że monocyty krwi obwodowej są zdolne, zarówno do rozpoznawania jak i fagocytozy, apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych. W momencie podjęcia tych badań wiadomo było, że wyprowadzone z monocytów makrofagi (hMDM, ang. Human monocyte derived macrophages) efektywnie rozpoznają i fagocytują apoptotyczne granulocyty, podczas gdy ta sama funkcja monocytów była przedmiotem kontrowersji. Wcześniejsze badania pokazały, że monocyty nabierają zdolności do rozpoznania komórek apoptotycznych dopiero w trzecim dniu różnicowania w kierunku makrofagów. Stosując cytometrię przepływową, a także mikroskopię konfokalną i elektronową pokazałem, że monocyty krwi obwodowej rozpoznają i fagocytują apoptotyczne, lecz nie świeżo izolowane granulocyty. Zastosowanie cytochalazyny D blokowało, w sposób zależny od dawki, fagocytozę komórek apoptotycznych. Usuwanie apoptotycznych granulocytów wymagało

udziału receptora CD36 i nie było zależne od udziału CD14. Stosując apoptotyczne komórki Jurkat wykazałem, że ich fagocytoza przez monocyty wymaga udziału zarówno CD36 jak i CD14. Jednocześnie zastosowanie liposomów zawierających fosfatydylo-L-serynę redukowało wiązanie apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych przez świeżo wyizolowane monocyty. Stosując sortowane subpopulacje monocytów, zdefiniowane na podstawie ekspresji antygenów CD14 (receptor dla LPS) i CD16, pokazałem, że rozpoznanie apoptotycznych granulocytów jest w przeważającej mierze związane z monocytami o fenotypie CD16+, zarówno z wysoką, jak i niską ekspresją CD14 (CD14^{high}CD16+ oraz CD14^{dim}CD16+), w porównaniu z komórkami CD14^{high}CD16-. W kolejnym etapie potwierdziłem wcześniejsze obserwacje dotyczące wzrostu produkcji antyzapalnej IL-10 przez aktywowane LPS subpopulacje monocytów podczas kontaktu z apoptotycznymi granulocytami. W tym samym układzie produkcja prozapalnych cytokin takich jak TNF- α i IL-1 β ulegała zmniejszeniu. Monocyty o fenotypie CD14^{high}CD16+ produkowały największe ilości IL-10, w porównaniu z pozostałymi subpopulacjami, wykazując przeciwzapalne właściwości. Subpopulacja monocytów CD14^{dim}CD16+ charakteryzowała się prozapalnym fenotypem, produkując największe ilości TNF- α i IL-1 β .

Wykorzystując aktywowane LPS, zymosanem i bakteriami z gatunku *Staphylococcus aureus* monocyty pokazałem, że mają one obniżoną zdolność do rozpoznania apoptotycznych granulocytów. Po części wynikało to z indukcji apoptozy w monocytach inkubowanych z zymosanem lub bakteriami z gatunku *S. aureus*. Aktywowane LPS monocyty wykazywały natomiast zwiększoną przeżywalność, a obniżona zdolność do rozpoznania komórek apoptotycznych związana była najprawdopodobniej ze zmniejszoną efektywności komórek, a nie ze zmniejszoną liczebności, tak jak w przypadku apoptotycznych monocytów. Monocyty po kontakcie z apoptotycznymi granulocytami nie wykazywały upośledzonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species) i obniżonej zdolności do zabijania bakterii.

Odzwierciedleniem tego obszaru aktywności badawczej była publikacja:

Mikołajczyk TP, Skrzeczyńska-Moncznik JE, Zarebski MA, Marewicz EA, Wiśniewska AM, Dzieba M, Dobrucki JW, Pryjma JR: „Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells” *Immunology* 2009; 128(1): 103-13;

IF= 3.276, MNiSW= 20.

W okresie przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora zaangażowany byłem również w projekty mające na celu zbadanie wpływu infekcji bakteriami z gatunku *S. aureus* na programowaną śmierć komórki, w makrofagach. Badania te wykazały, że bakterie z gatunku *S. aureus* wywołują cytoprotekcyjny efekt w makrofagach, który uniemożliwia eliminację komórek gospodarza, a tym samym umożliwia przeżywanie mikroorganizmów w zakażonych komórkach. Uczestniczyłem także w badaniach mających na celu sprawdzenie wpływu fotouczulaczy na przebieg programowanej śmierci w limfocytach oraz zdolność do rozpoznawania takich komórek przez monocyty. Zaangażowany byłem także w badanie właściwości fagocytarnych komórek nabłonkowych siatkówki pod wpływem stresu oksydacyjnego. Tym zagadnieniom poświęcone są następujące prace:

