

## Autoreferat

**1. Imię i nazwisko:** Marcin Krzanowski

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe- podanie nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytuł rozprawy doktorskiej.**

- 2002 r.- **lekarz** - dyplom ukończenia studiów na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,
- 27.04.2010 r.- **specjalista chorób wewnętrznych** – dyplom specjalizacji w zakresie chorób wewnętrznych pod kierunkiem Prof. dr. hab. med. Władysława Sułowicza,
- 18.04.2008 r.- stopień naukowy **doktora nauk medycznych** - nadany uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie na podstawie rozprawy, pod tytułem: „*Szybkość rozchodzenia się fali tętna w aorcie i grubość kompleksu intima/media a wybrane markery kalcyfikacji naczyń u chorych dializowanych otrzewnowo*”. Promotor pracy: Prof. dr. hab. med. Władysław Sułowicz. Rozprawę doktorską uznano za wyróżniającą.
- 25.11.2013 r.- **specjalista nefrolog** - dyplom uzyskania tytułu specjalisty w zakresie nefrologii pod kierunkiem Prof. dr. hab. med. Władysława Sułowicza,
- 27.03.2018 r.- **specjalista reumatolog** - pod kierunkiem dr. med. Bogdana Batko.

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

Od 2003 r. jestem zatrudniony na stanowisku (aktualnie starszego) asystenta Oddziału Klinicznego Kliniki Nefrologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie.

Od 2013 r. jestem zatrudniony w Katedrze Nefrologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie na stanowisku adiunkta.

Pracuję w Oddziale Nefrologii Zachowawczej Kliniki Nefrologii. Posiadam specjalizację z chorób wewnętrznych, nefrologii i reumatologii. Profil leczonych i prowadzonych przeze mnie pacjentów to: ostre uszkodzenie nerek, przewlekła choroba nerek, ciężkie zespoły

nerczycowe, kłębuszkowe zapalenia nerek, układowe zapalenia naczyń, powikłania hemodializoterapii i transplantacji nerek. Jestem odpowiedzialny za wykonywanie biopsji nerek własnych i przeszczepionych. Ponadto zajmuje się opieką pacjentów w Poradni Kliniki Nefrologii i Chorych po Przeszczepieniu Nerki.

W Katedrze Nefrologii prowadzę zajęcia: seminaria i ćwiczenia na Wydziale Lekarskim ze studentami III, IV i V roku zarówno z chorób wewnętrznych, jak i nefrologii.

Dodatkowo prowadzę wykłady, seminaria i ćwiczenia na kierunku Dietetyka Kliniczna i Diagnostyka Laboratoryjna.

***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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):***

***a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego***

Osiągnięciem naukowym będącym podstawą do wnioskowania o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego jest monotematyczny cykl 3 publikacji, w których jestem pierwszym autorem, zatytułowany zbiorczo

***„Choroba naczyniowa u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek-  
czynniki prognostyczne ze szczególnym uwzględnieniem determinantów  
śródbłonkowych waskulopatii”.***

Opracowanie tego wydzielonego zagadnienia jest moim indywidualnym wkładem w naukę, dotyczącym procesów przebudowy naczyń tętniczych, wybranych markerów uszkodzenia śródbłonka, stanu zapalnego, metabolizmu kostnego, nieinwazyjnych badań obrazowych, które mogą przyczynić się do wcześniejszego wykrycia zmian o typie waskulopatii u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek. Jest to kontynuacja prac będących w kręgu moich zainteresowań badawczych nad etiopatogenezą waskulopatii u chorych z PChN w stadium 5. Rozpoczynając analizę publikacji składających się na cykl osiągnięcia naukowego na wstępie należy podkreślić, że uszkodzenie naczyń tętniczych jest czynnikiem sprzyjającym

zwiększonej chorobowości i śmiertelności sercowo-naczyniowej u osób ze schyłkową niewydolnością nerek (SNN). W proces patologicznego remodelingu naczyń zaangażowane są czynniki związane z odpowiedzią zapalno-immunologiczną, elementami angiogenezy, jak również procesami odpowiedzialnymi za proliferację i apoptozę. Dodatkowo, nadmierny remodeling może być modyfikowany procesami starzenia się naczyń i pozostaje pod wpływem takich czynników jak nadciśnienie tętnicze, hiperlipidemia prowadząc w końcowym efekcie do wzrostu napięcia ściany naczyń, degeneracji włókien elastycznych, przerostu komórek mięśniówki, upośledzenia funkcji śródbłonna oraz aktywacji układu renina-angiotensyna-aldosteron. Kończącym efektem tych wszystkich procesów są zmiany w błonie środkowej naczyń, proces postępującego zwapnienia i akceleracja miażdżycy, która jako zjawisko ogniskowe charakteryzuje się odkładaniem lipidów, kolagenu, elementów komórkowych, a także tworzeniem zakrzepów w obrębie warstwy wewnętrznej naczynia.

Choroba naczyniowa w przewlekłej chorobie nerek jest wieloczynnikowa i z uwagi na niepomyślne rokowanie wymaga stałego pogłębiania wiedzy w tym podmiocie badawczym, wskazując na konieczność poszukiwania nowych, prostych użytecznych wskaźników, które mogłyby zostać zastosowane w codziennej praktyce dla oceny ryzyka sercowo-naczyniowego w tej populacji pacjentów. Prace badawcze przeze mnie prowadzone skupiają się na oznaczaniu zależności pomiędzy wybranymi markerami uszkodzenia śródbłonna, czynnikami wzrostu, wskaźnikami obrotu kostnego, krzepnięcia, mikrozapalenia toczącego się w środowisku mocznicowym a uszkodzeniem naczyń stwierdzonych w nieinwazyjnych badaniach obrazowych i badaniach histomorfologicznych skrawków naczyń tętniczych pobranych od chorych ze schyłkową niewydolnością nerek.

Badania były finansowane z projektu statutowego realizowanego w latach 2007-2009, Nr N402 011 32/0214.

Badania były finansowane z projektu statutowego realizowanego w latach 2010-2012, Nr K/ZDS/000597.

***b) autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa***

**1. Krzanowski M**, Janda K, Dumnicka P, Dubiel M, Stompór M, Kuśnierz-Cabala B, Grodzicki T, Sułowicz W. Relationship between aortic pulse wave velocity, selected proinflammatory cytokines, and vascular calcification parameters in peritoneal dialysis patients. *J Hypertens*. 2014 Jan;32(1):142-8.

Mój wkład to: Główny pomysłodawca badania. Zaprojektowanie badania. Główny wykonawca badań laboratoryjnych i klinicznych. Opracowanie wyników badań i przygotowanie manuskryptu. Swój udział oceniam na 70%.

**IF-4,720 MNiSW-40**

**2. Krzanowski M**, Krzanowska K, Gajda M, Dumnicka P, Kopeć G, Guzik B, Woziwodzka K, Dziewierz A, Litwin JA, Sułowicz W. Asymmetric dimethylarginine as a useful risk marker of radial artery calcification in patients with advanced kidney disease. *Pol Arch Intern Med*. 2018; 128 (3):157-165.

Mój udział w przygotowanej pracy polegał na zebraniu gupy badanej i kontrolnej, przygotowaniu i realizowaniu badania oraz napisaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 72%.

**IF-2,309 MNiSW -30**

**3. Krzanowski M**, Krzanowska K, Gajda M, Dumnicka P, Dziewierz A, Woziwodzka K, Litwin JA, Sułowicz W. Pentraxin 3 as a new indicator of cardiovascular –related death in patients with advanced chronic kidney disease. *Pol Arch Intern Med*. 2017; 27; (3):170-177.

Mój udział w przygotowanej pracy polegał na zebraniu grupy badanej, przygotowaniu bazy danych, realizowaniu badania oraz napisaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 70%.

**IF-2,309 MNiSW -30**

**Łączna wartość bibliometryczna cyklu powyżej wymienionych publikacji wynosi: IF- 9,338 punktacja MNiSW- 100**

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

## Publikacja nr 1

### **Relationship between aortic pulse wave velocity, selected proinflammatory cytokines, and vascular calcification parameters in peritoneal dialysis patients**

### **Zależność pomiędzy pomiarem szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie, wybranymi cytokinami zapalnymi a parametrami kalcyfikacji naczyń u chorych dializowanych otrzewnowo**

Pierwsza z oryginalnych prac ujęta do niniejszej dysertacji opublikowana w *Journal of Hypertension* przedstawia stopień uszkodzenia naczyń na podstawie trzech badań nieinwazyjnych: pomiaru szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie (AoPWV) oceniającym stopień usztywnienia naczyń tętniczych, badanie wielorzędowej spiralnej tomografii komputerowej (MSCT), przy pomocy którego szacowano obecność zwapnień (calcium scoring- CaSc) w ścianie naczyń wieńcowych oraz pomiar grubości warstwy błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej (CCA-IMT) określającej stopień zaawansowania zmian miażdżycowych. Badano występujące także zależności pomiędzy powyższymi badaniami obrazowymi. Ponadto przedmiotem analizy były badania związku AoPWV a stężeniami wybranych czynników wzrostu, wskaźnikami obrotu kostnego i markerów mikrozapalenia.

Badanie to przeprowadzono w grupie chorych dializowanych otrzewnowo. Do badania włączono 57 stabilnych pacjentów, bez objawów choroby sercowo-naczyniowej (27 kobiet, 30 mężczyzn w wieku 19-75 lat) leczonych nerkozastępczo przez okres- średnio 30,4 miesięcy. W badaniach biochemicznych oznaczono: czynnik wzrostu- TGF $\beta$ 1, czynnik wzrostu fibroblastów-23 (FGF-23), ultraczułe białko C-reaktywne (hsCRP), interleukinę 6, 18 (IL-6; IL-18), markery obrotu kostnego: osteoprotegerynę (OPG), osteokalcynę (OC), fetuinę A oraz parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej.

**Wyniki:** Stwierdzono dodatnią zależność pomiędzy pomiarem AoPWV a pozostałymi badaniami obrazowymi: CCA-IMT ( $R = 0,32$ ;  $p = 0,02$ ) i CaSc ( $R = 0,38$ ,  $p = 0,004$ ). Pomiar szybkości rozchodzenia się fali tętna w aorcie w analizie jednoczynnikowej korelował ujemnie ze średnim stężeniem osteokalcyny ( $R = 0,37$ ;  $p = 0,005$ ) oraz dodatnio ze stężeniem OPG ( $R = 0,41$ ;  $p = 0,002$ ). AoPWV był znacząco związany z czynnikiem wzrostu TGF $\beta$ 1 ( $R = 0,27$ ;  $p = 0,047$ ), parametrami stanu zapalnego: IL-6 ( $R = 0,35$ ;  $p = 0,009$ ), a także liczbą krwinek białych ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,01$ ). W modelu analizy wieloczynnikowej jedynie

osteokalcyna była predyktorem dla AoPWV. W analizie regresji dostosowanej do wieku, nadciśnienia tętniczego oraz średniego ciśnienia tętniczego (MAP) w ocenie AoPWV, również jedynie osteokalcyna była znacząco związana z wysoką (powyżej mediany) wartością AoPWV.

### **Podsumowanie uzyskanych wyników:**

Niewątpliwie cenną wartością wynikającą z pracy badawczej jest wykazanie istotnego związku pomiędzy uszkodzeniami naczyń tętniczych w różnych obszarach unaczynienia w nieinwazyjnych badaniach obrazowych zarówno pod postacią obecności zwapnień w ścianie naczyń wieńcowych w badaniu MSCT, stopnia zaawansowania zmian miażdżycowych w tętnicach szyjnych w oparciu o pomiar CCA-IMT oraz elastyczności naczyń tętniczych w badaniu AoPWV. Nasilenie sztywności ściany tętnic w grupie chorych z SNN leczonych nerkozastępczo korelowało dodatnio z TGF $\beta$ 1, markerami stanu zapalnego IL-6, WBC, stężeniami OPG i ujemnie z osteokalcyną. Czynnikiem transformującym  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), pobudza różnicowanie się komórek - calcifying vascular cells (CVCs) w kierunku osteoblastów i może mieć istotny wpływ na przebudowę naczyń. Drugim badanym markerem była OPG, która reguluje interakcję pomiędzy linią osteoklastyczną i osteoblastyczną. Ekspresja OPG może ulegać nasileniu na powierzchni komórek śródbłonna oraz komórek mięśni gładkich pod wpływem stanu zapalnego i czynników wzrostu. Uważa się, że OPG chroni przed apoptozą komórki śródbłonna i mięśni gładkich, co wskazuje na istotne znaczenie w utrzymaniu integralności wewnętrznej ściany naczynia. Natomiast odnotowana w naszym badaniu dodatnia zależność pomiędzy pomiarem AoPWV a podwyższonym stężeniem OPG może stanowić odpowiedź ustroju zarówno na wzmożoną resorpcję jak i procesy patologiczne zachodzące w tkance kostnej i naczyniowej, z czym wiąże się utrata elementów elastycznych i zwiększenie sztywności ściany naczynia w tej populacji chorych. W modelu analizy wieloczynnikowej osteokalcyna była niezależnym predyktorem dla AoPWV. Osteokalcyna jest witamino-K-zależnym polipeptydem niekolagenowym o nie do końca poznanej funkcji w procesie mineralizacji macierzy kostnej. We wcześniejszych doniesieniach wykazano, że ekspresja osteokalcyny jest większa w ścianie zwapniałej aorty w porównaniu ze zdrową tętnicą główną. W naszym badaniu pomiar stężenia osteokalcyny wydaje się być najlepszym niezależnym czynnikiem prognostycznym AoPWV i mógłby być używany do oceny sztywności naczyń tętniczych, jako prosty marker ryzyka sercowo-naczyniowego w tej populacji chorych.

## Publikacja nr 2

### **Asymmetric dimethylarginine as a useful risk marker of radial artery calcification in patients with advanced kidney disease**

### **Asymetryczna dimetyloarginina jako użyteczny wskaźnik kalcyfikacji tętnicy promieniowej u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek**

W kolejnej pracy skupiliśmy swoją uwagę na poszukiwaniu zależności pomiędzy stężeniem asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) w surowicy a wybranymi markerami uszkodzenia śródbłonna, stanu zapalnego i gospodarki mineralno-kostnej. Praca ta została opublikowana w *Polish Archives of Internal Medicine*. To kompleksowa praca badawcza nad wieloma czynnikami mogącymi wpływać na uszkodzenie naczyń u chorych w PChN w stadium 5. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) jest endogennym aminokwasem podobnym do L-argininy, związana z upośledzoną syntezą NO i uważana jest za silny czynnik prognostyczny chorób układu sercowo-naczyniowego. Uszkodzenie komórek śródbłonna jest niezmiennie związane z takimi stanami klinicznymi, jak zakrzepica naczyń, nadciśnienie, niewydolność nerek i miażdżycy. Wysokie stężenia ADMA są związane z dysfunkcją śródbłonna, a także ze zwiększeniem grubości kompleksu intima-media, co następnie przekłada się na zdarzenia sercowo-naczyniowe u chorych z SNN co potwierdzają wcześniejsze doniesienia w literaturze. Przedmiotem jednak mojej analizy było badanie zależności pomiędzy ADMA a zmianami w błonie środkowej naczyń tętniczych.

W badaniu wzięło udział 51 pacjentów z PChN, u których w trakcie wytworzenia przetoki tętniczo-żylnej do hemodializy pobrano fragment tętnicy promieniowej do badania histomorfologicznego. Badanie także objęło 33 zdrowych ochotników, u których oceniano stężenia referencyjne ADMA. W badaniach biochemicznych oznaczono: pentraksynę 3 (PTX-3), stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF1 $\alpha$ ), trombomodulinę, rozpuszczalny receptor czynnika martwicy nowotworu II (sTNFR $_{II}$ ), metaloproteinazę 2 (MMP-2), stężenie kreatyniny, albuminy, parametry gospodarki wapniowo-fosforanowej, czynnik wzrostu fibroblastów 23 (FGF-23), osteoprotegerynę (OPG), osteopontynę (OPN), osteokalcynę, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) oraz interleukinę (IL) 6 i 18. Fragmenty tętnicy promieniowej barwiono pod kątem zwapnień przy użyciu czerwieni alizarynowej. Pomiar wskaźnika CCA-IMT oceniano za pomocą ultrasonografii.

**Wyniki:** Pacjenci ze stężeniami ADMA powyżej mediany charakteryzowali się starszym wiekiem i wyższymi stężeniami PTX3, TM, MMP-2, sTNFR $_{II}$ , P, CaxP, FGF-23, OPG oraz

OPN. Stężenie ADMA powyżej mediany częściej obserwowano u kobiet i chorych hemodializowanych. Pacjenci z obecnością zwapnień w tętnicy promieniowej mieli wyższe stężenia ADMA (mediana [IQR], 0,847  $\mu\text{mol/l}$  [0,684-0,978  $\mu\text{mol/l}$ ] versus 0,708  $\mu\text{mol/l}$  [0,650-0,852  $\mu\text{mol/l}$ ];  $p = 0,029$ ). Stężenia ADMA korelowały ze stopniem zwapnień u pacjentów z klasami od 1 do 3 ( $R = 0,54$ ;  $p < 0,001$ ). Natomiast pacjenci z najbardziej zaawansowanymi zwapnieniami (stopień 4) mieli względnie niskie stężenia ADMA (mediana [IQR], 0,724  $\mu\text{mol/l}$  [0,668-0,770  $\mu\text{mol/l}$ ]). W analizie regresji wysokie stężenia ADMA przewidywały występowanie zwapnień w tętnicach promieniowych (zwłaszcza stopnia 1-3) niezależnie od statusu HD i innych czynników zwapnień, takich jak wiek, wynik ryzyka Framingham i stężenia PTX3.

Podobną zależność (choć słabszą) obserwowano pomiędzy SDF1 $\alpha$  i barwieniem czerwienią alizarynową ( $R = 0,33$ ;  $p = 0,03$ ) w stopniach od 1 do 3.

Wartości wskaźnika CCA-IMT nie różniły się między pacjentami z ADMA poniżej i powyżej mediany i nie były zależne od stężeń ADMA (0,779  $\mu\text{mol/l}$  (median [IQR], 0,87  $\mu\text{mol/l}$  [0,75–1,05] vs 0,95  $\mu\text{mol/l}$  [0,90–1,10];  $p = 0,06$ ) ( $R = 0,30$ ,  $p = 0,06$ ). Jednak zwapniałe blaszki miażdżycowe w pomiarze CCA-IMT były bardziej rozpowszechnione u pacjentów ze stężeniami ADMA powyżej 0,779  $\mu\text{mol/l}$  ( $p = 0,005$ ).

W dalszym ciągu analizy stwierdzono korelacje między log (ADMA) a następującymi parametrami: log (kreatyniny) ( $R = 0,38$ ;  $p = 0,007$ ); log (P) ( $R = 0,37$ ;  $p = 0,008$ ), log (Ca x P) ( $R = 0,43$ ;  $p = 0,002$ ), log (FGF-23) ( $R = 0,42$ ;  $p = 0,003$ ); log (OPG) ( $R = 0,47$ ,  $p = 0,001$ ), log (OPN) ( $R = 0,52$ ,  $p < 0,001$ ), log (OC) ( $R = 0,31$ ,  $p = 0,04$ ); albuminą ( $R = -0,33$ ;  $p = 0,02$ ), log (IL-6) ( $R = 0,36$ ;  $p = 0,01$ ), log (IL-18) ( $R = 0,29$ ,  $p = 0,048$ ), log (sTNFRII) ( $R = 0,59$ ;  $p < 0,001$ ); log (MMP-2) ( $R = 0,42$ ,  $p = 0,003$ ), log (TM) ( $R = 0,30$ ,  $p = 0,03$ ) i SDF1 $\alpha$  ( $R = 0,39$ ,  $p = 0,005$ ). Stwierdzono istotną zależność pomiędzy log (ADMA) a log(PTX3) ( $R = 0,31$ ;  $p = 0,04$ ).

W wielokrotnej regresji liniowej, log (sTNFRII), log (MMP-2) i SDF1 $\alpha$  były niezależnymi predyktorami log (ADMA).

Nie zaobserwowaliśmy zależności między stężeniem ADMA czy SDF-1  $\alpha$  a tradycyjnymi czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego. Nie stwierdzono różnic w stężeniach ADMA i SDF-1  $\alpha$  między pacjentami z cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym, dyslipidemią i aktywnymi palaczami tytoniu. Nie stwierdziliśmy także zależności pomiędzy log (ADMA), SDF-1  $\alpha$  a wiekiem, wskaźnikiem masy ciała (BMI), czy oceną ryzyka Framingham.

### **Podsumowanie wyników badania:**



Nasze badanie wykazało, że podwyższone stężenia ADMA były związane z większym ryzykiem wystąpienia zwapnień w błonie środkowej tętnicy (MAC) u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek. Stwierdzono, że wysokie wartości ADMA w surowicy towarzyszą MAC. Przeciwnie, stężenia ADMA nie były związane z wysokim wskaźnikiem CCA-IMT, używanego jako badania prognostycznego w subklinicznej miażdżycy, chociaż pacjenci z wysokim stężeniem ADMA częściej mieli stwierdzone blaszki miażdżycowe. Ponadto odnotowaliśmy związek między stężeniem ADMA a markerami obrotu kostnego, które były podwyższone u pacjentów ze stężeniami ADMA powyżej mediany. Pokazuje to, że ADMA jest zaangażowana w rozwój zwapnień zarówno w błonie wewnętrznej jak i środkowej naczynia.

Niespodziewanie pacjenci z najbardziej zaawansowanymi zwapnieniami (stopień 4) mieli względnie niskie stężenia ADMA. Sugeruje to, że indukowane przez ADMA uszkodzenia śródbłonna prowadzące do odkładania się depozytów wapnia w ścianie tętnic jest najbardziej widoczne we wcześniejszych etapach procesu, prawdopodobnie pod wpływem czynników związanych z obrotem kości, nawet jeśli stężenia ADMA się zmniejszają.

Cytokiny prozapalne i zaburzenia metaboliczne związane z ogólnoustrojowym stanem zapalnym są uważane za jeden z głównych mechanizmów prowadzących do dysfunkcji śródbłonna. W niniejszym badaniu marker dysfunkcji śródbłonna- SDF1 $\alpha$  oraz sTNFR $_{II}$  i MMP-2 były niezależnymi czynnikami prognostycznymi zwiększonego stężenia ADMA.

SDF1 $\alpha$  jest czynnikiem indukującym neowaskularyzację poprzez rekrutację komórek progenitorowych śródbłonna (EPC) do tkanek niedokrwienych przez zwiększone sprzężenie SDF1 $\alpha$  /C-X-C motif chemokine type-4 receptor. Podobnie jak wyniki uzyskane dla ADMA, w grupie pacjentów ze zwapnieniami w stopniach 1 do 3 wykazano istotną zależność ze stężeniem SDF1 $\alpha$ , mając na uwadze, że pacjenci z najbardziej zaawansowanymi zwapnieniami (stopień 4) mieli stosunkowo niskie stężenia SDF1 $\alpha$ . Tak więc ADMA wydaje się promować dysfunkcję śródbłonna, który szczególnie na początku ulega ciągłym procesom uszkodzenia i naprawy celem utrzymania względnie normalnej funkcji i struktury naczynia. W środowisku mocznicowym podwyższone stężenia ADMA i SDF1 $\alpha$  w surowicy można uznać za wskaźniki procesu nasilonej kalcyfikacji naczyń i mogą stanowić użyteczne narzędzie do rozpoznawania wczesnych zmian w ścianie naczynia tętniczego.

### **Publikacja nr 3**

## **Pentraxin 3 as a new indicator of cardiovascular –related death in patients with advanced chronic kidney disease**

## **Pentraksyna 3 jako nowy wskaźnik ryzyka zgonu sercowo-naczyniowego u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek**

Jak przedstawiono we wcześniejszym pracach zwapnienia naczyniowe, zmiana struktury naczynia i dysfunkcja śródbłonna naczyniowego są najważniejszymi czynnikiem ryzyka w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek.

Ostatnia praca jako podsumowanie mojego dorobku stanowiącego osiągnięcie naukowe dotyczyła roli nowej cytokiny ostrej fazy jaką jest pentraksyna 3 (PTX3), która bierze udział w odpowiedzi zapalnej oraz w rozpoznawaniu patogenów i uszkodzonych tkanek. PTX3 produkowana jest przez różne komórki w tym monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki mięśni gładkich, fibroblasty i komórki śródbłonna. PTX3 jest syntetyzowana lokalnie w miejscach zapalnych i może stanowić marker miejscowego stanu zapalnego w miejscu uszkodzenia naczynia. We wcześniej już przedstawionej pracy podwyższone stężenia ADMA istotnie korelowały z podwyższonymi stężeniami PTX3.

Celem niniejszego badania była ocena zależności pomiędzy stężeniem PTX3 a śmiertelnością z przyczyn ogólnych i sercowo- naczyniowych w grupie chorych z SNN w okresie 5-cio letniej obserwacji. Ponadto badano związek pomiędzy stężeniem PTX3 w surowicy a wybranymi markerami dysfunkcji śródbłonna, mikrozapalenia, stresu oksydacyjnego i markerów obrotu kostnego oraz obecnością zmian naczyniowych w tętnicy promieniowej ocenianych histomorfologicznie. Ponadto wykonano pomiar grubość CCA-IMT ultrasonograficznie.

Badaniem objęto 78 chorych (51 hemodializowanych, 27 w okresie przeddializacyjnym). Oznaczono stężenie: PTX3, rozpuszczalny receptor II dla czynnika martwicy nowotworów (TNF-R II), transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), stromal cell-derived factor  $\alpha$  (SDF1 $\alpha$ ) i trombomodulinę (TM), Ca, P, iPTH, interleukiny-6, ultraczułego białka C-reaktywnego (hsCRP), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-23), osteopontynę (OPN), osteoprotegerynę (OPG), osteokalcynę (OC). U 45 chorych

w czasie zabiegu wytworzenia przetoki tętniczo-żylniej pobrano fragment ściany tętnicy promieniowej, który barwiono na obecność zwapnień.

**Wyniki:** Mediana stężenia PTX3 wynosiła 1,45 (0,70-2,50) ng/ml. Pacjenci z PTX3 powyżej mediany mieli niższy wskaźnik masy ciała (BMI). Częściej byli dializowani na początku badania, a wśród dializowanych czas leczenia był dłuższy. Zgodnie z oczekiwaniami, pacjenci z wyższym stężeniem PTX3 charakteryzowali się wyższymi stężeniami markerów aktywacji śródbłonna i mikrozapalenia: TM, SDF1 $\alpha$ , TNF-R II, hsCRP, IL-6, TNF-R II, oraz z wyższymi wartościami czynników wzrostu TGF $\beta$ 1, HGF i niższym stężeniem albumin. Ponadto w tej grupie pacjentów odnotowano wyższe stężenia wskaźników obrotu kostnego: OPN, OPG, FGF-23 i fibrynogenu oraz niższe stężenie kwasu moczowego. W analizie regresji wielokrotnej log (OPG) był znaczącym czynnikiem predykcyjnym dla log (PTX3) niezależnie od wieku, statusu leczenia HD na początku badania, log (IL-6) i log (TM).

Mineralizację ściany tętnicy zidentyfikowano na skrawkach histologicznych barwionych czerwienią alizarynową. Zwapnienia różnego stopnia wykryto w próbkach tętnic promieniowych u ponad połowy pacjentów (56%). Stężenia PTX3 w surowicy nie różniły się istotnie pomiędzy pacjentami ze zwapnieniami tętnic promieniowych i bez nich: 1,39 (0,74-2,93) versus 1,02 (0,56-2,27) ng/ml;  $p = 0,2$ .

W badaniu ultrasonograficznym wartości CCA-IMT nie korelowały ze stężeniami PTX3 ( $R = 0,22$ ;  $p = 0,1$ ). Ponadto, stężenia PTX3 nie różniły się pomiędzy pacjentami z obecnością blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych i bez nich: 1,85 (0,78-2,79) versus 1,04 (0,59-1,99) ng/ml;  $p = 0,1$ .

Podczas 5-cio letniej obserwacji zmarło 27 pacjentów (35%), z czego 25 z przyczyn sercowo-naczyniowych. Śmiertelność była wyższa w grupie pacjentów ze stężeniem PTX3 w surowicy powyżej wartości mediany; współczynnik ryzyka zgonu wynosił 2,13 (95% przedział ufności 1,01-4,49) ( $p = 0,048$ ) u pacjentów z wartością mediany PTX3 w porównaniu z pacjentami z PTX3 poniżej mediany. Z innych badanych markerów stanu zapalnego jedynie stężenie hsCRP było znacząco związane ze śmiertelnością z powodu przyczyn sercowo-naczyniowych ( $p = 0,047$ ), podczas gdy nie obserwowano takiego związku dla IL-6 ( $p = 0,6$ ), IL -18 ( $p = 0,9$ ), TNF-R II ( $p = 0,9$ ), TGF $\beta$  ( $p = 0,4$ ) i HGF ( $p = 0,085$ ). W analizie regresji Coxa, PTX3 była czynnikiem predykcyjnym śmiertelności zarówno z przyczyn ogólnych, jak i sercowo-naczyniowych niezależnie od wieku, wyjściowego statusu leczenia nerkozastępczego, stężenia OPG i CRP w surowicy oraz obecności zwapnień w tętnicach promieniowych i wartości CCA-IMT.

**Podsumowanie wyników badania:**

Na podstawie przeprowadzonych badań uważamy, że stężenie PTX3 może być wczesnym, użytecznym markerem predykcyjnym śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych u chorych z SNN, jeszcze przed wzrostem specyficznego markera dla systemowego zapalenia jakim jest hsCRP. Stężenie PTX3 było czynnikiem predykcyjnym śmiertelności sercowo-naczyniowej niezależnie od klasycznych czynników ryzyka a także po uwzględnieniu wieku, wyjściowego statusu leczenia nerkozastępczego, stężenia OPG i CRP, stopnia kalcyfikacji ściany tętnicy promieniowej i CCA-IMT. W naszym badaniu pacjenci z podwyższonym stężeniem PTX3 mieli niższe stężenie albuminy i BMI co oznacza, że pacjenci z SNN są narażeni na przewlekły stan zapalny i cierpią na wyniszczenie białkowo-energetyczne będące częścią zespołu niedożywienie-zapalenie-miażdżyca (malnutrition-inflammation-atherosclerosis- MIA) co sprzyja zwiększonej śmiertelności w tej grupie chorych. Dodanie oznaczenia PTX3 jako prostego wskaźnika do oceny ryzyka sercowo-naczyniowego przyczyniłoby się do wcześniejszego rozpoznania zespołu MIA, szybszego wdrożenia postępowania profilaktycznego i zmniejszenia śmiertelności w tej grupie pacjentów.

Uwalnianie prozapalnych cytokin i zaburzenia metaboliczne związane z układowym zapaleniem należą do głównych mechanizmów prowadzące do miejscowej dysfunkcji śródbłonna u pacjentów z mocznicą. Lokalne niedokrwienie uszkadza komórki śródbłonna i może stymulować produkcję PTX3 w układzie naczyniowym, która jest szybko wykrywana w krążeniu systemowym.

Wykazaliśmy istotną zależność pomiędzy stężeniem PTX3 a stężeniami TM, SDF-1 $\alpha$  i TNFR2 - markerami aktywacji śródbłonna, które prowadzą do zmian w ścianie naczynia. Jak wspomniano zwapnienia naczyniowe u pacjentów z mocznicą dotyczą zarówno warstwy wewnętrznej i środkowej naczynia. Interesującym odkryciem jest stwierdzenie zależności pomiędzy stężeniem PTX3 a markerami kalcyfikacji: OPG, OPN i FGF-23.

Na podstawie obecnych wyników badań uważamy, że podstawowy pomiar w surowicy stężenia PTX3 należy włączyć do rutynowego badania i traktować jako nowe, nieinwazyjne narzędzie w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego przy rozpoczęciu leczenia nerkozastępczego.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci 6 prezentacji na międzynarodowych i krajowych zjazdach (zarówno jako wystąpienia ustne, jak i w wersji plakatowej), kolejne dwa streszczenia zostały przyjęte do prezentacji w ramach Kongresu ERA EDTA w Kopenhadze 2018 r.

Przedstawione wyniki badań wchodzące w skład osiągnięcia naukowego pozwalają wnioskować, że wczesne użycie powyższych biomarkerów w codziennej praktyce oraz wykonywanie tanich i nieinwazyjnych badań obrazowych pozwoliłoby zidentyfikować chorych z wyższym ryzykiem choroby sercowo-naczyniowej skutkując szybkim wdrożeniem profilaktyki i poprawiając przeżycie w tej grupie pacjentów.

### **Kontynuacja prac badawczych**

Pozostając w poszukiwaniu czynników wpływających na uszkodzenie ściany naczyń i śródbłonna w grupie chorych z SNN w kolejnej pracy, która została przyjęta do publikacji w *Therapeutic Apheresis and Dialysis* (IF-1,529 MNiSW-20), pt. *Elevated circulating osteoprotegerin levels in the plasma of hemodialyzed patients with severe artery calcification* analizowano stężenie krążącej osteoprotegeryny (OPG) i jej wpływ na strukturę naczyń tętniczych, które oceniono w badaniu histomorfologicznym (wycinek naczynia tętniczego pobrany w trakcie wytwarzania przetoki tętniczo-żylniej do hemodializ), a także w nieinwazyjnym badaniu grubości kompleksu CCA-IMT. Stężenia krążącej OPG odzwierciedlają jej syntezę i wydzielanie przez komórki ściany naczynia, głównie przez komórki mięśni gładkich i komórki śródbłonna, a zatem może ona nasilać niekorzystne skutki zmian zapalnych, co ma odzwierciedlenie w dysfunkcji komórek śródbłonna i progresji wcześniejszych zmian miażdżycowych. Kolejnym białkiem wpływającym na proces mineralizacji i zmiany ściany naczyń tętniczych jest osteonektyna (ON), określana również jako SPARC- jest niekolagenowym białkiem macierzy kostnej znajdującym w zmineralizowanych tkankach, w tym komórkach śródbłonna i fibroblastach. Wykazano, że zwiększone stężenia SPARC hamują rozprzestrzenianie się komórek i przyleganie komórek do hodowanych komórek śródbłonna, zaburzają ogniskowe zrosty w fibroblastach oraz zwiększają produkcję i aktywność metaloproteinaz macierzy. SPARC został uznany za ochronne białko, ponieważ poziom ekspresji ON zmniejsza się wraz z postępem miażdżycy i jest on niższy w zwapniałych blaszkach miażdżycowych. Z drugiej strony, występuje także osteopontyna (OPN)- wielofunkcyjne białko, które promuje mikrozapalenie charakterystyczne dla miażdżycy. OPN zwiększa się wraz z postępem i zwapnieniem blaszki miażdżycowej, co sugeruje proatherogenną rolę tego białka.

W naszej pracy podjęto także próbę analizy oceny śmiertelności z przyczyn ogólnych, jak i sercowo- naczyniowych w tej populacji chorych w okresie 5 lat obserwacji. Badaniem objęto

59 pacjentów, 36 leczonych hemodializami, a 23 pozostających w okresie przeddializacyjnym. U 34 pacjentów (58%) wykryto zmiany o typie zwapnień w błonie środkowej tętnic (MAC). W analizie regresji wielokrotnej leczenie hemodializami, TNFR II (tumor necrosis factor receptor II), ON i Framingham risk score (FRS) były niezależnymi czynnikami predykcyjnymi OPG.

W prostej regresji liniowej istotnymi predyktorami log OPG był: wiek, log kreatyniny, log BMI, log (FRS); markery obrotu kostnego: log (OPN) i log (FGF-23), log (SPARC) oraz markery stanu zapalnego: log (hsCRP), log (IL-6), log (TNFR II), log (TGF $\beta$ 1) i log (HGF).

Stężenia OPG powyżej mediany były istotnymi predyktorami obecności MAC w prostej regresji logistycznej (OR 5,33; 95% CI 1,39-20,4;  $p = 0,012$ ) oraz w regresji wieloczynnikowej uwzględniającej FRS, leczenie HD i CCA-IMT (OR 6.56; 95%CI 1.06-40.6;  $p=0.036$ ). Stężenia OPG powyżej mediany związane były z wyższymi wartościami CCA-IMT ( $1,02 \pm 0,10$  vs.  $0,86 \pm 0,13$ ;  $p < 0,001$ ) i korelowały z wystąpieniem blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych (OR 14,4; 95% CI 2,84-72, 9; 0,001), niezależnie od FRS, leczenia HD i MAC. W czasie 5-cio letniej obserwacji zmarło 25 pacjentów (42%), w tym 21 z powodu incydentów sercowo- naczyniowych. W analizie regresji Coxa stężenia OPG powyżej mediany przewidywały całkowite przeżycie niezależnie od leczenia HD, FRS, CCA-IMT oraz obecności blaszek miażdżycowych w CCA, ale nie niezależnie od MAC.

Wyniki niniejszego badania pokazują, że stężenie krążącej OPG wydaje się być kluczowym biomarkerem zmian naczyniowych zarówno zwapnień błony środkowej jak i wewnętrznej naczyń tętniczych. Według naszej wiedzy, zależność pomiędzy stężeniem OPG i zwapnieniami w błonie środkowej ocenianymi histologicznie, a zmianami miażdżycowymi wykrytymi w pomiarze CCA-IMT u pacjentów z SNN nie były wcześniej badane. W tej analizie podwyższone stężenia OPG w surowicy wiązały się z wyższym wskaźnikiem CCA-IMT, obecnością blaszek miażdżycowych i nasileniem zmian w błonie środkowej naczynia niezależnie od siebie. Zaawansowane zmiany MAC związane były z wyższymi stężeniami OPG. Wydaje się, że OPG może także odgrywać rolę w patogenezie powstawania blaszki miażdżycowej. W regresji wielokrotnej skorygowanej o status dializy tylko TNFR II i SPARC zidentyfikowano jako niezależne predyktory OPG.

Zaznaczono również, że ocena ryzyka Framingham stosowana w prognozowaniu chorób sercowo-naczyniowych u osób z subkliniczną miażdżycą tętnic była istotnie związana z OPG. Nasze badanie potwierdziło, że stężenie OPG w surowicy może być potencjalnym biomarkerem ryzyka dla wczesnej identyfikacji waskulopatii u pacjentów z SNN.

Kontynuacją przedstawionych powyżej badań będzie kolejna publikacja, zatytułowana *Soluble thrombomodulin, plasminogen activator inhibitor-1, stromal cell-derived factor-1 alpha and fibrinogen: promising biomarkers for early changes of arterial wall in patients with advanced kidney disease?*, gdzie poszukujemy kolejnych markerów wczesnych zmian w błonie środkowej ściany tętnicy promieniowej oraz wykorzystujemy nowe barwienia immunohistochemiczne takie jak *alcian blue* i *sirus red* w skrawkach tętnicy promieniowej u pacjentów z zaawansowaną niewydolnością nerek.

Wstępne wyniki pokazują, że stopień zabarwienia na obecność mukopolisacharydów i glikozoaminoglikanów, kolagenu i zwapnień w błonie środkowej tętnicy promieniowej był znacząco dodatnio skorelowany ze sobą. Barwienie *alcian blue* w 3 stopniu zaawansowania zwapnień było istotnie związane z wyższym stężeniem iloczynu CaxP, stężeniami CRP, fibrynogenu, SDF-1 $\alpha$  i trombomoduliny. W analizie regresji wielokrotnej PAI-1 był jedynym znaczącym czynnikiem predykcyjnym *alcian blue* w 3 stopniu zaawansowania zwapnień skorygowanym o status dializoterapii, iloczyn CaxP i stężenia CRP. Natomiast pacjenci z ciężkimi zwapnieniami w tętnicach promieniowych, które oceniono barwieniem czerwienią alizarynową, mieli wyższe stężenia trombomoduliny w porównaniu z pacjentami o mniejszym zaawansowaniu zmian.

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

### **a) Podsumowanie dorobku naukowego- analiza bibliometryczna:**

Jestem autorem 53 (publikacji pełnotekstowych o łącznej wartości **IF- 39,167**

(z wyłączeniem dorobku stanowiącego dzieło- **29,829**); punktacji MNiSW- 676 (z wyłączeniem dorobku stanowiącego dzieło- 576)

**Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection - 73**

**Indeks Hirsha: 5**

### **W skład moich publikacji pełnotekstowych wchodzi:**

Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe: 35

Prace poglądowe: 8

Opisy przypadków: 9

Listy do redakcji czasopism: 1

**Łączna ilość doniesień zjazdowych 72**

- międzynarodowe: 39
- krajowe: 33

Listę publikacji niewchodzących w skład osiągnięcia w rozumieniu 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.) załączono w odrębnym dokumencie (*załącznik nr 3*).

Podsumowanie działalności naukowo-badawczej przedstawia analiza bibliometryczna opracowana przez Oddział Informacji Naukowej Biblioteki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum z dnia 04.05.2018 r. zamieszczona w *załączniku nr 4*.

Marcin  
Krausowski