Koziel J, Maciag-Gudowska A, **Mikolajczyk T**, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, Shaw LN, DeLeo FR, Potempa J: „Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors” PLoS One 2009; 4(4): e5210;

IF= 4.351

Wolnicka-Glubisz A, Fraczek J, Skrzeczynska-Moncznik J, Friedlein G, **Mikolajczyk T**, Sarna T, Pryjma J: „Effect of irradiation with UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, 4, 6, 4²-trimethylangelicin or chlorpromazine on apoptosis of lymphocytes and their recognition by monocytes” J Physiol Pharmacol. 2010; 61(1): 107-14;

IF= 2.130, MNiSW= 20

Olchawa M, Szewczyk G, Zareba M, Piłat A, Bzowska M, **Mikolajczyk T**, Sarna T: „Sub-lethal photodynamic damage to ARPE-19 cells efficiently inhibits their phagocytic activity” Photochem Photobiol. 2010; 86(4): 772-80;

IF= 2.679, MNiSW= 20

5.2 Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych kontynuowałem badania dotyczące właściwości fagocytarnych monocytów krwi obwodowej i ich subpopulacji w stosunku do apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych. Badania te miały na celu poszukiwanie

mechanizmów odpowiedzialnych za defekt w usuwaniu komórek apoptotycznych u pacjentów z SLE. Temu zagadnieniu poświęcona jest praca:

Mikołajczyk TP, Skiba D, Batko B, Krezelok M, Wilk G, Osmenda G, Pryjma J, Guzik T: „Characterization of the impairment of the uptake of apoptotic polymorphonuclear cells by monocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus” *Lupus* 2014; 23(13): 1358-69;
IF= 2.197, MNiSW= 25

Zaangażowany byłem również w badania mające na celu określenie fenotypu monocytów krwi obwodowej w przebiegu schorzeń o podłożu autoimmunologicznym oraz na poszukiwaniu związku pomiędzy fenotypem tych komórek, a dysfunkcją naczyniową pojawiającą się w przebiegu większości tych schorzeń. Tym zagadnieniom poświęcone są prace:

Mikołajczyk TP, Osmenda G, Batko B, Wilk G, Krezelok M, Skiba D, Śliwa T, Pryjma JR, Guzik TJ: „Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with Systemic Lupus Erythematosus” *Lupus* 2016; 25: 18-27;
IF= 2.118, MNiSW= 25

Sulicka J, Surdacki A, **Mikołajczyk T**, Strach M, Gryglewska B, Cwiklińska M, Balwierz W, Guzik T, Grodzicki TK: „Elevated markers of inflammation and endothelial activation and increased counts of intermediate monocytes in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia” *Immunobiology* 2013; 218(5): 810-6;
IF= 3.180, MNiSW= 25

Surdacki A, Sulicka J, Korkosz M, **Mikołajczyk T**, Telesinska-Jasiówka D, Klimek E, Kierzkowska I, Guzik T, Grodzicki TK: „Blood monocyte heterogeneity and markers of endothelial activation in ankylosing spondylitis” *J Rheumatol* 2014; 41(3): 481-9;
IF= 3.187, MNiSW= 30

Klimek E, **Mikołajczyk T**, Sulicka J, Kwaśny-Krochin B, Korkosz M, Osmenda G, Wizner B, Surdacki A, Guzik T, Grodzicki TK, Skalska A: „Blood monocyte subsets and selected

cardiovascular risk markers in rheumatoid arthritis of short duration in relation to disease activity” Biomed Res Int 2014; 2014: 736853;

IF= 1.579, MNiSW= 30

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, zaangażowany byłem przede wszystkim w badania mające na celu scharakteryzowanie subpopulacji limfocytów T oraz roli chemokin, w przebieg indukowanego angiotensyną II modelu nadciśnienia u myszy. Tej tematyce badawczej poświęcone są następujące prace:

Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D, Sagan A, Wu J, Vinh A, Marvar PJ, Guzik B, Podolec J, Drummond G, Lob HE, Harrison DG, Guzik TJ: „Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T cell accumulation and vascular dysfunction in hypertension” FASEB J. 2016; 30:1987-99;

IF= 5.299, MNiSW= 35

Guzik TJ, **Mikolajczyk T**: „In Search of the T Cell Involved in Hypertension and Target Organ Damage” Hypertension 2014; 64(2): 224-6;

IF= 6.48, MNiSW= 45

Itani HA, McMaster WG Jr, Saleh MA, Nazarewicz RR, **Mikolajczyk TP**, Kaszuba AM, Konior A, Prejbisz A, Januszewicz A, Norlander AE, Chen W, Bonami RH, Marshall AF, Poffenberger G, Weyand CM, Madhur MS, Moore DJ, Harrison DG, Guzik TJ: „Activation of Human T Cells in Hypertension: Studies of Humanized Mice and Hypertensive Humans” Hypertension. 2016 Jul;68(1):123-32;

IF= 6.294, MNiSW= 45

Januszewicz A, Guzik T, Prejbisz A, **Mikolajczyk T**, Osmenda G, Januszewicz W: „Malignant hypertension: new aspects of an old clinical entity” Pol Arch Med Wewn. 2016; 126: 86-93;

IF= 2.054, MNiSW= 25

Związek pomiędzy stanem zapalnym, a fenotypem komórek układu immunologicznego podejmowany był również w pracach:

Maciąg J, Osmenda G, Nowakowski D, Wilk G, Maciąg A, **Mikołajczyk T**, Nosalski R, Sagan A, Filip M, Drózd M, Loster J, Guzik TJ, Cześnikiewicz-Guzik M: „Denture-related stomatitis is associated with endothelial dysfunction” Biomed Res Int 2014; 2014: 474016;

IF= 1.579, MNiSW= 30

Maciąg J, **Mikołajczyk T**, Matusik P, Nosalski R, Sagan A, Maciąg A, Nowakowski D, Wilk G, Osmenda G, Guzik T, Cześnikiewicz-Guzik M: „Systemic T Cells and Monocyte Characteristics in Patients with Denture Stomatitis” J Prosthodont. 2016 Feb 16. doi: 10.1111/jopr.12447;

IF= 1.133, MNiSW= 20

Sagan A, Mrowiecki W, **Mikołajczyk TP**, Urbanski K, Siedlinski M, Nosalski R, Korbut R, Guzik TJ: „Local inflammation is associated with aortic thrombus formation in abdominal aortic aneurysms. Relationship to clinical risk factors” Thromb Haemost. 2012; 108(5): 812-23;

IF= 6.094, MNiSW= 35

Maga P, **Mikołajczyk TP**, Partyka L, Krzanowski M, Malinowski K, Nizankowski R: „Percutaneous transluminal angioplasty in patients with peripheral arterial disease does not affect circulating monocyte subpopulations” Biomed Res Int 2016- praca zaakceptowana do druku;

Schramm A, Jasiewicz-Honkisz B, Osmenda G, Wilk G, Siedlinski M, Sagan A, Matusik P, Maciąg J, Sliwa T, Cześnikiewicz-Guzik M, **Mikołajczyk TP**: „Th17 responses are not altered by natural exposure to seasonal allergens in pollen-sensitive patients” Allergy, Asthma & Clinical Immunology- praca zaakceptowana do druku;

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora uczestniczyłem również w projektach mających na celu określenie związków pomiędzy markerami zapalenia, a homeostazą naczyniową. Temu obszarowi badań poświęcone są następujące prace:

Kopeć G, Tyrka A, Miszański-Jamka T, **Mikołajczyk T**, Waligóra M, Guzik T, Podolec P: „Changes in exercise capacity and cardiac performance in a series of patients with

Eisenmenger's syndrome transitioned from selective to dual endothelin receptor antagonist”
Heart Lung Circ. 2012; 21(11): 671-8;

IF= 1.254, MNiSW= 20

Rudzinski P, Wegrzyn P, Lis GJ, Piatek J, Konstany-Kalandyk J, Nosalski R, **Mikołajczyk T**, Jasinska M, Pyka-Fosciak G, Guzik T, Litwin JA, Korbut R, Sadowski J: „Vasodilatory effect and endothelial integrity in papaverine- and milrinone-treated human radial arteries” J Physiol Pharmacol 2013; 64(1): 41-5;

IF= 2.720, MNiSW= 20

Kopeć G, Moertl D, Steiner S, Stępień E, **Mikołajczyk T**, Podolec J, Waligóra M, Stępniewski J, Tomkiewicz-Pająk L, Guzik T, Podolec P: „Markers of thrombogenesis and fibrinolysis and their relation to inflammation and endothelial activation in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension” PLoS One 2013; 8(12): e82628;

IF= 3.534, MNiSW= 40

5.3 Podsumowanie

Poza omówionym powyżej cyklem 4 publikacji, jestem współautorem 15 oryginalnych prac (wykaz w załączniku nr 3). Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JRC) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **61.138** (w tym jeden list do redakcji IF=6.480). Sumaryczny Impact Factor publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi **16.094**. Prace cytowane były w literaturze światowej łącznie **133** razy (wg. Web of Science Core Collection, z dnia 23.08.2016). Współczynnik Hirscha wg bazy Web of Science Core Collection wynosi **5**. Wyniki badań przedstawiałem na 11 konferencjach międzynarodowych oraz 7 krajowych. Oprócz tego jestem współautorem ponad 70 doniesień zjazdowych (szczegółowy wykaz w załączniku nr 3).

Tomasz Mikołajczyk

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie