

Katedra Immunologii
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Załącznik 3
Autoreferat

Lidia Magdalena Gackowska

1. Dane wnioskodawcy

Imię: Lidia Magdalena
Nazwisko: Gackowska
Dane kontaktowe: l.gackowska@cm.umk.pl

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

- **26.05.2000** - tytuł: magister, kierunek analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Temat pracy magisterskiej: „*Oznaczenie stężenia białka C-reaktywnego u chorych na raka stercza w korelacji z PSA*”. Promotor: dr Barbara Kempieńska
Diagnosta laboratoryjny PWZDL: SERIA AA 11091
- **15.09.2004** - stopień: doktor nauk medycznych, z zakresu biologii medycznej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy. Temat rozprawy doktorskiej: „*Działanie immunomodulacyjne różnych szczepów bakterii kwasu mlekowego in vitro na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej*”. Promotor: dr hab. Jacek Michałkiewicz
- **25.05.2016** - tytuł: Specjalista Laboratoryjnej Immunologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, nr dokumentu dyplomu: Nr 023/2016.1/6 wydany przez Dyrektora Centrum Egzaminów Medycznych dr hab. n. med. Mariusza Klenckiego (Łódź, 25.05.2016 r.)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych i pełnione funkcje.

- **2000-2004** – uczestnik studiów doktoranckich, Katedra i Zakład Immunologii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
- **2004-2008** – asystent, Katedra Immunologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygier w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

- **2008 - do chwili obecnej – adiunkt naukowo-dydaktyczny**, Katedra Immunologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
 - **2011–2020 – p. o. kierownika Pracowni Immunologii Klinicznej i Eksperymentalnej** Katedra Immunologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
 - **07.2020-09.2020 – wolontariusz**, Klinika Hematologii, Szpital Uniwersytecki nr 2 im. Jana Biziela z siedzibą w Bydgoszczy, umowa wolontariatu w okresie 01.07.2020-30.09.2020 (wykonywanie czynności diagnostyki laboratoryjnego, diagnostyka cytometryczna)
 - **10.2020 – do chwili obecnej – zleceniobiorca świadczenie zdrowotne w zakresie czynności diagnostyki laboratoryjnego**, Klinika Hematologii, Szpital Uniwersytecki nr 2 im. Jana Biziela z siedzibą w Bydgoszczy (diagnostyka cytometryczna)
 - **07.2023 – do chwili obecnej – p.o. kierownika Katedry Immunologii**, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).**

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

„Pierwotne nadciśnienie tętnicze dzieci i młodzieży jako choroba immuno-metaboliczna związana z zaburzeniami nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej”

Osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane **cyklem 5 przedstawionych poniżej prac naukowych**, w czasopiśmie ujętych w bazach: Journal Citation Reports (JCR), Web of Science Core Collection i Scopus. Uzyskane wyniki powstały przy **współpracy z Instytutem „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie**. Prace opublikowano w recenzowanych czasopiśmie naukowych o łącznej wartości wskaźnika Impact Factor (IF) równym **20,489** i łącznej wartości **punktacji MNiSW/MEiN: 85/200 (łącznie 285)**. Liczba cytowań wynosi odpowiednio: **61 wg bazy Web of Science Core Collection i 70 wg bazy Scopus**, wg. stanu na dzień złożenia wniosku.

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje zostały uszeregowane **zgodnie z rokiem wydania i stanowią ciąg tematyczny**. Uzupełnieniem poniższego wykazu są oświadczenia o wkładzie poszczególnych współautorów w powstanie prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, zawarte w Załączniku 5 dołączonym do Wniosku.

H-1. Mieczysław Litwin, Jacek Michałkiewicz, **Lidia Gackowska**. Primary Hypertension in Children and Adolescents is an Immuno-Metabolic Disease with Hemodynamic Consequences. *Curr Hypertens Rep* (2013) 15:331–339.

IF: 3,902, MNiSW: 25, 19 cyt. (Web of Science Core Collection), 22 cyt. (Scopus)

Mój wkład: opracowanie koncepcji eksperymentów oznaczeń metodą cytometrii przepływowej, wykonanie i analiza badań cytometrycznych, opracowanie treści artykułu dotyczącego metody cytometrii przepływowej wraz z opracowaniem i przygotowaniem wykresów, opisem wyników, konstruowaniem dyskusji i wniosków z danych cytometrycznych. Wykonanie dyskutowanych w pracy oznaczeń mediatorów surowiczych (MMP-9, TIMP-1) metodą immunoenzymatyczną ELISA.

H-2. **Lidia Gackowska**, Mieczysław Litwin, Joanna Trojanek, Andrzej Eljaszewicz, Izabela Kubiszewska, Anna Niemirska, Aldona Wierzbicka, Jacek Michałkiewicz. Expression of Adiponectin Receptors on Peripheral Blood Leukocytes of Hypertensive Children Is Associated with the Severity of Hypertension. *BioMed Research International* (2015) 2015: 1-11.

IF: 2,134, MNiSW: 20, 11 cyt. (Web of Science Core Collection), 13 cyt. (Scopus)

Mój wkład: autor korespondencyjny, udział w opracowaniu koncepcji badań i prac eksperymentalnych, wykonanie większości oznaczeń metodą immunoenzymatyczną ELISA oraz oznaczeń cytometrycznych, analiza statystyczna, opracowanie wyników i dyskusja nad wynikami, przygotowanie tabel i wykresów, udział w przygotowaniu publikacji i edycja manuskryptu, a także korekta artykułu uwzględniająca uwagi recenzentów.

H-3. **Lidia Gackowska**, Jacek Michałkiewicz, Anna Niemirska, Anna Helmin-Basa, Maciej Kłosowski, Izabela Kubiszewska, Lukasz Obrycki, Mieczysław Szalecki, Aldona Wierzbicka, Zbigniew Kułaga, Małgorzata Wiese, Mieczysław Litwin. Loss of CD31receptor in CD4+ and

CD8+ T-cell subsets in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J Hypertens* (2018) 36:2148–2156.

IF: 4,209, MNiSW: 40, 17 cyt. (Web of Science Core Collection), 17 cyt. (Scopus)

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji badań i prac eksperymentalnych, wykonanie większości oznaczeń cytometrycznych, samodzielna analiza cytometryczna, opracowanie wszystkich uzyskanych wyników (klinicznych, diagnostycznych, immunologicznych) w postaci tabel, przygotowanie wykresów dot-plot i histogramów, dyskusja nad wynikami oraz udział w przygotowaniu i edycji manuskryptu, a także korekta artykułu uwzględniająca uwagi recenzentów.

H-4. **Lidia Gackowska**, Jacek Michalkiewicz, Anna Helmin-Basa, Maciej Klosowski, Anna Niemirska, Lukasz Obrycki, Izabela Kubiszewska, Aldona Wierzbička, Mieczysław Litwin. Regulatory T-cell subset distribution in children with primary hypertension is associated with hypertension severity and hypertensive target organ damage. *J Hypertens* (2020), 38:692-700.

IF: 4,844, MEiN: 100, 10 cyt. (Web of Science Core Collection), 13 cyt. (Scopus)

Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji badań i prac eksperymentalnych, wykonanie większości oznaczeń cytometrycznych, samodzielna analiza cytometryczna, analiza statystyczna, opracowanie wyników i dyskusja nad wynikami, przygotowanie tabel i wykresów, udział w przygotowaniu publikacji i edycja manuskryptu, a także korekta artykułu uwzględniająca uwagi recenzentów.

H-5. Izabela Kubiszewska, **Lidia Gackowska**, Łukasz Obrycki, Aldona Wierzbička, Anna Helmin-Basa, Zbigniew Kułaga, Małgorzata Wiese-Szadkowska, Jacek Michalkiewicz, Mieczysław Litwin. Distribution and maturation state of peripheral blood dendritic cells in children with primary hypertension. *Hypertension Research* (2022), 45:401-413.

IF: 5,4, MEiN: 100, 4 cyt. (Web of Science Core Collection), 5 cyt. (Scopus)

Jestem drugim autorem niniejszej pracy, o wkładzie równym wkładowi pierwszego autora (equal author). Mój wkład: udział w opracowaniu koncepcji badań i prac eksperymentalnych, współwykonanie oznaczeń cytometrycznych, udział w interpretacji wyników końcowych i dyskusja nad wynikami, przygotowanie treści opisu metodyki badań immunologicznych, ustaleniu formuły przedstawienia uzyskanych wyników w postaci tabel

i wykresów analizy cytometrycznej wraz z pierwszym autorem, współdziałał w tworzeniu treści publikacji, a także korekta artykułu uwzględniająca uwagi recenzentów.

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

4.3.1. Wprowadzenie

Nadciśnienie tętnicze jest schorzeniem cywilizacyjnym, stanowiącym jeden z dominujących problemów zdrowotnych na świecie, zwłaszcza w krajach rozwiniętych i rozwijających się. Światowa Organizacja Zdrowia donosi, iż dotkniętych tą chorobą jest ponad miliard obywateli powyżej 25 roku życia, a liczba ta cały czas rośnie. Choroba sercowo-naczyniowa (cardiovascular disease-CVD), do której zaliczamy nadciśnienie tętnicze, najczęściej ma swój początek już w dzieciństwie i jak donoszą liczne badania może być już niejako „zaprogramowana” w okresie okołoporodowym [1].

Jeden z głównych czynników ryzyka rozwoju CVD jest pierwotne/samoistne nadciśnienie tętnicze (NTP), którego etiopatologia zostaje nadal niewyjaśniona. Obecnie szacuje się, że nadciśnienie tętnicze dotyczy około **2–3,6%** całej populacji dzieci i młodzieży w przedziale wiekowym od 8 do 17 lat, gwałtownie wzrasta wraz z wiekiem i dotyka około 10% młodzieży po okresie dojrzewania w wieku powyżej 18 roku życia [2]. W całej populacji wieku rozwojowego nadciśnienie tętnicze wtórne wydaje się dominującą formą nadciśnienia tętniczego. Jednak obecnie już u młodszych dzieci rozpoznaje się NTP, a po 10 roku życia jest to już przeważająca postać nadciśnienia tętniczego. Należy podkreślić, że chociaż występuje ono znacznie rzadziej niż w populacji osób dorosłych, jest coraz większym problemem zdrowotnym nie tylko w Polsce ale na całym świecie. Uważa się, że takie przesunięcie epidemiologii nadciśnienia tętniczego samoistnego i coraz częstsze jego występowanie ściśle związane jest z ogólnoswiatową epidemią nadwagi i otyłości obserwowaną obecnie u dzieci i młodzieży. Ponadto zaobserwowano również, że towarzyszy temu znaczący wzrost średnich populacyjnych wartości ciśnienia tętniczego (blood pressure, BP) ściśle korelujących z rozwojem biologicznym, a przede wszystkim z parametrami „wielkości ciała” [3].

Badania epidemiologiczne pozwoliły na ustalenie rozkładu prawidłowych wartości ciśnienia w różnych grupach wiekowych i opracowanie siatek centylowych oraz wartości referencyjnych niezbędnych do ich interpretacji w zależności od płci, wieku i wzrostu. Jednak „epidemia otyłości” znacząco zmieniła tę zależność. Badanie populacyjne, przeprowadzone w

Polsce w grupie losowo wybranych, zdrowych dzieci w wieku szkolnym, wyraźnie wykazały, że w głównej mierze to masa ciała, a nie wzrost, determinuje populacyjne wartości BP. Ponadto analiza statystyczna wykazała, że to wartości obwodu talii (waist circumference, WC), zwiększona masa ciała i niższy wzrost, a co za tym idzie, wartości wskaźnika masy ciała BMI (body mass index, BMI), są głównymi predyktorami BP [3]. Zależności między parametrami antropometrycznymi a BP są jeszcze bardziej widoczne u dzieci z NTP. Typowy fenotyp pośredni, jakim jest nadwaga, dalej otyłość i zwiększony BMI, mogą służyć jako czynniki różnicujące w diagnostyce NTP u dzieci i młodzieży. Dodatkowo przeprowadzone na świecie badania w grupie dzieci chorych na NTP dowodzą, że blisko 30% pacjentów jest otyłych, a większość ma nadwagę. Ponadto szczegółowa analiza składu ciała wykazała, że dzieci z NTP charakteryzują się większą zawartością tkanki tłuszczowej i/lub niskim stosunkiem „beztłuszczowej” masy ciała do masy „tłuszczowej”, w porównaniu z dziećmi z prawidłowym ciśnieniem krwi. Zmiany te dotyczą głównie ilości trzewnej, tzw. wewnątrztrzewnowej tkanki tłuszczowej (intra-peritoneal visceral adipose tissue, VAT) w stosunku do ilości podskórnej tkanki tłuszczowej (SAT, subcutaneous adipose tissue). Szczegółowe analizy pozwoliły na stwierdzenie, że to nie tyle sam nadmiar tkanki tłuszczowej, ale względne zmniejszenie ilości masy mięśniowej i zwiększenie ilości tłuszczu trzewnego charakteryzują grupę dzieci i młodzież z NTP. Tym samym, umożliwiło to podział różnych postaci nadciśnienia tętniczego pierwotnego w oparciu o ocenę ilości i dystrybucji tkanki tłuszczowej. Ponieważ dzieci i młodzież z nadciśnieniem tętniczym samoistnym spełniają już jedno z kryteriów diagnostycznych zespołu metabolicznego, jakim jest nadwaga/otyłość, to stanowią grupę szczególnego ryzyka rozwoju tego zespołu [4]. Warto podkreślić, że niestety kryteria diagnostyczne zespołu metabolicznego opierają się na ocenie parametrów, które zmieniają się dość dynamicznie wraz z wiekiem. Obecnie najczęściej stosuje się definicję zespołu metabolicznego opracowaną w roku 2007 przez International Diabetes Federation, wg której do 10 roku życia dziecka nie należy rozpoznawać zespołu metabolicznego, a jedynie wskazana jest rozszerzona diagnostyka zgodna z badaniami stosowanymi w grupach ryzyka [5]. W takim ujęciu NTP u dzieci i młodzieży z prawidłowym BMI i prawidłową dystrybucją tkanki tłuszczowej i mięśniowej traktowane jest jako prawdziwe nadciśnienie tętnicze pierwotne. Chociaż klinicznie oczywiste powikłania NTP pojawiają się najczęściej dopiero między czwartą a piątą dekadą życia, nadciśnieniowe uszkodzenie narządów docelowych (target organ damage, TOD) jest widoczne już w wieku dziecięcym [6]. Do najczęstszych zaliczyć można przerost lewej komory i/lub cechy subklinicznego uszkodzenia tętnic, co stwierdza się u ponad 40% dzieci i młodzieży z rozpoznaniem NTP [7,8]. Co więcej obserwuje się ścisłą korelację

między ilością stwierdzanych kryteriów zespołu metabolicznego a częstością przerostu lewej komory (left ventricular hypertrophy, LVH) [9].

Istnieje coraz więcej danych wskazujących, że NTP jest nie tylko zjawiskiem hemodynamicznym, ale złożoną chorobą obejmującą współczulny układ nerwowy, wpływa znacząco na metabolizm i układ odpornościowy organizmu. Uważa się, że zaburzenia metaboliczne u dzieci i młodzieży z nadciśnieniem tętniczym pierwotnym nie dotyczą jedynie nieprawidłowości gospodarki lipidowej i węglowodanowej, ale dotyczą poważniejszych zaburzeń co związane jest z aktywacją nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej oraz przyspieszonym procesem dojrzewania biologicznego. Opierając się na obserwacjach grupy prowadzonej przez Pickering GW, Lever AF i wsp. wysunęli wniosek, że NTP jest zaburzeniem wzrostu mającym początek w dzieciństwie. Według nich, również **takie zmiany jak przerost komórek mięśni gładkich ściany tętnic oraz zmiany metaboliczne**, w tym insulinooporność, mogą przynajmniej częściowo **wiązać się z przyspieszonym dojrzewaniem biologicznym, które to może być przyczyną a nie skutkiem nadciśnienia tętniczego i chorób układu krążenia** [10]. W 1980 roku Katz i wsp. opisali przyspieszony rozwój biologiczny, wyrażony wiekiem kostnym, u dzieci z nadciśnieniem tętniczym [11]. W badaniach własnych chłopców z nadciśnieniem tętniczym (przeprowadzonych w ramach projektu MNiSW, PN5) stwierdzono, że rozwój biologiczny, wyrażony jako różnica między wiekiem kostnym i chronologicznym, był zwiększony o 1,5 roku w porównaniu do rówieśników dobranych pod względem wieku i wartości BMI z prawidłowym ciśnieniem krwi. Ponadto zaobserwowano również liniową zależność między przyspieszeniem wzrostu kości, a wartościami wzrostu wartości BP rozpoczynając od normotensji, poprzez stan przednadciśnieniowy, nadciśnienie pierwszego stopnia aż do stadium nadciśnienia stopnia drugiego. Kolejnym ważnym wyznacznikiem był tzw. „skok wzrostowy”, który uznany jest za jeden ze stopni dojrzałości. W Polsce przypada on na ok. 13 rok życia i często jest ściśle związany ze znacznym wzrostem wartości BP u chłopców, czego nie zaobserwowano u dziewczynek [12, 13]. Wyniki te zostały również potwierdzone w badaniu retrospektywnym w Islandii, w grupie osób dorosłych. Wykazano, że dorośli mężczyźni, których tempo wzrastania było największe w wieku od 8 do 13 lat, mieli o 66% większe ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego w porównaniu z mężczyznami, których tempo wzrostu w tym okresie było znikome. Zaś w prospektywnym badaniu Young Finns Study nadciśnienie tętnicze, zespół metaboliczny i otyłość trzewną obserwowano dużo częściej u kobiet dorosłych, które w bardzo młodym wieku (przed 12 rokiem życia) osiągnęły dojrzałość płciową [14]. Inną typową nieprawidłowością obserwowaną u dzieci z NTP jest tendencja do zwiększonego stężenia kwasu moczowego. Stwierdzono, że 89% dzieci z NTP

ma stężenie kwasu moczowego w surowicy w górnej granicy normy lub powyżej wartości referencyjnych (średnio osiąga wartości $>5,5$ mg/dl), gdzie taki wynik obserwuje się u zaledwie 30% dzieci z nadciśnieniem wtórnym i nie dotyczy to grupy dzieci z nadciśnieniem białego fartucha (white coat hypertension, WCH) oraz normotensją. Co więcej, leki hamujące produkcję kwasu moczowego (allopuryinol) lub jego zwiększone wydalanie z organizmu (probenecyd) powodowały nie tylko regulację stężenia kwasu moczowego w surowicy, ale przede wszystkim obniżenie ciśnienia krwi dzieci otyłych, u których występowały stany przednaciśnieniowe lub nadciśnienie tętnicze I stopnia [15-17]. Ponadto u osób dorosłych z nadciśnieniem tętniczym często obserwuje się znaczące zmiany stężenia glutationu, peptydu o silnych właściwościach przeciwutleniających, który uznaje się za jeden z najsilniejszych antyoksydantów w organizmie człowieka. Zwiększony stres oksydacyjny w przebiegu nadciśnienia tętniczego został odnotowany u osób dorosłych, a niewiele danych na ten temat dotyczących badań pediatrycznych [18]. W prospektywnym badaniu własnym 86 dzieci z ciężkim nadciśnieniem ambulatoryjnym (w ramach realizacji grantu MNiSW, PN4) zaobserwowano znacząco niższe stężenia glutationu w porównaniu do osób z nadciśnieniem ambulatoryjnym. Ponadto dzieci z nadciśnieniem tętniczym miały znacząco niższą aktywność peroksydazy glutationowej, wyższe stężenia asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), która pełni funkcję inhibitora syntazy tlenku azotu (NOS), i podwyższone stężenie utlenionej frakcji cholesterolu LDL (ox-LDL) w surowicy. Obserwowany zwiększony stres oksydacyjny obserwowany był również u dzieci z LVH [18]. Kolejnym ważnym spostrzeżeniem w tym badaniu była istotna zależność między wartościami BP a stężeniem parametrów surowicy warunkujących reakcje ostrej fazy, takimi jak IL-6 czy rozpuszczalna forma cząsteczki adhezji międzykomórkowej (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1), znajdującej się na komórkach śródbłonna naczyń.

W licznych badaniach w grupie osób z nadciśnieniem określono kluczowe parametry biochemiczne, wynikające zasadniczo z aktywności komórek układu immunologicznego, a należą do nich białka ostrej fazy (głównie białko C-reaktywne, CRP), cytokiny, chemokiny, metaloproteinazy (MMP), produkty degradacji kolagenu, markery stresu oksydacyjnego, adipokiny, w tym leptyna, adiponektyna czy rezystyna. Powyższe wyniki potwierdziły, że w przebiegu NTP obserwuje się przewlekły, subkliniczny stan zapalny, który uważany jest również za część zespołu metabolicznego korelujący z rozwojem cukrzycy i insulinoopornością (insulin resistance, IR) [19-21]. **Należy jednak wyraźnie podkreślić, że większość mediatorów zapalnych działa jako czynniki autokrynne/parakrynne, a więc ich poziomy w krążeniu często nie odzwierciedlają w sposób wiarygodny ich roli w patogenezie**

choroby. Trudno też stwierdzić, czy zmiany ich stężenia w surowicy są pierwotne, czy wtórne w stosunku do toczącego się procesu zapalnego. Dotyczy to zwłaszcza pacjentów dorosłych chorych na nadciśnienie tętnicze, którzy często są narażeni na wiele czynników ryzyka, takich jak palenie tytoniu, przyjmowanie używek, leków czy niezdrowe nawyki żywieniowe. W badaniach własnych opublikowanych już w 2010 roku (P12) stwierdziliśmy, że dzieci z NTP charakteryzowały się wyższymi wartościami stężenia białka C-reaktywnego (hsCRP) w surowicy i chemokin takich jak RANTES (regulated on activation, normal t-cell expressed and secreted) oraz białka zapalnego makrofagowego beta (macrophage inflammatory protein 1 β , MIP1 β) w porównaniu do dzieci z prawidłowym ciśnieniem krwi. RANTES działa głównie jako aktywator limfocytów T pamięci, a MIP1 β jest chemokiną odpowiedzialną za przyciąganie monocytów/makrofagów do miejsca zapalenia. Stężenia hsCRP korelowały z parametrami bloku metabolicznego w tym nadciśnieniem tętniczym, wielkością otyłości trzewnej, stanem stresu oksydacyjnego i TOD, takimi jak zwiększona grubość ściany tętnic szyjnych wspólnych (cIMT) i wskaźnik masy lewej komory (LVMI). Poziomy RANTES korelowały jedynie z dyslipidemią. Co ciekawe stężenie hsCRP nie korelowało ani z wartościami RANTES, ani z MIP1 β [22]. **Może to sugerować, że zapalenie naczyń w jakiś sposób poprzedza ogólnoustrojowe zdarzenia zapalne, a utrzymujący się, długotrwały, przewlekły stan zapalny w konsekwencji doprowadza do uszkodzeń narządowych, obserwowanych już na wczesnych etapach NTP u dzieci i nie jest on uwarunkowany jak wcześniej sądzono tylko towarzyszącą otyłością, ale zależy od bardziej złożonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.** Wyniki te wskazują, że ogólnoustrojowa aktywacja immunologiczna zachodzi już we wczesnym stadium NTP i dotyczy zarówno wrodzonego, jak i nabytego układu odpornościowego, który może odgrywać znaczącą rolę w patogenezie nadciśnienia samoistnego.

Niezmiernie ważną obserwacją jest fakt, że komórki układu odpornościowego, w tym leukocyty krwi obwodowej (peripheral blood leukocytes, PBL), odpowiadają również za regulację układu enzymatyczno-hormonalnego renina-angiotensyna-aldosteron (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS), który utrzymuje homeostazę płynów w organizmie, a tym samym jest kluczowy w regulacji przepływu krwi, zarówno w krążeniu ogólnym, jak i lokalnym (w tym w krążeniu nerkowym) i warunkuje ciśnienie tętnicze krwi [23]. Chon i wsp. w swoich badaniach wykazali, że u pacjentów nieleczonych z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się znacząco zwiększoną ekspresję genów odpowiedzialnych za aktywację układu RAAS, czego nie obserwowano w grupie osób z prawidłowymi wartościami ciśnienia krwi [24]. Ponadto normalizacja BP korygowała te zmiany. Coppo M. i wsp. wykazali natomiast, że

leukocyty krwi obwodowej osób dorosłych z nadciśnieniem wykazywały zwiększoną ekspresję 21 genów, o których wiadomo, że są zaangażowane w apoptozę komórek, odpowiedź zapalną i pęcherzykowy transport cząsteczek między organellami komórkowymi [25]. W badaniach własnych (grant MNiSW, PN4) PBL nieleczonych dzieci chorych na NTP wykazano zwiększoną ekspresję mRNA dla enzymu konwertującego angiotensynę (angiotensin converting enzyme, ACE) i receptora CD14, a obniżoną dla angiotensynogenu (AGT) i receptora angiotensyny II typu 1 (AT2R1). Ponadto dzieci ze zwiększonym cIMT miały istotnie niższą ekspresję mRNA dla reniny (REN) [26]. Przyczyna zmniejszonej ekspresji genów dla reniny nie jest jasna, ale zdecydowanie sugeruje, że system RAAS musi zostać aktywowany wcześniej w przebiegu NTP. Doniesienia te potwierdzają i rozszerzają pogląd, że NTP jest związane ze złożonymi reakcjami zapalnymi, które angażują wiele genów zaangażowanych zarówno w aktywację układu odpornościowego, jak i regulację BP. Zmiany w ich ekspresji można znaleźć w PBL, co pozwala ostatecznie sklasyfikować chorobę, jej przebieg kliniczny i odpowiedź na leczenie. **Badania te wskazują również, że leukocyty mogą służyć jako swego rodzaju „czujniki” NTP. Wyniki powyższych badań nie wskazują jednak, które komórki układu odpornościowego inicjują kaskadę zapalną prowadzącą do nadciśnienia.** Z badań eksperymentalnych na genetycznie zmodyfikowanych myszach wiadomo, że nadciśnienie jest związane głównie z populacją limfocytów T i komórkami prezentującymi antygen. Według hipotezy zaproponowanej przez Harrisona i wsp. komórki te prawdopodobnie naciekają nerki i układ naczyniowy, które są kluczowe dla kontroli BP [27, 28].

4.3.2 Cel naukowo-badawczy

Przez ostatnie dekady uwaga badaczy koncentrowała się głównie na przedstawionych powyżej aspektach. Zakres badań przeze mnie podjęty stanowił znaczące uzupełnienie tych obszarów komórkowej odpowiedzi immunologicznej, które wydają się kluczowe w patogenezie NTP a jednocześnie były zupełnie niezbadane. Swoją uwagę skoncentrowałam więc na ocenie udziału elementów swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej towarzyszących samoistnemu/pierwotnemu nadciśnieniu tętniczemu u dzieci i młodzieży, pozostając jednocześnie w nurcie aktualnych, światowych badań nad mechanizmami odporności komórkowej, która może być postrzegana jako podstawowy patomechanizm wystąpienia choroby, a nie jedynie skutek schorzenia. **Każde z podjętych zadań badawczych ma potencjalny aspekt diagnostyczny i terapeutyczny NTP, z docelowym zamiarem monitorowania skuteczności zastosowanego postępowania terapeutycznego i**

poszukiwania nowych standardów ukierunkowanego leczenia. Zgodnie z wynikami literaturowymi i przedstawioną na modelu zwierzęcym hipotezą **zakładałam, że niewielkie podwyższenie BP może powodować aktywację śródbłonna.** Przyglądając się fizjologicznej drodze aktywacji komórek układu immunologicznego, **aktywowany śródbłonek może ujawniać neo-antygeny, które są pobierane/przerabiane i prezentowane limfocytom T przez komórki dendrytyczne, a te rozpoznają je jako obce w regionalnych węzłach chłonnych. To indukuje silną aktywację, proliferację i różnicowanie komórek T. W fazie przednadcisnieniowej pula uczulonych komórek T jest stosunkowo niewielka, ale ich liczba wzrasta wraz z wiekiem pacjenta, podobnie jak nasilenie stanu zapalnego. Jeśli założymy dodatkowo wrodzony defekt, który warunkuje szybsze „starzenie” się to wszystkie te składowe mogą być główną przyczyną NTP w bardzo młodym wieku pacjenta.** Najważniejszym podzbiorem limfocytów T zaangażowanych w reakcję zapalną przy podwyższonym BP jest subpopulacja limfocytów Th17. Komórki Th17 wytwarzają IL-17 i poza promowaniem stanu zapalnego, zaangażowane są w patogenezę wielu chorób o podłożu autoagresywnym. IL-17 promuje wytwarzanie chemokin i cząsteczek adhezyjnych w wielu tkankach, zatem może prowadzić to między innymi do gromadzenia się innych komórek zapalnych w ścianie naczyń obwodowych i nerek, co sprzyja wytwarzaniu reaktywnych form tlenu w komórkach mięśni gładkich naczyń i zmniejsza syntezę tlenu azotu przez komórki śródbłonna. Następnie powoduje skurcz naczyń, retencję sodu, a w konsekwencji indukuje nadciśnienie tętnicze. Wykazano, że myszy pozbawione limfocytów T i limfocytów B są odporne na rozwój nadciśnienia wywołanego zarówno poprzez angiotensynę, podaż soli, adrenalinę oraz stres, a transfer limfocytów T, ale nie limfocytów B, przywracał odpowiedź nadciśnieniową na te bodźce [29,30]. **Można zatem zakładać, że to populacje i subpopulacje limfocytów T, w tym również bardzo ważna subpopulacja komórek suspensyjnych Treg jest kluczowa w kontrolowaniu nie tylko wartości ciśnienia, ale przede wszystkim zapobieganiu uszkodzeń naczyń i tkanek w wyniku trwałego stanu zapalnego oraz nadciśnienia.** Warto podkreślić, że to Treg mogą znacząco ograniczyć stan zapalny, działając na komórki T, komórki B, makrofagi, komórki dendrytyczne i limfocyty NK. W modelu mysim podanie komórek Treg chronił zwierzęta eksperymentalne przed rozwojem nadciśnienia i uszkodzeniem narządów wywołanym przez angiotensynę II lub aldosteron. Wyniki te wskazują, że Treg pełnią kluczową funkcję w utrzymaniu prawidłowego ciśnienia krwi, przynajmniej w zwierzęcych modelach eksperymentalnych [30].

Cały ten obraz prawdopodobnego patomechanizmu NTP tak znacząco uzależnionego od elementów komórkowej odpowiedzi immunologicznej był punktem wyjścia do podjęcia badań których głównym celem była próba odpowiedzi na pytania:

- Czy w przebiegu NTP istniejący stan zapalny wynika jedynie z towarzyszącej dzieciom z nadciśnieniem nadwagi/otyłości, a co za tym idzie aktywności komórek tkanki tłuszczowej (wpływu adiponektyny), jako komórek potencjalnie prozapalnych, a może komórek o właściwościach immunomodulujących?
- A może NTP związane jest raczej z wrodzonym defektem komórek kluczowych dla odpowiedzi immunologicznej, takich jak limfocyty T pomocnicze, które w warunkach fizjologicznych odpowiedzialne są za prawidłowy przebiegu reakcji immunologicznej w odpowiedzi na antygen, tutaj neo-antygeny powstające jako skutek uszkodzeń narządowych TOD?
- Czy NTP związane jest jedynie ze zwiększoną aktywnością komórek odporności nieswoistej i limfocytów prozapalnych, czy jest to raczej stan podobny do chorób autoimmunologicznych, wynikający z zachwianej immunotolerancji. Jeśli tak to jaki głęboki to defekt i których mechanizmów i komórek dotyczy?
- Co warunkuje, obserwowane w przebiegu NTP, przyspieszone starzenie biologiczne i komórkowe?

4.3.3. Omówienie wyników

Wyniki moich badań wstępnych, przedstawione w pierwszej pracy stanowiącej cykl mojego osiągnięcia naukowego (**H-1**) dotyczą oceny ogólnego stanu zapalnego i immunosupresji (ocena czynników surowiczych, subpopulacji komórek Th17 oraz całkowitych Treg), jak również aktywności tkanki tłuszczowej w kontekście tkanki immunologicznie czynnej u dzieci z NTP. Badania przeprowadzono w ramach złożonych badań pilotażowych. W naszym nieopublikowanym jeszcze badaniu nieleczonych dzieci z NTP stwierdziliśmy, że PBL dzieci z nadciśnieniem tętniczym reagowały silniej (co oceniono na podstawie profili ekspresji cytokin) na bodźce limfocytów T, takie jak lipopolisacharyd (LPS), w porównaniu do PBL dzieci z prawidłowym ciśnieniem tętniczym. Ponadto dzieci z NTP charakteryzowały się zwiększonym odsetkiem populacji komórek Th17 w porównaniu z dziećmi z prawidłowym ciśnieniem, dopasowanymi wiekiem i wartościami BMI. Dodatkowo odsetek komórek Th17 był znacznie wyższy u tych pacjentów, u których neutrofile nie wykazywały ekspresji

receptorów dla adiponektyny typu 1 (AdipoR1). Wskazuje to, że obniżona ekspresja AdipoR1 może ograniczać reakcję leukocytów na adiponektynę. To z kolei może zwiększać syntezę prozapalnej IL-17 przez limfocyty T CD4+. Analiza komórek Treg nie wykazała zależności od ekspresji receptora AdipoR1 neutrofilów. **Obserwacje te są argumentem za znaczeniem tkanki tłuszczowej i adipokin w regulację odpowiedzi zapalnej u dzieci z nadciśnieniem tętniczym.** Należy podkreślić, że istnieje ściśle kontrolowany związek między Treg, a komórkami Th17. W obecności TGF-beta, ale przy niskim stężeniu IL-6, naiwne komórki T preferencyjnie polaryzują się do Treg łącznie z obwodowymi komórkami Th17, które również mogą nabywać funkcje komórek regulatorowych. Jednakże, gdy środowisko cytokin zawiera głównie cytokiny prozapalne, takie jak IL-6 i niskie stężenia TGF-beta, wówczas limfocyty T preferencyjnie polaryzują się do populacji komórek Th17, a obwodowe Treg tracą swoje silne właściwości supresorowe i nabywają właściwości komórek prozapalnych. **Sugeruje to, że rodzaj reakcji zapalnych powstających w początkowych fazach odpowiedzi na antygeny naczyniowe może decydować o profilu odpowiedzi immunologicznej. Jeśli dodatkowo jeszcze jest on związany z nieznanym dotąd zaburzeniem dystrybucji i funkcji komórek układu immunologicznego, nie tylko warunkuje wystąpienie choroby NTP, ale również decyduje o jej przebiegu, ciężkości objawów i powikłań, jak również uzależnia efekty leczenia.** Konsekwencją niekontrolowanej i nieprawidłowej aktywacji immunologicznej są zaburzenia hemodynamiczne, które prowadzą do przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej i zwłóknienia naczyń i narządów, co w konsekwencji powoduje TOD. Głównym systemem kontrolującym przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej jest system MMP i jego inhibitorów tkankowych (TIMP). Wyniki metaanalizy przeprowadzonej w grupie osób dorosłych z nadciśnieniem tętniczym wskazują, że zarówno stężenia, jak i aktywność MMP-9 i TIMP-1 korelują dodatnio z przerostem lewej komory (LVMI). Stwierdzono również, że stężenie adiponektyny w surowicy koreluje ujemnie z MMP-9 i TIMP-1, a stosunek MMP-9/TIMP-1 jest predyktorem stabilności blaszki miażdżycowej naczyń wieńcowych i stopnia zaawansowania miażdżycy tętnic wieńcowych [31, 32]. Stwierdzono, że dzieci otyłe z nadciśnieniem miały wyższe stężenia MMP-9 w porównaniu do otyłych dzieci z prawidłowym ciśnieniem krwi. Ponadto zarówno MMP-9, jak i TIMP-1 korelowały z wartościami BMI, skurczowym ciśnieniem krwi i IR. **W naszym badaniu wstępnym zaobserwowaliśmy, że dzieci z nadciśnieniem tętniczym charakteryzują się zwiększonym stężeniem MMP-9 w surowicy w porównaniu do grupy dzieci z prawidłowym ciśnieniem tętniczym dopasowanym pod względem wieku i BMI. Ponadto dzieci z nadciśnieniem tętniczym i zespołem metabolicznym miały wyższe stężenia TIMP-1 w surowicy w porównaniu z**

dziećmi z nadciśnieniem tętniczym bez zdiagnozowanego zespołu metabolicznego. Powyższe badania w tej tematyce były przez nas kontynuowane i zostały opublikowane w 2016 roku (P34). Wyraźnie wykazały, że **powyższe obserwacje dotyczą głównie chłopców, co wskazuje na zależną od płci rolę układu MMP/TIMP w nadciśnieniu u dzieci. Wykazaliśmy również, że jedynie wartości TIMP-1 korelowały dodatnio z parametrem określającym sztywność naczyń, co wskazuje na udział TIMP-1 w przebudowie tętnic.** Dane literaturowe analizy TOD wyraźnie wskazują, że zarówno wskaźnik LVMI, cIMT, jak i sztywność tętnic zwiększają się wraz ze zmianą stanu BP począwszy od normy, przez stan przednadciśnieniowy do nadciśnienia tętniczego, i korelują wyraźnie ze stadiem NTP. Tę samą zależność potwierdzono w badaniach przeprowadzonych u dzieci z normotensją, nadciśnieniem białego fartucha i nadciśnieniem tętniczym. Jednak zmianie wartości BP często towarzyszyło również narastanie otyłości i nieprawidłowości metabolicznych. W badaniach dzieci wielokrotnie wykazano, że już w chwili rozpoznania NTP przerost lewej komory, wyrażony jako LVMI powyżej 95 percentyla dla wieku i płci, występował u ok. 50% pacjentów, w tym u ok. 15% dzieci stwierdzano ciężką postać LVH. Częstość występowania LVH była większa u dzieci z ciężkim nadciśnieniem ambulatoryjnym. Rozległość i nasilenie TOD korelują z otyłością trzewną i zaburzeniami metabolicznymi, a częstość występowania LVH wzrastała wraz z narażeniem na coraz większą liczbę składowych bloku metabolicznego. Co więcej, ciężki LVH stwierdzono tylko u pacjentów z NTP i blokiem metabolicznym. Podobnie około 40% dzieci z NTP miało objawy arteriopatii nadciśnieniowej wyrażonej jako zwiększone wartości cIMT. Zaburzenia metaboliczne, dyslipidemia znacząco nasilają uszkodzenie ściany tętnicy spowodowanej podwyższonym BP. Dlatego też, w analizowanej grupie dzieci z NTP, wzrost cIMT przewidywano na podstawie analizy wartości ciśnienia krwi i tętna oraz parametrów antropometrycznych i biochemicznych w tym wysokich wartości WC, hsCRP, stężenia homocysteiny i niskiego stężenia adiponektyny w surowicy oraz albuminurii [9, 22, 33, 34].

Podsumowując: wykazałam, że **istnieje ścisły związek między nieprawidłowościami metabolicznymi i immunologicznymi, a wartościami ciśnienia krwi oraz TOD u dzieci z NTP.** Przedstawiony powyżej fenotyp kliniczny, hemodynamiczny i diagnostyczny dzieci z NTP wyraźnie potwierdza, że **NTP u dzieci i młodzieży jest chorobą immuno-metaboliczną, przynajmniej częściowo powiązaną/uwarunkowaną nadwagą i otyłością, zwłaszcza otyłością trzewną i zaburzoną (odmienną w odniesieniu do dzieci zdrowych) aktywnością komórek układu odpornościowego.** Istnieje istotny związek zarówno między parametrami antropometrycznymi, rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej, zaburzeniami

metabolicznymi, zaburzeniami naczyniowymi i przede wszystkim immunologicznymi a NTP i wynikających z niego TOD. Nadal nieznan pozostaje jednak dokładny mechanizm komórkowy elementów nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej, co stało się punktem wyjścia oraz podstawą celowości podjętych przez mnie dalszych badań.

Powyższe wyniki pilotażowych badań własnych tylko utwierdziły mnie w przekonaniu, że NTP towarzyszy ogólnoustrojowy stan zapalny niskiego stopnia, który związany jest ze składowymi zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Ta obserwacja stała się punktem wyjścia do poszerzenia badań szczegółowo opracowanych i przedstawionych w pracy **H-2, której głównym aspektem jest ocena ekspresji receptorów dla adiponektyny w populacji leukocytów krwi obwodowej (limfocytach, monocytach, neutrofilach) w przebiegu nadciśnienia tętniczego w grupie dzieci i młodzieży z NTP.** Ogólnoustrojowe parametry odpowiedzi zapalnej oceniane w surowicy dzieci i młodzieży z NTP, w tym białko C-reaktywne, cytokiny i chemokiny prozapalne takie jak IL-6, MIF1 β , sCD14, MMP9, TIMP2 są związane głównie z nieprawidłowościami metabolicznymi i nasileniem stresu oksydacyjnego, a nawet mogą wynikać z uszkodzenia narządu docelowego, a raczej słabo związane są z bezpośrednim indukowaniem podwyższenia ciśnienia krwi. **Można zatem zakładać, że lokalny stan zapalny o niskim nasileniu nie jest przyczyną a raczej skutkiem występującego samoistnego ciśnienia tętniczego, którego przyczyny należy upatrywać w innych procesach.** Ponieważ wcześniejsze badania w grupie dzieci i młodzieży z NTP wykazały, że leukocyty krwi obwodowej wykazują wzmożoną aktywację regulacji genów układu RAAS racjonalne było założenie, że nadciśnienie tętnicze może być związane ściśle z pewnymi określonymi zmianami funkcjonalnymi populacji leukocytów [26]. Te obserwacje, jak również inne wyniki przeprowadzone na modelach zwierzęcych, mogą wskazywać na to, że określone profile aktywacji leukocytów są znacznie bardziej związane z podwyższeniem ciśnienia krwi niż obecność składników odpowiedzi ostrej fazy w surowicy. Powyższe badania wykazały, że nadekspresja genów dla receptorów dla adiponektyny (AdipoR1 i AdipoR2) w leukocytach dzieci z NTP była związana zarówno z podwyższeniem ciśnienia krwi, jak i zwiększeniem uszkodzeń narządowych TOD. To wyraźnie sugerowało zaangażowanie wrodzonego układu odpornościowego w rozwój i utrzymanie NTP u dzieci i młodzieży. Z uwagi na to, że leukocyty w sposób ciągły wchodzi w interakcje z praktycznie każdą tkanką i narządem organizmu, ich profile ekspresji genów i receptorów powierzchniowych mogą służyć jako wczesne markery wielu nieprawidłowości. Dlatego **postawiłam hipotezę, że profil ekspresji receptorów powierzchniowych AdipoR1 i AdipoR2, oceniany metodą cytometrii przepływową, na poziomie pojedynczych komórek, w poszczególnych populacjach PBL**

(neutrofilach, monocytach oraz limfocytach) może być ściśle związany ze stopniem nadciśnienia tętniczego i z parametrami uszkodzeń narządowych TOD.

Do badań włączono 57 dzieci/młodzieży (w tym 43 chłopców) w średnim wieku $15,0 \pm 2,6$ lat, u których wykonano wszystkie badania laboratoryjne pozwalające na zdiagnozowanie NTP. Bardzo ważnym punktem rekrutacji były również kryteria wykluczenia, do których zaliczono obecność jakiegokolwiek istotnej choroby przewlekłej (z wyjątkiem NTP), w tym cukrzycy i przewlekłej choroby nerek, jakakolwiek ostrej choroby indukującej stan zapalny, w tym nawet infekcje występujące w okresie ostatnich 6 tygodni poprzedzających włączenie do badania, oraz dane niepełne, uniemożliwiające wiarygodną diagnostykę NTP. Nadciśnienie tętnicze rozpoznano na podstawie obowiązujących wytycznych przedstawionych w raporcie „4th Task Force Report” i potwierdzone zostało każdorazowo całodobowym ambulatoryjnym monitorowaniem ciśnienia krwi (24-hour ambulatory blood pressure, ABPM). Samoistne nadciśnienie tętnicze rozpoznawano wyłącznie po wykluczeniu nadciśnienia wtórnego. Stan ciśnienia krwi określono zgodnie z klasyfikacją ABPM [35]. U wszystkich dzieci z NTP i grupy kontrolnej wykonano pełen protokół oceny parametrów uszkodzeń narządowych TOD oraz badań biochemicznych oceniających gospodarkę lipidową, stężenie kwasu moczowego oraz lokalny stan zapalny. Wykonano oznaczenia poziomu nie tylko hsCRP, ale również stężenia krążących mediatorów zapalnych takich jak adiponektyna, leptyna, MMP-9, TIMP-1, sCD14 oraz cytokin IL-12p70, IL-1 β i TNF α . Grupę kontrolną stanowiło 19 zdrowych dzieci (w tym 10 chłopców) w średnim wieku $13,9 \pm 3,5$ roku, u których postępowanie diagnostyczne i laboratoryjne przebiegało w taki sam sposób jak w grupie dzieci/młodzieży z NTP. Należy zaznaczyć, że grupy badaną i kontrolną dobrano pod względem parametrów antropometrycznych, które istotnie mogą wpływać na poziom ciśnienia tętniczego krwi. Ocena uszkodzeń narządów docelowych obejmowała parametry, które bezpośrednio związane są z długotrwałym działaniem nadciśnienia tętniczego, takie jak wskaźnik masy lewej komory serca (LVMi), grubości błony wewnętrznej i środkowej tętnicy szyjnej wspólnej (cIMT) oraz pola przekroju poprzecznego ściany tętnicy szyjnej (WCSA).

Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych dla adiponektyny **wykazała najwyższy poziom markerów w populacji neutrofilów monocytów**, a była **prawie nieoznaczalna w populacji limfocytów krwi obwodowej**. Co zaskakujące, grupa pacjentów z NTP okazała się heterogenna pod kątem poziomu ekspresji obu badanych receptorów (AdipoR1 i AdipoR2) i to zarówno w odniesieniu do oceny odsetka komórek pozytywnych, jak i średniej ilości receptorów na powierzchni komórek obu analizowanych populacji (neutrofilów i monocytów). W oparciu o powyższe spostrzeżenie, w celu prowadzenia dalszych analiz szczegółowych,

wyodrębniono dwie podgrupy: **AdipoR(+)**, gdzie wyraźnie występowała ekspresja badanych receptorów na powierzchni komórek oraz **AdipoR(-)**, gdzie powyższej ekspresji nie stwierdzono. Co ważne ekspresja obu typów receptorów, w obu badanych populacjach komórkowych PBL była ze sobą skorelowana w sposób pozytywny. Pacjenci z grup AdipoR(+) i AdipoR(-) nie różnili się pod względem BMI i WC. Nie było także różnicy statystycznie istotnej w profilach ekspresji leukocytów AdipoR1 i AdipoR2 między pacjentami płci żeńskiej i męskiej.

Wyniki uzyskanych przeze mnie badań wykazały, że pomimo, iż odsetek komórek AdipoR(+) obu typów analizowanych receptorów oceniony w populacji neutrofilów korelował pozytywnie z odsetkiem AdipoR(+) populacji monocytów, to jedynie odsetek komórek pozytywnych z ekspresją receptorów AdipoR1 i AdipoR2 neutrofilów był znacząco wyższy w grupie pacjentów z NTP, w porównaniu do grupy kontrolnej i populacji monocytów PBL. Leukocyty od pacjentów AdipoR(+) wykazały znacznie wyższe całkowite poziomy mRNA dla receptora AdipoR1 w porównaniu do grupy pacjentów AdipoR(-) i osób z grupy kontrolnej, lecz ekspresja mRNA dla receptora AdipoR1 korelowała w sposób pozytywny wyłącznie z odsetkiem neutrofilów, a nie monocytów. Zaobserwowano również, że pacjenci AdipoR(+) wykazują znacząco niższe stężenia adiponektyny w surowicy w porównaniu z pacjentami AdipoR(-) i osobami grupy kontrolnej. Jednak stężenie adiponektyny koreluje i to w sposób odwrotnie proporcjonalny, jedynie z odsetkiem komórek AdipoR1(+) populacji neutrofilów, a nie koreluje z odsetkiem komórek pozytywnych populacji monocytów oraz z wartościami ekspresji AdipoR1 na poziomie mRNA. Podobna zależność występuje w przypadku oceny rozpuszczalnej postaci receptora sCD14. Pacjenci AdipoR(+) charakteryzują się nieznacznie niższym stężeniem sCD14 w odniesieniu do pacjentów AdipoR(-) i osób z grupy kontrolnej. Poziomy sCD14 są odwrotnie proporcjonalne do ekspresji obu typów analizowanych receptorów AdipoR, i to zarówno w neutrofilach i monocytach, a dodatkowo wykazują tendencję statystyczną do pozytywnej korelacji ze stężeniem adiponektyny w surowicy PBL.

Warto podkreślić, że pozostałe analizowane parametry stanu zapalnego analizowane w surowicach pacjentów, takie jak: stężenie leptyny, sCRP, MMP-9, TIMP1, IL-12p70 i IL-1 β nie korelowały z profilem ekspresji AdipoR leukocytów PB, ani na poziomie białka, ani na poziomie mRNA. Niezmiernie ważne spostrzeżenia przyniosły analizy korelacji. **Pacjenci AdipoR(+)** wykazywali istotnie wyższe średnie 24-godzinne skurczowe ciśnienie krwi (24h SBP) i wyższe wartości cIMT niż pacjenci AdipoR(-). Średnie wartości intensywności fluorescencji AdipoR1 GMFI w populacji neutrofilów dodatnio korelowały z wartościami 24h SBP, a odsetek neutrofilów AdipoR2(+) z 24-godzinnym rozkurczowym ciśnieniem krwi (24h

DBP). **Ciężkie nadciśnienie ambulatoryjne występowało również częściej u pacjentów z wysoką ekspresją receptorów AdipoR(+) w porównaniu z pacjentami AdipoR(-).** Ponadto stopień zaawansowania nadciśnienia tętniczego (według klasyfikacji ABPM) wyraźnie, pozytywnie korelował z AdipoR1 GMFI na powierzchni neutrofilów. **Nasilenie objawów klinicznych i zaawansowanie choroby, oceniane na podstawie stadium nadciśnienia, było związane jedynie z populacją neutrofilów, a nie z populacją monocytów PB.** Ekspresja receptorów **AdipoR1 i AdipoR2 neutrofilów nie korelowała z parametrami antropometrycznymi**, takimi jak wiek, wzrost, masa ciała czy BMI. W kontraście do tej obserwacji, ilość receptorów AdipoR na powierzchni komórek monocytów (AdipoR1 i AdipoR2), jak również ekspresja AdipoR1 leukocytów na poziomie mRNA, były odwrotnie proporcjonalne do parametrów antropometrycznych.

Podsumowując: analiza ekspresji AdipoR1 i AdipoR2 metodą cytometrii przepływową pozwoliła nie tylko na precyzyjną ocenę badanych receptorów w poszczególnych populacjach PBL (neutrofilach, monocytach, limfocytach), ale również ukazała heterogenność grupy pacjentów dzieci/młodzieży z NTP. Poziomy ekspresji białka AdipoR w neutrofilach i monocytach były ściśle powiązane ze sobą i całkowitym poziomem ekspresji mRNA receptora AdipoR1 w leukocytach. Tylko pacjenci AdipoR(+) wykazywali zwiększone wartości cIMT i ciężkie nadciśnienie ambulatoryjne, a także niskie stężenia adiponektyny w surowicy. Co ważne, **jedynie poziomy ekspresji receptorów AdipoR1 neutrofilów (ale nie monocytów) negatywnie korelowały ze stężeniem adiponektyny w surowicy, a dodatkowo z ciężkością nadciśnienia, które ściśle związane jest ze stopniem zaawansowania choroby, a co za tym idzie poziomem uszkodzeń narządowych TOD.** Zmiany te były niezależne od innych badanych czynników ogólnoustrojowych, związanych z blokiem metabolicznym i ogólnoustrojowym stanem zapalnym o niskiej złośliwości, w tym parametrów biochemicznych, antropometrycznych i immunologicznych.

W przeciwieństwie do neutrofilów, poziomy ekspresji AdipoR w monocytach, jak również całkowita ekspresja aktywności genów AdipoR1, okazały się niezależne od stężenia adiponektyny w surowicy i wykazywały ujemną zależność z parametrami antropometrycznymi takimi jak masa ciała, BMI i WC. **Dane te sugerują, że zwiększenie ekspresji receptorów AdipoR neutrofilów, w warunkach niskiego poziomu adiponektyny w surowicy, jest ściśle związane ze zmianami naczyniowymi i ciężkością zaawansowania choroby.** Od dawna postuluje się udział neutrofilów w patogenezie NTP i zmian naczyniowych. U pacjentów dorosłych z nadciśnieniem tętniczym obserwuje się zwiększoną liczbę obwodowych neutrofilów, zwiększoną ich aktywację, w tym wzrost ekspresji receptorów CD11b, i szybkie

uwalnianie zawartości z ziarnistości pierwotnych, ale w żaden sposób nie wyjaśniono bezpośredniego wpływu tych komórek na patomechanizm indukcji, przebiegu i ciężkości zaawansowania choroby. **Warto podkreślić, że jednym z ważniejszych rezultatów powyższej pracy jest wykazana zależność ekspresji AdipoR1 neutrofilów w odniesieniu do stężenia adiponektyny w surowicy.** W warunkach zdrowia stężenie adiponektyny jest utrzymywane w niskim zakresie normy, ale zauważono, że poziom ekspresji jej receptorów wzrasta gwałtownie u osób otyłych. Prawdopodobnie dzieje się tak z powodu zachodzących zmian poziomu insuliny i wrażliwości na insulinę związanych z zaburzeniami gospodarki lipidowej u osób z nadwagą i otyłością. Adiponektyna zwiększa wrażliwość na insulinę, a ta z kolei obniża ekspresję receptorów AdipoR (zwłaszcza AdipoR1). W stanach niedoboru insuliny (podobnie jak w cukrzycy typu 1) ekspresja AdipoR jest wysoka, ale podwyższone jest również stężenie adiponektyny w surowicy, co wiąże się z wyższą śmiertelnością ogólną u pacjentów z cukrzycą typu 1. Z drugiej strony, zmniejszone lub niskie poziomy adiponektyny w surowicy były od dawna łączone z komponentami zespołu metabolicznego, takimi jak otyłość trzewna i IR, a dzieci z NTP z niskimi stężeniami adiponektyny w surowicy miały zwiększone wartości cIMT. Trudno jednak na tym etapie jednoznacznie stwierdzić czy zwiększone cIMT wynika z niższych stężeń adiponektyny, podwyższonego ciśnienia tętniczego czy ekspresji receptorów AdipoR wrażliwych „inaczej” neutrofilów [36-39].

Z drugiej strony, uzyskane wcześniejsze wyniki własne, jak również najnowsze doniesienia sugerują, że NTP może być ściśle związane z pewnymi defektami obwodowych limfocytów, które swoje odbicie znajdują w zmienionym chorobowo fenotypie i funkcji komórek limfocytów T.

Tym problemem zajęłam się w publikacji **H-3** mojego osiągnięcia naukowego. Zmiany komórkowe mogą dotyczyć obecności podwyższonych odsetków autoreaktywnych limfocytów T, rozpoznających nowo powstałe w przebiegu choroby antygeny tzw. neo-antygeny. Przyczyna utraty tolerancji immunologicznej na neo-antygeny w przebiegu NTP wciąż nie jest jednak jasna. Z punktu widzenia powstawania i dojrzewania prawidłowych limfocytów T oraz zaangażowania tych komórek w antygenowo swoistą odpowiedź immunologiczną można przypuszczać, że zaburzenia autotolerancji w przebiegu NTP ściśle zależą od zmienionym procesem chorobowym immunokompetentnej puli dziewiczych (naiwnych) komórek T, zwłaszcza populacji limfocytów pomocniczych CD4+. Komórki te zwykle kształtuje się już we wczesnym okresie życia i są to głównie komórki pochodzenia grasiczego tzw. komórki RTEs recent thymic emigrants). Proces limfopoezy przebiegający w grasicy zapewnia stałą pulę limfocytów T. Komórki opuszczające grasicę są komórkami dziewiczymi, następnie

zasiedlającymi narządy obwodowe, które po antygenowym bodźcu stają się pulą komórek efektorowych i/lub pulą komórek pamięci immunologicznej. Różnorodność odpowiedzi immunologicznej gwarantują receptory specyficzne dla limfocytów T tzw. receptory TCR, których zróżnicowanie oparte jest na doborze odpowiedniej liczby segmentów wykorzystanych podczas procesu rearanżacji. Przypuszcza się, że równowaga puli komórek T dziewiczych może być zachowana poprzez mechanizmy i procesy odbywające się również poza grasnicą. Zakłada się więc istnienie dwóch puli komórek naiwnych: jednej bogatej w komórki świeżo opuszczające grasnicę RTEs i drugiej, o wysokim indeksie proliferacji, powstającej w narządach obwodowych. Interesującym wydaje się sygnał, jaki powoduje zatrzymanie komórek w fazie komórek naiwnych RTEs oraz znalezienie markerów odróżniających pulę komórek wysoce proliferujących w narządach obwodowych. Według Kohlera i wsp. znacznikiem wyróżniającym obie populacje komórek naiwnych jest cząsteczka CD31 (PECAM-1) [40-44]. Marker CD31 jest swoisty dla komórek grasicy natomiast brak tego markera (CD31-) charakteryzuje komórki naiwne – obwodowe tzw. komórki centralne. Należy podkreślić, że tylko w komórkach CD31+ wykazano obecność poliklonalnego repertuaru TCR, w odróżnieniu od puli obwodowych dziewiczych limfocytów T CD31-. Receptor CD31 należy do nadrodziny immunoglobulin i cząsteczek adhezyjnych, które przede wszystkim zwiększają próg aktywacji limfocytów T poprzez receptory TCR, a więc jego utrata będzie powodować nadreaktywność wspomnianych komórek i nasilać ich działanie prozapalne [45-47]. Dodatkowo wykazano, że odpowiedź immunologiczna przeciwko nowo powstałym antygenom zależy przede wszystkim od komórek CD4+ rozpoznających szeroki repertuar nowych cząsteczek antygenowych w restrikcji TCR. Należy zaznaczyć, że fizjologicznie ilość komórek T dziewiczych CD4+ o fenotypie CD31+ maleje wraz z wiekiem. Podobnie dzieje się w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych, gdzie dochodzi do zaburzeń pracy grasicy wraz ze zmniejszoną ilością komórek RTEs i zwiększoną populacją dziewiczych limfocytów T powstających w wyniku obwodowej odnowy. Toteż utrata czy zmniejszenie puli komórek o fenotypie CD31+ powoduje znamienny uszczerbek działający niekorzystnie na jakość odpowiedzi immunologicznej. W wielu takich przypadkach stwierdza się generowanie komórek autoreaktywnych, które charakteryzuje utrata zróżnicowania TCR co prowadzi do braku potencjalnej odpowiedzi na nowe antygeny oraz podwyższony potencjał odpowiedzi prozapalnej.

Z drugiej strony należy podkreślić, że droga odpowiedzi immunologicznej zainicjowana przez komórki dziewicze jest tylko elementem odpowiedzi pierwotnej (pierwszy kontakt z antygenem). Pod wpływem antygeny limfocyt T dziewiczy staje się komórką efektorową o właściwościach cytotoksycznych lub komórką pamięci immunologicznej o właściwościach

charakteryzujących się długowiecznością i stałym poziomem pobudzenia. Różnica między komórkami dziewiczymi a limfocytami pamięci jest związana z różną ekspresją cząsteczek powierzchniowych. Na limfocytach T pamięci zaobserwowano przede wszystkim ekspresję antygenów CD45RO a brak antygenów CD45RA charakterystycznych dla populacji komórek naiwnych. Limfocyty T pamięci w porównaniu z limfocytami dziewiczymi łatwiej ulegają aktywacji przez prezentowane im antygeny, charakteryzują się wysokim indeksem proliferacyjnym oraz zwiększonym wydzielaniem cytokin. Wśród limfocytów T pamięci wyróżnia się komórki T pamięci centralne i limfocyty T pamięci efektorowe. Limfocyty T pamięci centralne mają na swej powierzchni receptor CCR7, podobnie jak limfocyty T dziewicze, które krążąc w organizmie przechodzą do obwodowych węzłów limfatycznych. Natomiast komórki efektorowe nie przechodzą przez narządy limfatyczne, lecz napływają do miejsc objętych zapaleniem, gdzie bezpośrednio spełniają swe funkcje efektorowe wydzielając cytokiny lub działają cytotoksycznie. Komórki efektorowe nie mają zatem receptora CCR7. **Dlatego celem dalszych badań była ocena profilu nabytej odpowiedzi immunologicznej (zwłaszcza dystrybucji populacji i subpopulacji limfocytów T pomocniczych CD4+ oraz cytotoksycznych/supresorowych CD8+) u dzieci chorych na NTP oraz sprawdzenie, czy parametry charakteryzujące TOD w grupie pacjentów z NTP związane są z nieprawidłowościami w odnowie grasiczozależnych limfocytów T, bądź jedynie skorelowane są z odsetkowym udziałem i aktywnością limfocytów T odpowiedzi wtórnej (limfocytów efektorowych i pamięci immunologicznej).**

W oparciu o analizę ekspresji odpowiednich izoform antygenów CD45 metodą wielokolorowej cytometrii przepływową, oceniono całkowity odsetek komórek dziewiczych (cTn CD4+CD45RA+ oraz cTn CD8+CD45RA+, limfocyty odpowiedzi pierwotnej) oraz komórek pamięci immunologicznej (cTm CD4+CD45RO+ oraz cTm CD8+CD45RO+, limfocyty odpowiedzi wtórnej), a w połączeniu z innymi receptorami powierzchniowymi, takimi jak CD31, CCR7 oraz CD28, scharakteryzowano i oceniono odsetki pozostałych subpopulacji komórkowych. Wykorzystując marker CD31 oceniono odsetki komórek obwodowych (CD31-) oraz pochodzenia grasiczego: całkowity odsetek komórek T CD4+CD31+ oraz CD8+CD31+, jak również dystrybucję komórek dziewiczych RTEs (CD4+CD45RA+CD31+) i pulę komórek pamięci immunologicznej CD45RO+CD31+ oraz odsetek komórek obwodowych pamięci immunologicznych CD45RO+CD31- w obrębie obu badanych populacji limfocytów Th i Tc/s. Wykorzystując receptor CCR7, antygeny CD45RA i CD45RO jako markery powierzchniowe, pulę komórek T CD4+ oraz CD8+ wydzielono populacje: naiwnych komórek T (T_N: CD45RA+/CD45RO-/CCR7+), komórek centralnych

pamięci immunologicznej (T_{CM} : CD45RA-/CD45RO+/CCR7+), komórek efektorowych pamięci immunologicznej (T_{EM} : CD45RA-/CD45RO+/CCR7-) oraz końcowo zróżnicowanych efektorowych komórek pamięci (T_{EMRA} : CD45RA+/CD45RO-/CCR7-). Receptor CD28 jest cząsteczką kostymulującą, wymaganą do promowania aktywacji komórek T, dlatego też wysoką jego ekspresję obserwuje się zwłaszcza na naiwnych komórkach T. Utrata CD28 w limfocytach T CD4+ i CD8+ podczas odpowiedzi immunologicznej wiąże się z ich różnicowaniem i nabywaniem cech komórek silnie prozapalnych. W oparciu o wykorzystanie ekspresji receptora CD28 również oceniłam profil komórek prozapalnych w obu populacjach limfocytów T CD4+ oraz CD8+, jak również w obrębie ich subpopulacji, komórek odpowiedzi pierwotnej i wtórnej.

Do badania włączono 34 dzieci/młodzież (w tym 29 chłopców) w średnim wieku $14,8 \pm 1,8$ lat, u których wykonano wszystkie badania laboratoryjne pozwalające na zdiagnozowanie NTP oraz 35 dzieci/młodzież (w tym 24 chłopców) grupy kontrolnej, z prawidłowym ciśnieniem krwi, dobranych zarówno pod względem płci, jak i wieku (średnia wieku $14,7 \pm 0,9$ lat). Rekrutacja pacjentów i grupy kontrolnej przebiegała zgodnie z kryteriami przyjętymi i opisanymi powyżej (opis przy badaniach dotyczących oceny ekspresji receptorów dla adiponektyny). U wszystkich dzieci z NTP i grupy kontrolnej przeprowadzono badania parametrów uszkodzeń narządowych TOD takich jak LVMi, cIMT oraz WCSA. Wykonano również pełny protokół oceny parametrów antropometrycznych. Ponieważ dzieci stanowiące grupę kontrolną charakteryzowały się znamienne niższymi wartościami BMI oraz WC uwzględniono to podczas prowadzenia analizy statystycznej uzyskanych wyników, w celu wyeliminowania ewentualnego wpływu nadwagi/otyłości występującej w grupie dzieci z NTP i wiarygodności wyników końcowych.

W efekcie badań wykazałam, że pacjenci z NTP charakteryzują się znacząco niższym odsetkiem całkowitych limfocytów pochodzenia grasiczego T CD4+CD31+ oraz subpopulacji komórek RTEs, przy jednoczesnym zwiększeniu puli populacji całkowitych limfocytów T CD4+ (CD4+CD31-) oraz subpopulacji komórek dziewiczych indukowanych na obwodzie (CD4+CD45RA+CD31-). Zaobserwowałam również, że w przebiegu NTP zwiększa się pula limfocytów T_N ściąganych do obwodowych węzłów chłonnych, a znacząco zmniejsza się pula limfocytów T_{EMRA} . Wszystkie powyższe zmiany dotyczą jedynie populacji limfocytów T pomocniczych CD4+. Badania zależności z parametrami uszkodzeń narządowych TOD wykazały wyraźną dodatnią korelację odsetka komórek indukowanych obwodowo (całkowite CD4+/CD31- oraz dziewicze CD4+/CD45RA+/CD31-), jak również ujemną korelację komórek RTEs CD4+ z LVMi

oraz wartościami skurczowego ciśnienia krwi cSBP i wartościami prędkości fali tętna PWV. Z wartościami cSBP oraz PWV negatywnie korelował również odsetek limfocytów TEMRA CD4+. W kolejnych etapach analizy wszystkie włączone do badania dzieci podzielono na dwie grupy: osoby wykazujące przerost lewej komory (left ventricular hypertrophy LVH) oraz dzieci bez LVH. Wyniki wykazały, że dzieci z LVH charakteryzują się wyraźnie niższym stosunkiem odsetka komórek dziewiczych do komórek pamięci immunologicznej (CD45RA+:CD45RO+) w obrębie populacji limfocytów CD4+ oraz znacząco wyższymi odsetkami populacji całkowitych limfocytów T CD4+ oraz CD8+, nie wykazujących ekspresji receptora CD31 (indukowanych obwodowo). Dodatkowo dzieci z LVH charakteryzowały się podwyższonymi odsetkami komórek dziewiczych oraz pamięci immunologicznej CD8+/CD31-. U osób z LVH zaobserwowano również zwiększoną ilość limfocytów TEMRA oraz komórek o potencjale silnie prozapalnym w obrębie analizowanych limfocytów T CD8+, szczególnie subpopulacji komórek dziewiczych CD45RA+/CD28-. Ponieważ związek między utratą receptora CD31 u pacjentów z NTP a TOD mógłby być związany również ze zmianą profilu produkowanych cytokin, co wynikać może z obserwowanego w przebiegu nadciśnienia tętniczego stanu zapalnego, przeanalizowałam ekspresję cytokin takich jak IFN γ , TNF α oraz IL-17. Wewnątrzkomórkową ekspresję cytokin przeprowadziłam metodą cytometrii przepływową w populacji limfocytów T dziewiczych CD4+/CD45RA+ oraz populacji pamięci immunologicznej CD4+/CD45RO+, zarówno w subpopulacjach komórek CD31+, jak i CD31-. Nie wykazano żadnych różnic w poziomach powyższych cytokin pomiędzy dziećmi z NTP a dziećmi grupy kontrolnej, co tylko potwierdziło, że stan zapalny nie wpływa na uzyskane wyniki dystrybucji komórek CD31+/CD31- u pacjentów z NTP. Analiza modelem regresji kwantylowej, skorygowanym względem BMI z-score, wieku i płci wykazała, że nadciśnienie było jedynym i niezależnym od powyższych parametrów predyktorem dystrybucji badanych populacji i subpopulacji limfocytów T.

Dlatego w publikacji **H-4**, która jest kontynuacją i niezmiernie ważnym uzupełnieniem wyników uzyskanych w publikacji trzeciej powyższego cyklu podjęłam się dystrybucji limfocytów Treg, komórek silnie grasiczozależnych, a które są kluczowe w utrzymaniu stanu immunotolerancji. Tolerancja immunologiczna według definicji to brak odpowiedzi układu immunologicznego na ściśle zdefiniowany i określony antygen [48]. W latach siedemdziesiątych udowodniono, że za indukcję tolerancji immunologicznej głównie odpowiadają limfocyty T, które w przebiegu licznych badań zostały zidentyfikowane i nazwane populacją Treg. W przebiegu wieloletnich badań określono, że wśród populacji limfocytów pomocniczych CD4+ istnieją komórki odpowiedzialne za hamowanie wielu procesów

immunologicznych, w tym również procesu autoimmunizacji, a jedną z bardziej charakterystycznych cech fenotypowych jest wysoka ekspresja powierzchniowego receptora dla interleukiny 2 (IL2R α) receptor CD25. Dokładniejsza charakterystyka Treg stała się możliwa dopiero po odkryciu czynnika transkrypcyjnego FOXP3 (forkhead box p3), którym jest kluczowy dla rozwoju limfocytów Treg i nabywania przez nie aktywności supresorowej. Działa on jako aktywator transkrypcyjny dla genów kodujących receptor CD25 oraz CTLA-4, będąc jednocześnie represorem transkrypcji genów kodujących cytokiny charakterystyczne dla populacji limfocytów Th1 i Th2. Jednym z ważniejszych odkryć było wykazanie, że transfekcja FOXP3 do limfocytów T dziewiczych CD4+CD25⁻ powoduje ich przejście w stan anergii i nabycie cech fenotypowych oraz czynnościowych komórek Treg, ze zdolnością do hamowania innych komórek układu immunologicznego włącznie. Okazało się, jednak że FOXP3, podobnie jak CD25, ulega przejściowej ekspresji i również obecny jest w populacjach aktywowanych limfocytów niebędących komórkami Treg. Dlatego obecnie, w celu precyzyjnej identyfikacji limfocytów Treg, używa się kilku markerów jednocześnie. Bardzo pomocnym markerem stał się więc receptor dla IL-7 (IL-7R α) CD127, który służy jako marker wykluczający, gdyż charakterystycznym dla Treg jest brak jego ekspresji na powierzchni komórek. Tak więc określono, że limfocyty pełniące funkcje regulacyjne posiadają fenotyp: CD3+CD4+CD25^{high}+FOXP3+CD127⁻. Uważa się, że komórki CD4+ o średnio intensywnej ekspresji CD25 (CD4+CD25^{int}) to jedynie aktywowane limfocyty Th, niezdolne do funkcji supresorowych [49-52]. Komórki Treg stanowią nie więcej niż kilka procent limfocytów CD4+ krwi obwodowej, śledziony i węzłów chłonnych. Nieco większy odsetek komórek Treg występuje w szpiku kostnym.

Początkowo uważano, że komórki Treg wywodzące się jedynie z limfopojezy wewnątrzgrasiczej, gdzie mimo swoich właściwości autoreaktywnych, nie są eliminowane w procesach selekcji pozytywnej i negatywnej. Z grasicy wywędrowują tylko te komórki Treg naturalne, które charakteryzują się ograniczonym potencjałem proliferacyjnym, rozpoznają, ale nie prezentują własnych antygenów oraz mają duże zdolności do recyrkulacji. Obok naturalnych komórek Treg ważną rolę odgrywają tzw. indukowane Treg. Jest to niewielka pula limfocytów T CD4+, która ma zdolności przekształcenia się z dojrzałych komórek T w populację Treg w trakcie odpowiedzi immunologicznej pod wpływem zadziałania określonego profilu cytokin, a przede wszystkim w procesie kontaktu z innymi komórkami, zwłaszcza prezentującymi antygen (APC) w obwodowych narządach limfatycznych. Istotną cechą indukowanych Treg jest fakt posiadania przez nie swoistości w stosunku do antygeny, który je wyidukował, co nie jest tak oczywiste w przypadku puli komórek naturalnych Treg,

generowanych w grasicy. Bez względu na swoje pochodzenie limfocyty Treg stanowią bardzo heterogenną grupę komórek [53, 54]. Poszczególne subpopulacje Treg mogą pełnić zróżnicowane funkcje, co wynika chociażby z różnic fenotypowych i obserwowanej różnej ekspresji receptorów, wpływających na drogi migracji Treg, ułatwiających zasiedlanie określonych obszarów w organizmie czy kontakt z określonymi komórkami docelowymi, a co za tym idzie również różny potencjał supresyjny. Wobec tego **uważa się, że w zależności od dystrybucji określonych populacji i subpopulacji Treg możemy obserwować w organizmie różne typy odpowiedzi immunologicznej.**

Limfocyty Treg, podobnie jak inne limfocyty T, mogą mieć fenotyp komórek dziewiczych, wykazujących ekspresję antygenów CD45RA⁺ (nTreg) lub komórek pamięci immunologicznej CD45RO⁺ (mTreg). Ogromna większość komórek Treg (blisko 95%) wykazuje ekspresję CD45RO, co oznacza, że komórki te uległy już wcześniejszej aktywacji i są komórkami odpowiedzi wtórnej a nie pierwotnej [55]. Liczne badania potwierdziły, że tylko komórki nTreg potrafią długotrwale utrzymać ekspresję czynnika transkrypcyjnego FOXP3, a co za tym idzie, charakteryzują się wysoką aktywnością supresorową. Przeciwnie, mTreg są zdolne do dość szybkiej produkcji IL-2 oraz INF γ , co powoduje, że tracą właściwości komórek supresorowych, ale za to szybko ulegają starzeniu się i apoptozie. **Ponieważ większość limfocytów nTreg po zetknięciu z antygenem daje początek komórkom mTreg ta obserwacja pozwala przypuszczać, że nawet niewielka pula nTreg ma znaczenie dla odnowy całkowitej populacji limfocytów Treg, co jest niezmiernie ważne w kontekście patogenezy wielu chorób.** Warto podkreślić, że wśród populacji limfocytów Treg PB można również wyróżnić komórki pochodzenia grasiczego, które dodatkowo charakteryzują się obecnością antygenów CD45RA oraz CD31 (mówimy o tak zwanych limfocytach Treg wczesnych emigrantach grasicznych) RTE Treg. Komórki Treg, które zachowały lub ponownie nabyły ekspresję antygeny CD45RA, a nie wykazują ekspresji CD31 traktowane są jako komórki naiwne powstające obwodowo tzw. dojrzałe komórki dziewicze MN Treg [56]. Świadomość istnienia tych wszystkich populacji i subpopulacji komórek Treg oraz możliwość ich ilościowej oceny pozwalają rzucić znacznie więcej światła na mechanizmy leżące u podstaw kontroli odpowiedzi immunologicznej i jej zmian w przebiegu wielu procesów chorobowych, głównie tych związanych z istniejącą komponentą autoimmunizacji i stanów zapalnych, takich jak badane NTP.

Zatem jednym z celów kontynuowanych przeze mnie badań w grupie dzieci/młodzieży z NTP była ocena dystrybucji populacji całkowitych Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-), subpopulacji komórek nTreg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}/-

CD45RA+) oraz mTreg (CD4+CD25highCD127low/-CD45RA-), ale przede wszystkim rozgraniczenie subpopulacji komórek pochodzenia grasiczego (Treg CD31+) od komórek obwodowych (Treg CD31-), jak również ocena odsetka RTE Treg (CD4+CD25highCD127low/-CD45RA+CD31+) oraz MN Treg (CD4+CD25highCD127low/-CD45RA+CD31-) dla ustalenia, czy patogeneza choroby wiąże się również z defektami w obrębie populacji komórek regulatorowych. Nadrzędnym celem badań było jednak ustalenie, czy uszkodzenie narządów docelowych TOD u dzieci z NTP jest związane z określonym profilem dystrybucji Treg, odzwierciedlonym przez ich cechy fenotypowe.

Do badania włączono 33 dzieci/młodzież (w tym 28 chłopców) w średnim wieku $14,4 \pm 1,9$ lat, u których wykonano wszystkie badania laboratoryjne pozwalające na zdiagnozowanie NTP oraz 35 dzieci/młodzież (w tym 24 chłopców) grupy kontrolnej, z prawidłowym ciśnieniem krwi, dobranych zarówno pod względem płci, jak i wieku (średnia wieku $14,7 \pm 0,9$ lat). Rekrutacja pacjentów i grupy kontrolnej przebiegała zgodnie z opisem powyżej (opis przy badaniach dotyczących oceny ekspresji receptora CD31 w populacji limfocytów CD4+ oraz CD8+). U wszystkich dzieci z NTP i grupy kontrolnej przeprowadzono badania parametrów uszkodzeń narządowych TOD takich jak LVMI, cIMT, WCSA, PWV oraz PWA. Wykonano również pełen protokół oceny parametrów antropometrycznych, badań biochemicznych określających lipidogram, stężenie kwasu moczowego, poziomu glukozy oraz hsCRP w surowicy krwi. Badania fenotypu populacji i subpopulacji komórek Treg wykonano metodą wielokolorowej cytometrii przepływową. Ponieważ dzieci stanowiące grupę kontrolną charakteryzowały się znamienne niższymi wartościami BMI oraz WC uwzględniono to podczas prowadzenia analizy statystycznej uzyskanych wyników, w celu wyeliminowania ewentualnego wpływu nadwagi/otyłości występującej w grupie dzieci z NTP i wiarygodności wyników końcowych, jak to miało miejsce również podczas analizy wyników poprzedniej publikacji.

Badania dystrybucji populacji Treg wykazały, że dzieci/młodzież z NTP charakteryzowała się znacząco niższym odsetkiem całkowitej puli komórek Treg, w tym również subpopulacji komórek nTreg, przy zwiększonym odsetku populacji mTreg. Zostało to dodatkowo potwierdzone zaobserwowanymi znamienne niższymi wartościami stosunku nTreg:mTreg w grupie pacjentów z NTP. Ponadto dzieci z nadciśnieniem cechowały się znamienne niższym odsetkiem komórek pochodzenia grasiczego i dotyczyło to zarówno całkowitej populacji TregCD31+, jak również RTE Treg, przy jednoczesnym istotnym zwiększeniu odsetka komórek obwodowych TregCD31- i MN Treg. Zaburzenie związane z

obniżeniem komórek pochodzenia grasiczego potwierdziło dodatkowo znamienne niższa wartość stosunku komórek TregCD31+:TregCD31- obserwowana w grupie dzieci z NTP. Badania korelacji wyraźnie wskazały na ścisłą zależność pomiędzy dystrybucją populacji i subpopulacji Treg, a parametrami ciśnienia tętniczego i TOD. Zaobserwowano odwrotną zależność pomiędzy odsetkiem całkowitych Treg, nTreg, TregCD31+, RTE Treg oraz wartościami proporcji komórek nTreg:mTreg i TregCD31+:TregCD31- a parametrami ciśnienia tętniczego SBP i DBP, parametrem sztywności naczyń PWV oraz przerostem lewej komory LVMi. Odsetek komórek pamięci mTreg, komórek obwodowych TregCD31- oraz MN Treg dodatkowo korelował również z SBP, DBP, PWV oraz LVMi.

Dodatkowo, aby sprawdzić czy i w jakim stopniu chwilowe zmiany ciśnienia wpływają na dystrybucję ocenianych komórek Treg PB, pacjentów z NTP podzielono na dwie grupy w zależności od procentowego spadku nocnego wartości ciśnienia SBP. Wyodrębniono dwie grupy pacjentów: ze spadkiem SBP >10% (n=20) i bez spadku SBP poniżej 10% (n=13). Odsetek wszystkich badanych populacji i subpopulacji komórek Treg nie różnił w sposób statystycznie istotny między powyższymi grupami. **Wszystkie analizy statystyczne mające na celu wyeliminowanie wpływu nadwagi/otyłości i stanu zapalnego u dzieci z NTP wykazały, że nadciśnienie jest predyktorem dystrybucji populacji i subpopulacji komórek regulatorowych Treg, zwłaszcza populacji RTE Treg i MN Treg.**

Podsumowując: uzyskane wyniki wskazują, że wzrost ciśnienia krwi, wskaźniki sztywności tętnic i przerost masy lewej komory, obserwowany w przebiegu NTP u dzieci są związane ze zmniejszoną dystrybucją komórek regulatorowych Treg, zwłaszcza komórek dziewiczych nTreg, zaangażowanych w pierwotną odpowiedź immunologiczną. Zaburzenie to związane jest głównie z obniżeniem funkcji grasicy, czego odzwierciedleniem jest znacząco obniżony odsetek komórek grasiczopochodnych takich jak Treg CD31+ oraz RTE Treg, komórek o wysokim potencjale supresyjnym. Ponadto ciężkość choroby dodatkowo koreluje z nadmierną obwodową ekspansją subpopulacji komórek Treg, w tym komórek pamięci immunologicznej mTreg, jak również MN Treg. Zmiany te są niezależne od BMI, płci i wieku pacjentów, a także ogólnoustrojowego zapalenia. Uzyskane przeze mnie wyniki wyraźnie wskazują, że w przebiegu NTP u dzieci zmniejsza się odsetek komórek Treg o potencjale supresorowym, komórek, które są również niezbędne do stałej odnowy komórek regulatorowych (nTreg, RTE Treg), a wzrasta znacząco populacja Treg, która z jednej strony może cechować się stałą swoistością w stosunku do neoantygenów pochodzących z uszkodzeń naczyń (mTreg), ale charakteryzuje się również przyspieszonym starzeniem, potencjałem apoptotycznym i prozapalnym (MN

Treg). Ich związek z rozwojem ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej nadal pozostaje nieznany, ale zdaje się, że powyższy profil dystrybucji Treg skutecznie przyczynia się do jego występowania i utrzymania. Dane te również potwierdzają kolejny raz, że NTP u dzieci wiąże się ze zmniejszoną odnową komórek z powodu zmienionej/ograniczonej funkcji grasicy, która może odzwierciedlać się w przyspieszonym starzeniu komórek co warunkuje z kolei przyspieszony wiek biologiczny pacjentów. Jak opisano wcześniej może to być użyteczny predyktor rozwoju NTP u dzieci/młodzieży.

Dlatego zamykająca mój cykl naukowy publikacja **(H-5) charakteryzuje zmiany w dystrybucji komórek będących pomostem między nieswoistą a swoistą odpowiedzią immunologiczną, w której przedstawiam analizę fenotypów i odsetków krążących we krwi obwodowej komórek dendrytycznych (DCs) w przebiegu NTP u dzieci.**

Komórki dendrytyczne to komórki odporności wrodzonej, które jako jedne z nielicznych wywierają znaczący efekt na funkcjonowanie systemu odpornościowego i przyczyniają się do modulacji aktywności komórek efektorowych, zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej w odpowiedzi na antygen. Stanowią one złożoną i bardzo heterogenną populację leukocytów występujących powszechnie w tkankach limfoidalnych i nielimfoidalnych, doprowadzających naczyniach limfatycznych, krwi obwodowej, szpiku kostnym czy innych płynach ustrojowych. Ze względu na pełnioną funkcję DCs zaliczamy do populacji profesjonalnych komórek prezentujących antygeny (antigen presenting cells, APCs), które w szczególności charakteryzują się wysokim potencjałem indukowania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Są one również komórkami odpowiedzialnymi za klonalną delecję tymocytów wiążących własne antygeny w grasicy podczas procesu dojrzewania limfocytów T. Różnicowanie do form dojrzałych DCs może również nastąpić, nie tylko w trakcie prezentacji antygenowej, ale również w wyniku ekspozycji na cytokiny prozapalne czy komponenty struktur bakteryjnych, takich jak peptydoglikany czy LPS. Formy dojrzałe wykazują również odmienny fenotyp receptorów zewnątrzkomórkowych i charakteryzują się wysoką ekspresją receptora CD83, a dodatkowo po silnej aktywacji wykazują ekspresję specyficznych markerów takich jak cząsteczki MHC klasy I i II, receptor CD40, CD80 i CD86. Markery te nie tylko związane są z procesem dojrzewania DCs, ale również kontrolują migrację zaktwowanych DCs z miejsc zapalenia do stref grasiczozależnych narządów limfatycznych. Komórki te nie proliferują, po określonym czasie ulegają apoptozie i zastępowane są przez nową pulę DCs. Ludzkie DCs różnicując się z komórek progenitorowych CD34+ szpiku kostnego pod wpływem wielu czynników i wyróżnić wśród nich można dwie odmienne linie. Komórki pierwszej z linii, inaczej zwane mieloidalnymi DCs (mDCs) niezbędne są do

aktywacji limfocytów T w odpowiedzi na antygeny obce, natomiast linia limfoidalna tak zwanych plazmacytoidalnych DCs (pDCs) głównie warunkuje stan tolerancji immunologicznej w organizmie. Obie linie DCs wykształciły specyficzny dla siebie fenotyp, dzięki czemu możliwa jest ich detekcja i analiza różnymi metodami, także metodą cytometrii przepływowej.

Komórki dendrytyczne dzięki swoistym właściwościom nie tylko warunkują powstawanie precyzyjnego instruktażu dla swoistej odpowiedzi immunologicznej, ale również uczestniczą w rozwoju tolerancji na struktury własne. Aktywacja DCs skutkuje zwiększonym wydzielaniem cytokin prozapalnych i chemokin, reaktywnych form tlenu, głównie tlenku azotu oraz do wzrostu ekspresji receptorów adhezyjnych i kostymulujących na ich powierzchni (głównie mDCs). Z drugiej strony zaobserwowano, że pula DCs tolerogennych (głównie pDCs) prezentuje antygeny limfocytom T, lecz nie dostarcza im sygnałów kostymulujących, które niezbędne są do ich proliferacji i aktywacji. Bardzo często powoduje to nie tylko stan anergii, ale również apoptozę tych specyficznych klonów limfocytów T, lub generowanie subpopulacji limfocytów regulatorowych Treg. Dzięki temu procesowi DCs mogą wpływać hamująco na odpowiedź immunologiczną generowaną przez określoną pulę antygenów, zatem generują i podtrzymują często tolerancję immunologiczną. Liczne wyniki badań pokazują, że DCs mogą pełnić takie funkcje niezależnie od stanu swojej dojrzałości, charakteryzują się niskim potencjałem prozapalnym i silną produkcją supresorowej IL-10, a co ciekawe są zdolne do odpowiedzi na sygnały pochodzące od limfocytów Treg. To ukazuje jak ważnym elementem pętli sprzężenia zwrotnego procesów immunosupresyjnych są DCs i jak bardzo z jednej strony wpływają na dystrybucję populacji Treg, a z drugiej jak ściśle od niej zależą [57, 58].

W oparciu o uzyskane wcześniej wyniki własne, które wykazały znaczące zaburzenia w dystrybucji zarówno populacji limfocytów T CD4+, jak również komórek Treg CD4+ w przebiegu NTP u dzieci, postanowiłam wyjaśnić kolejny mechanizm odpowiedzi immunologicznej, który zdaje się być elementem łączącym odporność wrodzoną i nabytą, jakim są właśnie DCs. Głównym celem badań była ocena populacji i subpopulacji krążących we krwi obwodowej komórek DCs, określenie w jakim stopniu dystrybucja tych komórek zależy od trwającego ciśnienia tętniczego i czy w jakikolwiek sposób skorelowana jest z parametrami uszkodzenia narządowego indukowanych nadciśnieniem tętniczym TOD. Spośród 275 dzieci/młodzieży skierowanych do poradni z powodu podwyższonego ciśnienia gabinetowego, do badania włączono 55 (w tym 46 chłopców) w średnim wieku $14,4 \pm 1,9$ lat, u których po pełnej diagnostyce wykluczono nadciśnienie wtórne. NTP rozpoznano zgodnie z najnowszymi wytycznymi i potwierdzono 24h ABPM według kryteriów włączenia i wykluczenia opisanych powyżej, przy opisie wyników

wcześniejszych publikacji z cyklu. Z spośród tych 55 osób wyłoniono 30 (w tym 25 chłopców), które charakteryzowały się każdorazowo podwyższonymi wartościami ciśnienia krwi badanymi w gabinecie i prawidłowymi wartościami 24h ABPM. Grupę tę zdefiniowano jako nadciśnienie białego fartucha (white coat hypertension, WCH) i włączono do badań jako odrębną grupę odniesienia dla pacjentów z NTP. Ponadto grupę kontrolną stanowiło 35 zdrowych dzieci/młodzieży (w tym 23 chłopców) z prawidłowym ciśnieniem krwi, dopasowanych zarówno pod względem płci, jak i wieku (średnia wieku $14,7 \pm 0,9$ lat). U wszystkich zrekrutowanych dzieci przeprowadzono badania parametrów uszkodzeń narządowych TOD: LVMI, cIMT, WCSA, PWV oraz PWA. Wykonano również pełen protokół oceny parametrów antropometrycznych, badań biochemicznych, określających lipidogram i istniejący stan zapalny (hsCRP). Badania fenotypu DCs wykonałam metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej, dzięki której oceniono odsetek wszystkich analizowanych populacji i subpopulacji DCs, a także określono średnią gęstość wybranych receptorów powierzchniowych, przedstawionych jako wartość średniej intensywności fluorescencji (MFI). W badaniu określono odsetek populacji całkowitych DCs (tDCs) zidentyfikowanych jako komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją HLA-DR i jednoczesnym brakiem markerów charakterystycznych dla innych linii komórkowych (tzw. markery wykluczające, Lin1) do których należały receptory CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 oraz CD56. Fenotyp tDCs sprowadza się zatem do komórek Lin1(-)HLA-DR(high). Następnie oceniono odsetek krążących komórek mDCs (Lin1(-)HLA-DR(high)CD11c(high)) i pDCs (Lin1(-)HLA-DR(high)CD123(+)) oraz odsetek komórek aktywowanych z ekspresją receptorów CD83 i komórek dojrzałych wykazujących ekspresję receptora CD86 w obu powyższych subpopulacjach. Dodatkowo w każdej z tych grup oceniono MFI dla receptorów charakteryzujących daną grupę komórek czyli odpowiednio były to HLA-DR, CD11c, CD123, CD83 oraz CD86. Charakterystyka parametrów antropometrycznych i biochemicznych wykazała, że grupa dzieci z NTP i WCH charakteryzowały się znamienne wyższymi wartościami BMI i WC względem grupy kontrolnej, a nie wykazywały różnic względem siebie. W obu grupach stwierdzono również podwyższone wartości PWV i LVMI względem dzieci zdrowych, ale jedynie grupa dzieci z NTP wykazywała zwiększone wartości hsCRP oraz cIMT względem pozostałych grup uczestniczących w badaniu. Podczas prowadzenia analizy statystycznej uzyskanych wyników wzięto pod uwagę powyższe zmienne, w celu wyeliminowania ewentualnego wpływu nadwagi/otyłości i stanu zapalnego w grupie NTP oraz WCH, jak również wiarygodności wyników końcowych, jak to miało miejsce również podczas analizy wyników poprzednich publikacji.

Zarówno pacjentów z WCH, jak i NTP charakteryzowała podobna dystrybucja i fenotyp analizowanych populacji i subpopulacji DCs. W obu grupach z nadciśnieniem zaobserwowano znacząco zmniejszony odsetek tDCs, które cechowały się znamienne wyższą gęstością antygenów HLA-DR na powierzchni w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej. Ponadto mimo braku różnic w odsetkach komórek mDC, mDC dojrzałych (CD83+) i aktywowanych (CD86+) pomiędzy badanymi grupami, zaobserwowano znacząco wyższe wartości średniej ilości antygenów HLA-DR, CD11c oraz CD86+ na powierzchni komórek obu grup dzieci z nadciśnieniem. Analiza komórek plazmocytoidalnych wykazała brak różnic w całkowitym odsetku pDCs między badanymi grupami, jednak dzieci z nadciśnieniem (NTP oraz WCH) wykazywały znacząco wyższe ilości antygenów HLA-DR, CD123 oraz CD83 na powierzchni badanych komórek. Co ciekawe w obu grupach z nadciśnieniem zaobserwowano znamienne niski odsetek komórek pDCs aktywowanych CD86+, wykazujących jednocześnie znacznie większe ilości badanego receptora. Ocena zmian dystrybucji badanych populacji komórek DCs w odniesieniu do parametrów TOD wykazała, że dzieci charakteryzujące się zwiększoną sztywnością naczyń wykazują nieznacznie wyższy odsetek komórek pDC CD83+ (dojrzałych) jednocześnie z większą średnią ilością receptora na powierzchni oraz znamienne niższy odsetek komórek pDC CD86+ (aktywowanych). W populacji komórek mieloidalnych obserwuje się znamienne więcej receptora CD11c na powierzchni komórek mDCs. Dzieci wykazujące wysokie wartości cIMT charakteryzują się jedynie zwiększonym odsetkiem komórek aktywowanych populacji mDCs oraz nieznacznie podwyższonymi wartościami ilości receptora CD83+ na powierzchni komórek dojrzałych mDCs. Największe zmiany w dystrybucji populacji DCs zaobserwowano u dzieci wykazujących LVH. Dzieci te charakteryzowały się znamienne niższym odsetkiem tDCs, pDCs a jednocześnie podwyższonymi wartościami odsetka mDCs i proporcji mDCs:pDCs. Zmiany te dotyczą również subpopulacji komórek dojrzałych, gdzie obserwuje się obniżony odsetek komórek mDCs CD83+ i podwyższony odsetek komórek pDCs CD83+ z jednocześnie zwiększoną ilością receptora CD83 w obu badanych subpopulacjach komórkowych. U dzieci z LVH stwierdzono również znamienne wyższe odsetki komórek aktywowanych pDCs i zwiększoną ilość CD86+ na powierzchni komórek mielo- i plazmocyto-idalnych, jak również wzrost ilości receptorów różnicowania CD11c w populacji mDCs oraz CD123 w populacji pDCs. Badania korelacji z parametrami ciśnienia krwi wykazały ujemną korelację z odsetkiem tDCs i pDC oraz z odsetkiem pDC aktywowanych CD86+, a dodatnią z odsetkiem mDCs i dojrzałymi pDCs CD83+. Wartość ciśnienia SBP korelowała

dotąd z gęstością wszystkich badanych receptorów a mianowicie z HLA-DR wszystkich badanych populacji, receptorów aktywacji i dojrzałości mDCs i pDCs oraz receptorów różnicowania populacji mielo- i limfoplazmocyto-oidalnych CD11c oraz CD123, jak również z proporcją ilości mDCs:pDCs.

Podsumowując: wykonane przeze mnie badania wykazały, że dzieci z NTP i WCH charakteryzują się obniżoną ilością tDCs oraz aktywowanych pDCs, przy jednocześnie wzmożonej ekspresji markerów aktywacji CD86 oraz markerów dojrzałości CD83. Komórki te, podobnie jak mDCs charakteryzowały się również nadekspresją swoich receptorów różnicowania (odpowiedni CD123 oraz CD11c). Zmiany te są głównie związane z przerostem masy lewej komory, gdzie w grupie dzieci z LVH obserwuje się również wszystkie powyższe zależności: spadek ilości tDCs i pDCs przy wzroście ilości komórek mDCs (widocznej również na korzyść proporcji komórek mieloidalnych do limfoplazmocytooidalnych). Mimo zmniejszonego odsetka całkowitych pDCs w grupie pacjentów z przerostem masy lewej komory obserwuje się wzrost ilości zarówno komórek plazmocytooidalnych dojrzałych jak i aktywowanych, a spadek odsetka komórek dojrzałych mDCs. W obu subpopulacjach ilość markerów aktywacji gwałtownie rośnie w porównaniu do dzieci bez LVH. U dzieci, u których obserwuje się sztywność naczyń zmiany dotyczą głównie komórek pDCs i manifestują się wzrostem odsetka komórek dojrzałych, a spadkiem ilości komórek aktywowanych. W przeciwieństwie do dzieci z cIMT gdzie zmiany dotyczą komórek mieloidalnych i dotyczą nieznacznie podwyższonych ilości komórek aktywowanych. Należy zaznaczyć, że ilość tDCs, pDCs oraz odsetek pDCs aktywowanych ujemnie koreluje z wartościami ciśnienia krwi zwłaszcza ciśnienia rozkurczowego SBP. Zależność dodatnia widoczna jest z odsetkiem mDCs oraz dojrzałych pDCs, jak również z wartościami proporcji mDCs:pDCs. Należy zatem podkreślić, że w przebiegu NTP znacząco zmniejsza się odsetek całkowitych DCs i dodatkowo zaburzenie to dotyka w głównej mierze subpopulacji komórek odpowiedzialnych za procesy utrzymujące stan tolerancji immunologicznej (pDCs). To również ta populacja komórkowa, zwłaszcza pula komórek dojrzałych (pDCs CD83+) i aktywowanych (pDC CD86+), wpływa na indukowanie apoptozy limfocytów T CD4+ i powstawanie obwodowych komórek Treg, a co wykazano w powyższym badaniu, są one znacząco zwiększone w grupie dzieci z LVH. Ponadto w grupie dzieci z LVH obserwuje się również wzrost odsetka komórek odpowiedzialnych za odpowiedź na antygeny „obce” (mDCs), a odpowiedzialnych za wydzielanie silnie prozapalnych cytokin i chemokin, które warunkują przemieszczanie się obwodowych komórek do obwodowych węzłów chłonnych. Należy przypuszczać, że przy obniżonym

potencjale autotolerancji induktorami populacji mDCs mogą być neo-antygeny powstające w trakcie procesu nadciśnienia. Zmiany te najbardziej uwidocznione są w grupie dzieci, u których obserwuje się zwiększone wartości oceny grubości błon tętnicy szyjnej wspólnej oraz z LVH. **Niezmiernie ważną obserwacją jest fakt, że parametry nadciśnienia korelują ujemnie nie tylko z całkowitym odsetkiem tDCs, ale przede wszystkim z odsetkiem całkowitych komórek tolerogennych oraz subpopulacji komórek aktywowanych (pDCs oraz pDCs CD86+) a w sposób dodatni z odsetkiem komórek prozapalnych mDCs.**

4.3.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego oraz ich potencjalne wykorzystanie.

Tak jak to podkreślono powyżej, wraz ze wzrostem nadwagi i otyłości u dzieci, NTP jest obecnie jedną z najczęstszych chorób przewlekłych wieku młodzieńczego. W przeciwieństwie do osób dorosłych, dzieci z nadciśnieniem zwykle nie są narażone na inne choroby współistniejące, takie jak cukrzyca, przewlekła choroba nerek, miażdżyca oraz nie obserwuje się u nich wpływu palenia tytoniu, przyjmowania używek, leków, co stanowi z jednej strony duże wyzwanie rekrutacyjne, a z drugiej niczym nie zakłóconą grupę badawczą. Tym samym, NTP u dzieci i młodzieży można traktować jako wczesne stadium rozwoju chorób sercowo-naczyniowych. Chociaż klinicznie oczywiste powikłania NTP nie pojawiają się u nich od razu to nadciśnieniowe uszkodzenie narządów docelowych TOD jest widoczne już na wczesnych etapach choroby, co świadczy o wielkiej powadze schorzenia u dzieci i młodzieży. Uzyskane przeze mnie wyniki badań i przedstawionych w cyklu prac stanowiących moje główne osiągnięcie naukowe wyraźnie pokazują, że w przebiegu NTP u dzieci obserwuje się szereg nieprawidłowości i odmienności w odpowiedzi składowych układu immunologicznego w porównaniu do dzieci będących w fazie przednadciśnienia (WCH) i dzieci zdrowych.

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wyraźnie potwierdziły, że NTP u dzieci i młodzieży jest chorobą immuno-metaboliczną, tylko częściowo powiązaną z nadwagą i otyłością. Z całą pewnością można stwierdzić, że NTP towarzyszy szereg zaburzeń swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Obserwowany **stan zapalny nie jest przyczyną, a raczej skutkiem** występującego **nadciśnienia**, a jednym z elementów indukujących jest zaburzona ekspresja receptorów dla adiponektyny neutrofilów. **Obserwowana zwiększona ekspresja AdipoR komórek pierwszej linii obrony związana jest z podwyższonym ciśnieniem krwi, ze zwiększonym cIMT u pacjentów i niskim poziomem adiponektyny w surowicy oraz znacząco koreluje ze stadiem zaawansowania choroby.** W przeciwieństwie

do monocytów, **nie zależy** od parametrów antropometrycznych, **ani od parametrów związanych z otyłością takich jak BMI czy WC**, nie jest związana ze współistniejącym zespołem metabolicznym. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi, że hipoadiponektynemia jest silnym predyktorem przyszłego nadciśnienia tętniczego. Uzyskane i przedstawione przeze mnie wyniki badań **wyraźnie jednak wskazują**, że jest to związane **nie tyle ze stężeniem adiponektyny w surowicy**, co z **zaburzeniami ekspresji receptorów AdipoR neutrofilów**, komórek odporności nieswoistej, stanowiących pierwszą linię obrony.

Ponadto, powyższe badania **ukazały znaczące zaburzenie funkcji grasicy**, co **przejawia się znacząco obniżonym odsetkiem limfocytów Th CD4+CD31+ oraz RTEs**, ale **również obniżonym odsetkiem populacji komórek regulatorowych pochodzenia grasiczego (nTreg oraz RTE Treg)**. Z drugiej strony NTP związane jest ze zwiększoną pulą **potencjalnie prozapalnych, efektorowych komórek T CD4+ pamięci immunologicznej na obwodzie oraz populacji komórek pamięci immunologicznej Treg (mTreg oraz MN Treg)**. Powyższe zmiany w dystrybucji komórek limfocytów T i Treg u dzieci z NTP mogą reprezentować defekty w rozwoju komórek zależnych od grasicy, które pojawiają się już na bardzo wczesnym etapie choroby, bądź to one wręcz warunkują występowanie NTP. Utrata receptora CD31, w puli obwodowych komórek T (całkowitych limfocytów T CD4+ oraz subpopulacji komórek dziewiczych CD4+/CD45RA+) wyraźnie koreluje z ciśnieniem krwi, parametrami sztywności tętnic i markerami uszkodzeń narządowych TOD.

Co ważne **LVH jest ściśle związany z obniżeniem proporcji limfocytów T CD4+ zaangażowanych w odpowiedź pierwotną w stosunku do limfocytów odpowiedzi wtórnej (CD45RA+:CD45RO+)**, zwiększoną pulą limfocytów T CD4+ i CD8+ **pozbawionych receptora CD31 oraz podwyższonym odsetkiem końcowo zróżnicowanych efektorowych limfocytów pamięci CD8+ oraz limfocytów T CD8+ o potencjale prozapalnym (CD8+/CD28- oraz CD8+/CD45RA+/CD28-)**. Populacja komórek T wykazująca ekspresję receptora CD31 stanowi doskonały komórkowy marker aktywności grasicy. **Utrata CD31 w połączeniu z TOD u dzieci i młodzieży z nadciśnieniem sugeruje, że upośledzona funkcja grasicy może być związana z rozwojem nadciśnienia pierwotnego u ludzi, jak to już sugerowano w mysim modelu badawczym**. Spadek liczby komórek RTEs jest najprawdopodobniej równoważony homeostaticzną proliferacją i generowaniem subpopulacji komórek T obwodowych, które tracą CD31, ale nadal zachowują fenotyp komórek naiwnych. Dodatkowo wykazałam, że NTP wiąże się z pojawieniem się prozapalnych limfocytów T, które bardzo prawdopodobnie generowane są w odpowiedzi limfocytów T na neo-antygeny, prezentowane im przez makrofagi bądź komórki dendrytyczne. **Można zatem stwierdzić, że**

pierwotne nadciśnienie tętnicze u dzieci i młodzieży jest związane z charakterystycznymi zmianami fenotypowymi subpopulacji limfocytów T oraz Treg. Jest ono zależne od ograniczonego eksportu RTEs i zwiększonej puli potencjalnie prozapalnych efektorowych komórek T pamięci na obwodzie. Nadmiar tych komórek koreluje z ciężkością choroby wyrażoną jako sztywność tętnic i LVH. Dane te sugerują znaczenie reakcji immunologicznych zależnych od limfocytów T w rozwój NTP u dzieci i młodzieży. Według mojej wiedzy jest to pierwszy raport opisujący związek zaburzeń funkcjonowania grasicy z przebiegiem nadciśnienia tętniczego w grupie pacjentów pediatrycznych. Wyniki te znacząco poszerzają wcześniejszą wiedzę dotyczącą roli układu odpornościowego w patogenezie schorzenia w grupie pediatrycznej, a manifestującą się jedynie zwiększonym stężeniem w surowicy hsCRP i chemokin (RANTES, MIP1 β), które korelowały z zespołem metabolicznym, otyłością trzewną, stresem oksydacyjnym i markerami TOD, takimi jak zwiększone cIMT i LVMI. W szerszej perspektywie powyższe wyniki również dobrze pasują i tłumaczą obserwacje wcześniejszych doniesień wskazujących, że dzieci z nadciśnieniem charakteryzowały się przyspieszonym wiekiem kostnym i wczesnym skokiem wzrostowym. Wyniki te wyraźnie wskazują na zaburzenie funkcji grasicy co tłumaczyć może również obserwowany szybszy rozwój biologiczny i szybsze „starzenie komórkowe” towarzyszące dzieciom z NTP. W przebiegu NTP obserwujemy również znacząco zmniejszony odsetek całkowitych komórek dendrytycznych (zwłaszcza subpopulacji komórek odpowiedzialnych za procesy utrzymujące stan tolerancji immunologicznej: pDCs). To również ta populacja komórkowa, zwłaszcza pula komórek dojrzałych (pDCs CD83+) i aktywowanych (pDC CD86+), wpływa na indukowanie apoptozy limfocytów T CD4+ i powstawanie obwodowych komórek Treg. Ponadto w grupie dzieci z LVH obserwuje się również wzrost odsetka komórek odpowiedzialnych za odpowiedź na antygeny „obce” (mDCs), wydzielających silnie prozapalne cytokiny i chemokiny, które warunkują przemieszczanie się obwodowych komórek do obwodowych węzłów chłonnych. Taki obraz odpowiedzi komórkowej dodatkowo świadczy o wzmożonej odpowiedzi w stosunku do neo-antygenów pochodzących z uszkodzeń naczyniowych, ale również może tłumaczyć przyspieszone starzenie komórkowe, zwiększony potencjał apoptotyczny i prozapalny kluczowych komórek odpowiedzi immunologicznej.

Uzyskane przeze mnie **wyniki badań** są doskonałym punktem wyjścia nie tylko do **rozszerzenia standardów diagnostyki wykrywania i monitorowania zaawansowania stadium choroby NTP u dzieci i młodzieży**, ale również do prowadzenia dalszych badań z **zastosowaniem leczenia niefarmakologicznego i farmakologicznego**, jak również **identyfikacji nowych celów molekularnych dla leków hipotensyjnych**. Na tym etapie można

jedynie przypuszczać, że to prawdopodobnie czynniki genetyczne bądź epigenetyczne warunkują występowanie i kontrolują przebieg choroby. To one wpływają w określony sposób na aktywację i fenotyp komórek układu immunologicznego krwi obwodowej, a stąd mogą wynikać różnice w odpowiedzi na zastosowane leczenie nefarmakologiczne bądź farmakologiczne. **Zakładając, że to różnice w odpowiedzi na zastosowane leczenie mogą wynikać właśnie z różnic profilu aktywacji komórek układu immunologicznego, nie można wykluczyć również, że za pomocą różnych leków hipotensyjnych będziemy w stanie modulować profil odpowiedzi komórek układu immunologicznego w taki sposób aby był on najbardziej korzystny dla pacjenta.**

4.3.5. Bibliografia

1. Barker DJP, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ. Growth in utero, blood pressure in childhood, and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989; 298: 564–567.
2. Hansen ML, Gunn PW, Kaelber DC. Underdiagnosis of hypertension in children and adolescents. *JAMA*. 2007; 298: 874–879.
3. Kułaga Z, Litwin M, Grajda A, et al. Oscillometric blood pressure percentiles for Polish normal-weight children. *J Hypertens*. 2012; 30: 1942–54.
4. Pludowski P, Litwin M, Śladowska J, et al. Bone mass and body composition in children and adolescents with primary hypertension. *Hypertension*. 2008; 51: 77–83.
5. Zimmet P, Alberti K, Kaufman F. The metabolic syndrome in children and adolescents — an IDF consensus report. *Pediatr. Diabetes* 2007; 8: 299–306.
6. Litwin M, Śladowska J, Syczewska M, et al. Different BMI cardiovascular risk thresholds as markers of organ damage and metabolic syndrome in primary hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2008; 23: 787–96.
7. Litwin M, Trelewicz J, Wawer ZT, et al. Intima-media thickness and functional properties of arterial wall in elastic and muscular type arteries in children and adolescents with arterial hypertension: controlled study. *Pediatr Nephrol*. 2004; 19: 767–774.
8. Litwin M, Niemirska, Śladowska-Kozłowska J, et al. Regression of target organ damage in children and adolescents with primary hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2010; 25: 2489–2499.

9. Litwin M, Śladowska J, Antoniewicz J, et al. Metabolic abnormalities, insulin resistance and metabolic syndrome in children with primary hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2007; 20: 875–82.
10. Lever AF, Harrap SB. Essential hypertension: a disorder of growth with origins in childhood? *J Hypertens.* 1992; 10: 101–20.
11. Katz SH, Hediger ML, Shall JI, et al. Blood pressure, growth, maturation from childhood through adolescence: mixed longitudinal analyses from Philadelphia Blood Pressure Project. *Hypertension.* 1980; 2 Suppl 1: 55–69.
12. Pludowski P, Litwin M, Niemirska A, et al. Accelerated skeletal maturation in children with primary hypertension. *Hypertension.* 2009; 54: 1234–1239.
13. Kułaga Z, Litwin M, Tkaczyk M, et al. Polish 2010 growth references for school aged children and adolescents. *Eur J Pediatr.* 2011; 170: 599–609.
14. Kivimaki M, Lawlor DA, Smith DG, et al. Association of the age of menarche with cardiovascular risk factors, vascular structure and function in adulthood: the cardiovascular risk in young Finns study. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87: 1876–1882.
15. Feig DI, Johnson RJ. Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension.* 2003; 42: 247–52.
16. Feig DI, Soletsky B, Johnson RJ. Effect of allopurinol on blood pressure of adolescent with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. *JAMA.* 2008; 300: 924–932.
17. Soletsky B, Feig DI. Uric acid reduction rectifies prehypertension in obese adolescents. *Hypertension.* 2012; 60: 1148–1156.
18. Śladowska-Kozłowska J, Litwin M, Niemirska A, et al. Oxidative stress in hypertensive children before and after 1 year of antihypertensive treatment. *Pediatr Nephrol.* 2012; 27: 1943–1951.
19. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy man. *Hypertension.* 2001; 38: 399–403.
20. Festa A, Agostino Jr, Howard G, et al. Chronic subclinical inflammation as a part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000; 102: 42–47.
21. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Diabetes.* 2001; 50: 2384–2389.

22. Litwin M, Michalkiewicz J, Niemirska A, et al. Inflammatory activation in children with primary hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 2489–2499.
23. Cowley AW. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev.* 1992; 72: 231–300.
24. Chon H, Gaillard CAJM, van der Meijden BB, et al. Broadly altered gene expression in blood leukocytes in essential hypertension is absent during treatment. *Hypertension.* 2004; 43: 947–51.
25. Coppo M, Bandinelli M, Berni A et al. Ang-II upregulation of T lymphocyte renin-angiotensin system is amplified by low-grade inflammation in human hypertension. *Am J Hypertens.* 2011; 24: 716–723.
26. Litwin M, Michałkiewicz, Trojanek J, et al. Altered genes profile of renin-angiotensin system, immune system, and adipokines receptors in leukocytes of children with primary hypertension. *Hypertension.* 2013; 61: 431–436.
27. Harrison DG, Guzik TJ, Lob H, et al. Inflammation, immunity and hypertension. *Hypertension.* 2011; 57: 132–140.
28. Marvar PJ, Thabet SR, Guzik TJ, et al. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II –induced hypertension. *Circ Res.* 2010; 107: 263–270.
29. Marvar PJ, Vinch A, Thabet S, et al. T lymphocytes and vascular inflammation contribute to stress-dependent hypertension. *Biol Psychiatry.* 2012; 71: 774–782.
30. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, et al. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II induced hypertension and vascular injury. *Hypertension.* 2011; 57: 469–76.
31. Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, et al. Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and metaanalysis. *J Hypertens.* 2012; 30: 3–16.
32. Cheng M, Hashmi S, Mao X, Zeng QT. Relationship of adiponectin matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio with coronary plaque morphology in patients with acute coronary syndrome. *Can J Cardiol.* 2008; 24: 385–390.
33. Litwin M, Niemirska A, Sladowska J, et al. Left ventricular hypertrophy and arterial wall thickening in children with essential hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2006; 21: 811–819.

34. Litwin M, Niemirska, Sladowska-Kozłowska J, et al. Regression of target organ damage in children and adolescents with primary hypertension. *Pediatr Nephrol.* 2010; 25: 2489–2499.
35. Flynn JT, Alderman MH. Characteristics of children with primary hypertension seen at a referral center. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20: 961–966.
36. T. T. L. Pang and P. Narendran, “The distribution of adiponectin receptors on human peripheral blood mononuclear cells,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008; 1150, 143–145.
37. Tsuchida, T. Yamauchi, Y. Ito et al., Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 29, 30817–22.
38. M. Chandran, S. A. Phillips, T. Ciaraldi, R. R. Henry, Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*, 2003; 8, 2442–50.
39. K. Ohashi, N. Ouchi, Y. Matsuzawa. Adiponectin and hypertension, *Am J Hypertens*, 2011; 24: 263–9.
40. Itani HA, McMaster WG Jr, Saleh MA, et al. Activation of human T cells in hypertension: studies of humanized mice and hypertensive humans. *Hypertension* 2016; 68: 123–132.
41. Wenzel U, Turner JE, Krebs C, et al. Immune mechanisms in arterial hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 677–686.
42. Marvar PJ, Thabet SR, Guzik TJ, et al. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 2010; 107: 263–270.
43. Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10 :203–207.
44. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist’s guide to CD31 function in T-cells. *J Cell Sci* 2013; 126: 2343– 2352.
45. Chalan P, van den BA, Kroesen BJ, et al. Rheumatoid arthritis, immunosenescence and the hallmarks of aging. *Curr Aging Sci* 2015; 8:131–146.
46. Fulop T Jr, Larbi A, Dupuis G, Pawelec G. Ageing, autoimmunity and arthritis: perturbations of TCR signal transduction pathways with ageing - a biochemical paradigm for the ageing immune system. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:290–302.
47. Lopez P, Rodriguez-Carrío J, Martínez-Zapico A et al. Senescent profile of angiogenic T cells from systemic lupus erythematosus patients. *J Leukoc Biol* 2016; 99: 405–412.

48. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 199-210.
49. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
50. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int. Immunol.* 2004; 16: 1643–1656.
51. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. *J. Clin. Invest.* 2003; 112: 1437–1443.
52. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 Treg cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1701–1711.
53. Zheng SG, Wang J, Wang P, et al. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25– cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* 2007; 178: 2018–2027.
54. Santner-Nanan B, Seddiki N, Zhu E, et al. Accelerated age- -dependent transition of human regulatory T cells to effector memory phenotype. *Int. Immunol.* 2008; 20: 375–383.
55. Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, et al. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4 + regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J. Immunol.* 2010; 184: 4317–4326.
56. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 2009; 113: 769–774.
57. O’Keeffe M, Mok WH, Radford KJ. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72: 1–17.
58. Merad M, Sathe P, Helft J, et al. The dendritic cells lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and in the inflamed setting. *Ann Rev Immunol.* 2013; 31: 563–604.

4.4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

4.4.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych.

Działalność naukową rozpoczęłam w roku 2000 w ramach Studiów Doktoranckich na Wydziale Lekarskim, ówczesnej Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, pod promotorstwem prof. Jacka Michałkiewicza, który był jednocześnie kierownikiem Katedry i Zakładu Immunologii. Nurtem przewodnim moich badań była ocena odpowiedzi immunologicznej komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) indukowanych różnymi szczepami bakterii kwasu mlekowego (LAB) o potencjale probiotycznym. Badania prowadzone były w ramach współpracy z Zakładem Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie oraz firmą KROTEX (producenta suplementu diety Trilac). Do moich zadań badawczych należało opracowanie koncepcji badań immunologicznych, czynnościowych z zastosowaniem metody *in vitro* z użyciem trzech szczepów bakterii LAB (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*), wyselekcjonowanych szczepów probiotycznych, będących składowymi preparatu Trilac. W ramach badań zostały wykonane przeze mnie hodowle komórkowe PBMC stymulowanych LAB, w różnych układach badawczych, oznaczenia poziomów proliferacji PBMC, oznaczenia stężeń cytokin w supernatantach hodowlanych metodą immunoenzymatyczną ELISA (cytokin pro- i przeciw-zapalnych) oraz oznaczenia ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów i monocytów krwi obwodowej metodą cytometrii przepływowej. Głównym osiągnięciem prowadzonej przeze mnie wyżej wymienionej tematyki badawczej było wykazanie probiotycznego/immunomodulującego efektu połączenia wszystkich trzech szczepów bakteryjnych LAB i potwierdzenie skuteczności probiotycznych preparatu Trilac. Uzyskane przeze mnie wyniki stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej, którą obroniłam w 2004 roku, zostały zaprezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych (K1-K9) i opublikowane w czasopiśmie krajowym i zagranicznym (P1, P2, M1).

4.4.2. **Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, inne niż stanowiące podstawę habilitacji**

W listopadzie 2004 roku zostałam zatrudniona w Katedrze Immunologii, Wydziału Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu M. Kopernika w Toruniu na etacie asystenta, od 2008 roku na etacie adiunkta.

4.4.2.1. **Odpowiedź immunologiczna w odpowiedzi na bakterie**

W pierwszym okresie mojej pracy zawodowej po uzyskaniu stopnia doktora, moje badania w dalszym ciągu koncentrowały się na tematyce związanej z odpowiedzią immunologiczną indukowaną różnymi szczepami bakterii w warunkach *in vitro*. Dotyczyły głównie poszukiwań szczepów o potencjalnie probiotycznym oraz badań w kontekście odpowiedzi indukowanej przez bakterie chorobotwórcze. W tym okresie mojej pracy przede wszystkim uzupełniłam i opublikowałam wyniki badań zawartych w rozprawie doktorskiej (**P4, P26, M11**) oraz zaprezentowałam je na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych (9 wystąpień plakatowych). Ponadto swoją pracę naukową rozszerzyłam o badania wpływu różnych szczepów bakterii o potencjale probiotycznym na komórki krwi obwodowej indukowane bakteriami *H. pylorii*. Powyższa tematyka i założenia badań były również podstawą rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Kubiszewskiej, u której sprawowałam rolę **promotora pomocniczego** (rozprawa obroniona w 2014 roku) pt. „Wpływ bakterii kwasu mlekowego na reakcje odpornościowe indukowane przez *H. pylori* na modelu komórek jednojądrzastych krwi obwodowej”. Otrzymane wyniki były również punktem wyjścia do badań *in vivo* z udziałem pacjentów pediatrycznych, zakażonych i niezakażonych bakterią *H. pylorii* w ramach współpracy z Kliniką Pediatrii, Alergologii i Gastroenterologii CM UMK (prof. Mieczysława Czerwionka-Szaflarska), które przez lata były prowadzone przeze mnie w ramach realizacji zadań badawczych grantu MNiSzW (PN1) oraz podstawowej działalności statutowej Katedry Immunologii. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracach o zasięgu międzynarodowym (**P14, P16, P17, P32, P42, P43, M13**) oraz krajowym (**M2, M5, M10, M14**), jak również były prezentowane na licznych konferencjach naukowych (26 wystąpień plakatowych).

4.4.2.2. **Odpowiedź immunologiczna w pierwotnych i wtórnych niedoborach immunologicznych**

Równocześnie, z racji mojego zawodu diagnosty laboratoryjnego, prowadziłam badania dotyczące pierwotnych i wtórnych niedoborów immunologicznych. Badania naukowe prowadzone były w ramach współpracy z dwoma szpitalami tj. z Kliniką Alergologii, Immunologii Klinicznej i Chorób Wewnętrznych szpitala im. J. Bizuela w Bydgoszczy (prof. Zbigniew Bartuzi) oraz Kliniką Immunologii Instytutu „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie (dr Małgorzata Pac). Wyniki uzyskanych wspólnie badań zostały opublikowane w pracach **P3** i **M12** oraz były prezentowane na konferencjach naukowych (6 wystąpień plakatowych). W 2011 roku **współtworzyłam od podstaw Pracownię Immunologii Klinicznej i Eksperymentalnej (PIKiE)**, która została zarejestrowana w Krajowej Izbie Diagnostów Laboratoryjnych (KIDL) w rejestrze jako pracownia diagnostyczna, która z drugiej strony jako strukturalna część Katedry Immunologii CM UMK Wydziału Farmaceutycznego prowadziła również działalność usługowo-badawczą (wykonywanie oznaczeń cytometrycznych, immunoenzymatycznych ELISA, proliferacji komórek). **Jako p.o. kierownika PIKiE prowadziłam badania diagnostyczne dotyczące immunofenotypowania populacji komórek krwi obwodowej oraz badania oceny proliferacji komórek limfocytów T i B stymulowanych mitogenami w warunkach *in vitro* u dzieci z podejrzeniem pierwotnych i wtórnych niedoborów immunologicznych po leczeniu hematologicznym** kierowanych z Poradni Immunologicznej dla dzieci w ramach współpracy z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii szpitala im. dr A. Jurasza w Bydgoszczy (prof. Mariusz Wysocki, dr hab. Sylwia Kołtan). W ramach powyższej współpracy realizowałam również projekt badawczy dotyczący oceny fenotypu i aktywności komórek NK w grupie dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL). Wyniki opublikowano w 2015 roku (**P31**) oraz prezentowano na konferencjach (3 wystąpienia plakatowe).

4.4.2.3. **Badania immunologiczne w procesach nowotworowych**

Kolejnym bardzo ważnym dla mnie nurtem badań była analiza cytometryczna dotycząca białek cytoszkieletu w kontekście ich zaangażowania w podstawowe procesy życiowe komórek nowotworowych. Główny obszar badań stanowiła analiza indukcji śmierci komórki, zmian w rozkładzie faz cyklu komórkowego oraz zahamowanie metastazy. W eksperymentach wykorzystywano nie tylko stosowane w terapiach cytostatyki, ale również związki pochodzenia naturalnego oraz oceniano ich skojarzone działanie. **Do moich zadań badawczych należała ocena wszystkich parametrów, które prowadzone były przy pomocy metody cytometrii przepływowej, a więc ustalenie koncepcji badań cytometrycznych, wykonania oznaczeń, wykonania analiz i opracowanie wyników cytometrycznych, łącznie**

z ich graficznym przedstawieniem. Badania te prowadziłam w ramach **długoletniej współpracy z Katedrą Histologii i Embriologii CM UMK kierowana przez prof. Alinę Grzankę.** Rezultaty badań zostały opublikowane w licznych pracach o zasięgu międzynarodowym (**P5-P11, P15, P18-P21, P24-P25, P27, P28, P35, P36, P47**) oraz były prezentowane na licznych konferencjach naukowych (30 wystąpień plakatowych). Badania dotyczące zaangażowania układu immunologicznego w odpowiedź przeciwnowotworową były przeze mnie kontynuowane przez kolejnych kilka lat i obejmowały wiele współprac z ośrodkami bydgoskimi. W latach 2015-2019 byłam uczestnikiem projektu NCN (**PN8**) w ramach współpracy z regionalnym Centrum Onkologii w Bydgoszczy (prof. Anna Brożyna). W wyniku współpracy z tym ośrodkiem oraz Katedrą Chirurgii Onkologicznej CO powstały znaczące publikacje (**P13, P22, P40, M15, M16, M19**) oraz cztery wystąpienia plakatowe.

4.4.2.4. **Odpowiedź immunologiczna w chorobach cywilizacyjnych**

Wraz z moim rozwojem naukowym oraz rozwojem warsztatu cytometrycznego moja uwaga skoncentrowała się na dwóch wiodących nurtach badań dotyczących głównie chorób cywilizacyjnych. Pierwsza tematyka badawcza dotyczy charakterystyki odpowiedzi immunologicznej pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi zarówno osób dorosłych, jak i dzieci. Badania u osób dorosłych wykonywane są we współpracy z Kliniką Kardiologii Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. J. Bizuela w Bydgoszczy (dr Joanna Banach) i dotyczą badań mechanizmów komórkowej odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z niewydolnością serca (kardiomiopatią rostrzeniową i chorobą niedokrwienną serca). **Powyższa grupa pacjentów jest doskonałym punktem odniesienia do badań prowadzonych przeze mnie w grupie pediatrycznej z NTP,** przedstawionych w opisie cyklu publikacji stanowiącego moje osiągnięcie naukowe. Dotychczas przeprowadzone badania oceny systemowej odpowiedzi pro- i przeciw-zapalnej u pacjentów z przewlekłą niewydolnością serca wykazały wysokie stężenia prokalcytoniny oraz prozapalnej IL-6 w surowicach pacjentów z niewydolnością serca w stosunku do osób zdrowych, zwłaszcza wysokie ilości obserwowane są w grupie chorych z kardiomiopatią rostrzeniową i osobami ze zmniejszoną frakcją wyrzutową serca. Zaobserwowano również znacząco niższe stężenia przeciwzapalnej IL-10 w surowicach pacjentów obu grup z niewydolnością (zwłaszcza dotyczy to pacjentów z chorobą niedokrwienną). **Wyniki te nie tylko potwierdzają, że w przebiegu choroby mamy do czynienia z przewlekłym stanem zapalnym, ale również świadczą o braku kompensacyjnego działania odpowiedzi przeciwzapalnej, co pośrednio może dotyczyć dysfunkcji związanej z komórkami Treg.** Badania oceny dystrybucji subpopulacji

komórek obwodowych limfocytów T wykazały, że w obu typach niewydolności serca obserwuje się znacznie obniżony odsetek limfocytów T pomocniczych CD4+, zwłaszcza pochodzenia grasiczego (limfocyty T CD31+ oraz RTEs) oraz zmniejszony odsetek limfocytów T_{CM}, jak również zwiększony odsetek ilości efektorowych limfocytów T_{EM}. Wyniki te potwierdziły, że również u osób dorosłych chorobie sercowo-naczyniowej towarzyszy systemowy, przewlekły stan zapalny oraz zmniejszona odnowa limfocytów dziewiczych, zwłaszcza pochodzenia grasiczego, co wykazaliśmy w grupie dzieci z NTP. Badania te są nadal kontynuowane a uzyskane wyniki zostały zaprezentowane na licznych konferencjach naukowych (9 wystąpień plakatowych) oraz opublikowane w pracach o zasięgu międzynarodowym (P33, P39) i krajowym (M8, M17). Ponadto były one również realizowane w ramach 2 prac magisterskich studentów kierunku analityka medyczna CM UMK pod moją opieką.

Drugi wiodący nurt prowadzonych przeze mnie badań, dotyczy oceny procesów aktywnej demetylacji i deaminacji DNA, a także procesów hipoksji u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego, zarówno dzieci jak i osób dorosłych. Badania te realizowane są przeze mnie od 2015 roku w ramach licznych projektów, wielośrodkowo (PN9, PN10, PN11, PN13) we współpracy z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr A. Jurasza w Bydgoszczy (prof. Jan Styczyński, dr hab. Sylwia Kołtan, dr Andrzej Kołtan), Kliniką Hematologii, Szpitala Uniwersyteckiego nr 2 im. J. Bizuela w Bydgoszczy (dr hab. Jarosław Czyż) oraz Katedrą Biochemii Klinicznej CM UMK (prof. Ryszard Oliński, dr hab. Daniel Gackowski). Badania obejmują dzieci z nowotworowymi chorobami hematologicznymi, głównie z ostrą białaczką limfoblastyczną z limfocytów B (B-ALL). Badania w grupie osób dorosłych dotyczą pacjentów z ostrymi białaczkami szpikowymi (AML), zespołami mielodysplastycznymi (MDS), przewlekłą białaczką limfocytową (CLL) oraz chorobami związanymi z rozrostem monoklonalnych komórek plazmatycznych (PCs) takimi jak: szpiczak mnogi, gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (MGUS) czy chłoniak limfoplazmocytowy (PLL).

Wspólnym mianownikiem niezmiernie heterogennej grupy badanej jest próba odpowiedzi na następujące pytania, które przyświecają tej współpracy: Czy produkty procesów epigenetycznych, takich jak aktywna demetylacja i deaminacja DNA, mierzone w DNA komórek krwi obwodowej, osoczu lub moczu mogą w przyszłości stać się biomarkerami rozwoju chorób hematologicznych? Czy pozwoli to na przewidywanie i monitorowanie przebiegu leczenia tych chorób? Czy u osób cierpiących na choroby hematologiczne, które przeszły chemioterapię można śledzić zaburzenia w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych,

zaangażowanych w procesy epigenetyczne? Czy wybrane sposoby leczenia skutkują zmianami molekularnymi w szlakach metabolicznych zaangażowanych w powyższe procesy epigenetyczne?

Ponieważ jednym z kluczowych aspektów tych badań była potrzeba oceny ekspresji białek enzymatycznych zaangażowanych w procesy aktywnej demetylacji i deaminacji DNA oraz w procesy oceniającej stan hipoksji komórek, postanowiliśmy wykorzystać moje doświadczenie i zastosować metodę cytometrii przepływową, której przewagą jest możliwość oceny badanych parametrów na poziomie pojedynczych komórek, a co za tym idzie, też i ocena w poszczególnych populacjach komórkowych. **Moim głównym zadaniem w ramach powyższych badań było więc opracowanie koncepcji i zoptymalizowanie zupełnie nowej metody pomiaru ekspresji białek enzymatycznych zaangażowanych w procesy modyfikacji DNA metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej komórek krwi obwodowej.** Do standaryzacji metody wybrano enzymy z rodziny TET (TET1, TET2, TET3), TDG, SMUG1, AID oraz enzymy kontrolujące stan hipoksji (HIF-1AN oraz HIF-1alfa) wraz z markerami, które pozwoliły na ocenę poszczególnych populacji komórkowych (neutrofilów, monocytów, limfocytów T, B, komórek NK oraz populacji blastów). Ze względu na brak dostępnych komercyjnie przeciwciał bezpośrednio skoniugowanych z fluorochromami dedykowanych do cytometrii przepływowej do analizy białek enzymatycznych (z wyjątkiem AID i HIF-1alfa) zdecydowałam się na zastosowanie barwienia pośredniego z wykorzystaniem nieznakowanych przeciwciał pierwszorzędowymi skierowanymi przeciw badanym antygenom oraz kompatybilnych przeciwciał wtórnych sprzężonych z fluorochromami. W celu optymalizacji metod wszystkie stosowane przeciwciała (pierwotne, jak i wtórne) zostały zmiareczkowane w celu uzyskania stężeń umożliwiających najwyższą czułość. Na tej podstawie wyznaczono ilości przeciwciał, które dalej używano w eksperymencie. Ze względu na wewnątrzkomórkową ekspresję ocenianych białek do utrwalenia komórek krwi obwodowej oraz do ich permeabilizacji użyto odczynnika komercyjnego. Protokół przygotowania komórek został dostosowany i zoptymalizowany do powyższych badań. **Opracowana metoda wykorzystująca pośrednią cytometrię przepływową umożliwia ocenę jakościową i ilościową ekspresji białek enzymatycznych zaangażowanych w procesy aktywnej demetylacji i deaminacji DNA, jak również w proces odpowiadającym na hipoksję, na poziomie pojedynczych komórek przy jednoczesnej możliwości określenia szczegółowego ich fenotypu. Opracowana i zoptymalizowana przeze mnie metoda stała się jednym z nowych narzędzi badawczych wykorzystywanych w naszych badaniach.** Po raz pierwszy została wykorzystana do oceny białek enzymatycznych w grupie dzieci z ALL oraz osób

dorosłych z AML i MDS (**PN9**). Poziom białek oznaczanych tą metodą koreluje z ekspresją ocenianą na poziomie mRNA i przekłada się na ilość produktów katalizowanych przez nie reakcji, obserwowany na poziomie DNA, co w pełni potwierdza wiarygodność tej metody. Uzyskane wyniki zostały opublikowane (**P46**) oraz zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych (9 wystąpień plakatowych) Obecnie metoda służy do oceny ekspresji białek enzymatycznych u pacjentów z monoklonalnym rozrostem PCs w ramach realizowanego grantu NCN (**PN13**) oraz oceny szlaku sygnalizacji niedotlenienia w ostrej białaczce limfoblastycznej u dzieci (projektu IDUB Debiut 2, którego jestem kierownikiem, załącznik 4, **pkt II/9.1.**).

Kontynuacja badań nad procesami epigenetycznymi w grupie pacjentów hematologicznych doprowadziły do obserwacji znaczącego wzrostu ilości zmodyfikowanych zasad azotowych, w tym głównie poziomu 5-hydroksymetylouracylu (5-hmUra) u pacjentów z CLL w porównaniu do osób zdrowych i osób z innymi chorobami hematologicznymi. Obecnie zalecaną metodą oceny 5-hmUra jest wysoce czuła i specyficzna, zautomatyzowana dwuwymiarowa ultrasprawa chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (2D-UPLC-MS/MS). Pomimo wielu zalet technika ta ma istotne ograniczenia: nie można jej stosować do pomiaru poziomu 5-hmUra w pojedynczej komórce, a także jest trudna w zastosowaniu w badaniach klinicznych. Jedną z technik omijających te ograniczenia jest cytometria przepływowa, którą można zastosować zarówno do oznaczeń ekspresji cząsteczek powierzchniowych, jak i wewnątrzkomórkowych, a tym samym scharakteryzować i zdefiniować różne typy komórek, nawet najbardziej heterogenne populacje komórkowe. Ponieważ nie było dostępnych protokołów badawczych, które umożliwiałyby ocenę poziomów zmodyfikowanych zasad azotowych na poziomie pojedynczych komórek, **podjęłam się opracowania i zwalidowania metody cytometrycznej.** Bazując zarówno na dostępnych danych literaturowych, jak i na własnych doświadczeniach, w ramach opracowywania i optymalizacji protokołu technicznego, wstępnie przetestowałam trzy procedury: a) protokół z zastosowaniem różnych stężeń HCl, b) protokół z zastosowaniem komercyjnie stosowanych odczynników do barwienia immunofluorescencyjnego komórek, które zawierają bromodeoksyurydynę (BD Pharmingen BrdU Flow Kits) oraz c) **nowatorski protokół własny wykorzystujący roztwór saponiny i ekspozycję komórek na wysoką temperaturę.** Najlepsze wyniki uzyskano po zastosowaniu wysokiej temperatury i protokół ten stał się punktem wyjścia do dalszej standaryzacji. Aby kontrolować denaturację termiczną podwójnej helisy w celu ekspozycji antygeny, testowano różne temperatury z zastosowaniem różnych czasów ogrzewania. Ostatecznie najlepsze wyniki zaobserwowano przy zastosowaniu

temperatury 99 °C i taką wybrano do eksperymentu. Ponieważ epitop 5-hmUra może być również obecny w RNA i puli wolnych nukleotydów, test przeprowadzono przy użyciu roztworu RNazy, który nie wykazał różnic w ekspresji 5-hmUra w porównaniu z protokołem bez zastosowania enzymu. Ze względu na brak przeciwciał anti-5-hmUra zalecanych do cytometrii przepływowej, wybrano nieskoniugowane przeciwciało pierwotne do oceny 5-hmUra, które wcześniej wykorzystano w teście histochemicznym rekomendowanym przez grupę z Wolfson Centre for Stem Cells, Tissue Engineering & Modelling (STEM), Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham z Wielkiej Brytanii (kontakt osobisty z Dr Alexey Ruzov). Następnie użyliśmy kompatybilnego drugorzędowego przeciwciała znakowanego fluorochromem, które jest rekomendowane do analizy metodą cytometrii przepływowej. Miareczkowano oba przeciwciała tak jak w przypadku standaryzacji metody dla enzymów aktywnej demetylacji i deaminacji DNA. Aby ocenić przydatność barwienia 5-hmUra w poszczególnych populacjach i subpopulacjach komórek krwi obwodowej, przeprowadzono równoległe znakowanie antygenów zewnątrzkomórkowych komórek (wspólny antygen leukocytów CD45). Etap ten był kluczowy, ponieważ umożliwił ocenę, czy optymalne warunki wewnątrzkomórkowego barwienia 5-hmUra mogą również pozwolić na prawidłową ocenę ekspresji markerów charakterystycznych dla populacji leukocytów. Zawartość 5-hmUra obliczono jako krotność zmiany intensywności fluorescencji w stosunku do kontroli negatywnej (każdorazowo wykonywano barwienie kontrolne z użyciem tylko przeciwciał wtórnych, co dodatkowo pozwoliło wyeliminować różnice w ekspresji 5-hmUra uwarunkowane reaktywnością komórek). **Wystandaryzowaną, nowatorską, metodę zaprezentowano na konferencjach międzynarodowych (3 wystąpienia plakatowe) oraz opublikowano w postaci rozdziału metodycznego w monografii (M18).** Wykorzystano ją również do oceny poziomów 5-hmUra w grupie pacjentów z CLL w ramach realizacji grantu NCN (**PN10, PN11**). W celu potwierdzenia wiarygodności metody przeprowadzono również badania z wykorzystaniem cytometru obrazowego (Amnis® ImageStream® X Mk II imaging flow) w ramach realizacji zadania badawczego projektu Preludium w Uniwersytecie w Oksfordzie oraz powtórzono je w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN dzięki uprzejmości dr hab. Pauliny Jackowiak. **Powyższe analizy cytometryczne w pełni potwierdziły wiarygodność metody. Można z całą pewnością stwierdzić, że opracowana i zwalidowana przeze mnie metoda jest nowym narzędziem badawczym służącym do oceny 5-hmUra na poziomie pojedynczych komórek, umożliwia pełną charakterystykę poszczególnych populacji komórkowych krwi obwodowej i szpiku kostnego oraz pośrednio umożliwia ocenić ilość 5-hmUra przy pomocy oceny średniej ilości fluorescencji 5-hmUra w**

badanych komórkach (MFI, GMFI). Wyniki pozyskane dzięki tej metodzie stanowią podstawę do oceny niezmiernie ważnego markera zmian epigenetycznych u pacjentów.

Pozyskane wyniki dzięki opracowanym przeze mnie metodom nie tylko pozwolą przyczynić się do zrozumienia kluczowych mechanizmów i związku między badanymi modyfikacjami DNA a przebiegiem choroby, ale przede wszystkim mogą w przyszłości umożliwić leczenie spersonalizowane pacjentów z hematologicznymi chorobami nowotworowymi. Ponadto uzyskane wyniki mogą dostarczyć uzasadnienia dla opracowania laboratoryjnego testu diagnostycznego do diagnozowania i monitorowania pacjentów. Jeśli 5-hmUra okaże się być biomarkerem swoistym dla białaczkowych limfocytów B, oznaczanie poziomu 5-hydroksymetylowouracylu za pomocą cytometrii przepływową może stać się standardowym narzędziem diagnostycznym, szczególnie we wczesnej fazie choroby, przedklinicznie przejawianą limfocytozą.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

5.1. WSPÓŁPRACA Z ZAGRANICZNYMI INSTYTUCJAMI NAUKOWYMI

5.1.1. Współpraca z Centro de Lisboa Ocidental Hospitalar, São Francisco Xavier Hospital and Santa Cruz Hospital (Portugalia)

W ramach współpracy naukowej z Centro de Lisboa Ocidental Hospitalar w Lizbonie 2011 roku odbyłam staż w ramach programu ERASMUS STT (Staff Mobility for Training). W ramach stażu uczestniczyłam w pracach diagnostyczno-badawczych Pracowni Cytometrii przepływową Katedry Klinicznej Patologii, pod opieką dr Maria Arroza, która od 1993 roku pełniła funkcję dyrektora Laboratoriów Cytometrii Przepływowej w obu szpitalach wchodzących w skład Centro de Lisboa Ocidental Hospitalar. Dr Maria Arroza była czynnym członkiem europejskiej grupy roboczej klinicznej analizy komórki (European Working Group on Clinical Cell Analysis, EWGCCA) i naukowcem odpowiedzialnym za Portugalskie Centrum Projektu Eurostandardów, które ściśle współpracowało z EWGCCA, a następnie stała się członkiem Zarządu Fundacji EWGCCA. W okresie, w którym odbywałam staż, Dr Maria Arroza była członkiem ścisłego zarządu Europejskiego Towarzystwa Klinicznej Analizy Komórki

(ESCCA). Uważam ten niedługi okres stażu za kluczowy dla mojej późniejszej działalności zawodowej. W ramach prowadzonych badań zaznajomiłam się z procedurami „dobrej praktyki cytometrycznej” dotyczących diagnostyki chorób immunologicznych, w tym pierwotnych i wtórnych niedoborów immunologicznych, chorób hematologicznych takich jak białaczki, chłoniaki i inne zespoły mieloproliferacyjne. Zapoznałam się z procedurami przedlaboratoryjnymi, prawidłowego przygotowania wielokolorowych paneli cytometrycznych, przygotowania aparatu do pracy i jego standaryzacji, wielokolorowej analizy danych cytometrycznych oraz interpretacji wyników. **Doświadczenie zdobyte w tym czasie wdrożyłam bezpośrednio do swojej pracy zawodowej, co zaowocowało stworzeniem i rozwojem Pracowni Immunologii Klinicznej i Eksperymentalnej (PIKiE), będącej częścią Katedry Immunologii CM w Bydgoszczy, UMK w Toruniu, gdzie pełniłam funkcje kierownika pracowni aż do momentu jej likwidacji w ramach restrukturyzacji uczelni tj. do roku 2020. Swoją współpracę z grupą portugalską w kooperacji z dr M. Arroz kontynuowałam nadal, a polegała ona głównie na wymianie doświadczeń.**

5.1.2. Współpraca z Instituto Gulbenkian de Ciencia (IGC) w Lizbonie (Portugalia)

Konsekwencją tej współpracy było odbycie kolejnego stażu w ramach programu ERASMUS STT (Staff Mobility for Training) w 2014 roku w placówce naukowej Instituto Gulbenkian de Ciencia (IGC), w Oeiras w Lizbonie w Zakładzie Cytometrii Przepływowej pod bezpośrednią opieką Dr Rui Gardner’a, który w tamtym okresie pełnił funkcje kierownika laboratorium. Dr Rui Gardner to nie tylko doświadczony naukowiec, fizyk, biolog, pasjonat nauki i nowych technologii, ale również absolutny autorytet w zakresie szczegółów technicznych i softwerowych związanych z cytometrią przepływową i jej naukowym wykorzystaniem. Obecnie Dr Rui Gardner kieruje Centrum Cytometrii Przepływowej w Memorial Sloan-Kettering Cancer Center w Nowym Jorku. Odbyty staż znacząco ugruntował moją wiedzę z zakresu cytometrii przepływowej, ale przede wszystkim wzbogacił moje doświadczenie zawodowe o umiejętności sortowania komórek. Program pracy obejmował opracowanie teoretycznych koncepcji projektowania eksperymentu, dostosowania do nich odpowiednich kontroli, konfigurację aparatu, analizę danych w kontekście różnych technik cytometrycznych, w tym sortowania komórek i co najważniejsze rozwiązywanie problemów, które mogą zdarzyć się na każdym etapie pracy. **W oparciu o te wszystkie aspekty zdobyłam nową wiedzę, co znacząco wzbogaciło moje przyszłe badania naukowe, jak i umiejętności**

dydaktyczne. Ponadto, wprowadziłam do badań dotąd niestosowaną metodę sortowania magnetycznego.

5.1.3. Współpraca z ESCCA (European Society for Clinical Cell Analyses)

Współpraca z grupą portugalską, a w szczególności z Dr Maria Arroza zaowocowała w 2015 roku moją współpracą z ESCCA w ramach umowy wolontariatu organizacji logistycznej kursów i konferencji o zasięgu międzynarodowym organizowanych przez ESCCA corocznie w Europie (6 konferencji; Załącznik 4, pkt II/8.2.). Do moich bezpośrednich obowiązków należała **pomoc Organizatorom w obsłudze technicznej sesji wykładów plenarnych, kursów, sesji plakatowych, kontakt z Prelegentami (asysta podczas sesji), zbieranie ankiet opinii zwrotnej o Konferencji, czy pomoc w logistycznych aspektach podczas paneli dyskusyjnych i praktycznej analizie przypadków.** W ramach tej współpracy odbyłam również szkolenie w ramach **ERASMUS STT (Staff Mobility for Training)**, które poprzedzało konferencję “Flow cytometric methods in immunology” organizowany przez ESCCA, we **Włoszech, na Sycylii we wrześniu 2015 r** (uczestnictwo potwierdzone certyfikatem, Załącznik 4, pkt II/11.1, SZ3). Moja aktywność w ESCCA dotyczyła głównie kooperacji z **Dr Paula Fernandez** kierującą FACS/Stem Cell Laboratory at the Institute for Laboratory Medicine, the Kantonsspital in Aarau w Szwajcarii, która przez 4 lata pełniła funkcje Prezydenta ESCCA. Pragnę podkreślić, że w oparciu o moje zaangażowanie w tej współpracy, osoby ściśle ze mną współpracujące również miały możliwość skorzystania z tej formy działalności naukowej.

5.1.4. Współpraca z University of Oxford (Wielka Brytania)

- **Dr Kevin Maloy, The Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford**
- **Dr David Ahern, Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford**

W sierpniu 2018 roku w ramach realizacji zadania badawczego grantu NCN nr 2018/29/N/NZ5/02375 (PN10) nawiązałam kontakt naukowy z Dr Kevinem Maloy i wyjechałam do jednostki Uniwersytetu w Oksfordzie: The Sir William Dunn School of Pathology. W jednostce naukowo-usługowej zajmującej się szeroko pojętą cytometrią przepływową, nie tylko **ugruntowałam dotychczasową wiedzę cytometryczną, ale pozyskałam umiejętności z zakresu obsługi i wykorzystania w badaniach naukowych**

cytometrię obrazową. Umożliwiło mi to również **wykonanie badań z zastosowaniem cytometru obrazowego** (Amnis® ImageStream® X Mk II imaging flow oprogramowanie Ideas) próbek własnych **zaplanowanych w grantach, które potwierdziły uzyskane wcześniej przeze mnie wyniki standaryzacji metody oceny 5-hmUra, jak również wyniki kliniczne uzyskane w badaniach pacjentów z CLL.** Współpraca z powyższą jednostką miała być kontynuowana w roku 2019, ale ze względu na sytuację epidemiczną COVID-19 mój kolejny wyjazd nie doszedł do skutku, a wyniki w ramach projektu zostały kontynuowane w kooperacji z jednostką krajową i wykonano je w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, dzięki uprzejmości Dr hab. Pauliny Jackowiak, prof. ICHB PAN w Pracowni Analiz Pojedynczych Komórek. **Wyniki uzyskane w obu miejscach zostaną wykorzystane w publikacji, która obecnie jest w przygotowaniu.**

Pragnę również podkreślić, że w trakcie pobytu w Oksfordzie **odbyłam również szkolenie z zakresu metody cytometrii przepływowej z wykorzystaniem spektrometrii mas (CyTOF)** w Kennedy Institute of Rheumatology University of Oxford, pod opieką Dr David Ahern.

5.1.5. Współpraca z University College Dublin (Irlandia) oraz University Rochester i ExCyte (Stany Zjednoczone)

Kolejnym bardzo dla mnie ważnym elementem długoletniej współpracy międzynarodowej było podjęcie **działań naukowo-szkoleniowych** we współpracy z **Dr Timothy Paul Bushnell** oraz z **Dr Alfonso Blanco Fernandez**. Dr Timothy P. Bushnell jest dyrektorem laboratoriów Shared Resources Laboratories Medical Center Uniwersytetu Rochester (URMC) w Nowym Jorku i profesorem nadzwyczajnym pediatrii i hematologii. Jako dyrektor laboratoriów URMC, Dr Timothy P. Bushnell jest ambasadorem budowania pomostu między ośrodkami badań podstawowych, a naukowcami klinicznymi, nie tylko na Uniwersytecie w Rochester, ale również na całym świecie. Jest on jednym z założycieli i partnerem firmy ExCyte (Expert Cytometry), która obecnie jest wiodącym liderem szkoleniowym z zakresu cytometrii przepływowej na świecie. Przewodnią ideą działalności ExCyte jest zraszanie grona ekspertów i gromadzenie informacji eksperckich na temat każdego aspektu cytometrii przepływowej, a następnie w oparciu o najaktualniejszą wiedzę umożliwienie wszystkim najnowocześniejszych szkoleń z tego zakresu. Dr Alfonso Blanco Fernandez jest dyrektorem naukowym Core Technologies i dyrektorem Core Technologies of Flow Cytometry uniwersytetu „College Dublin” w Irlandii oraz europejskim dystrybutorem i

instruktorem ExCyte. Jest również założycielem i współdyrektorem Irlandzkiego Towarzystwa Cytometrycznego, współzałożycielem i prezesem Hiszpańskiego Towarzystwa Badawczego w Irlandii (SRSI), współzałożycielem i członkiem Towarzystwa Sieci Stowarzyszeń Hiszpańskich Naukowców i Badaczy za Granicą (Red de Asociaciones de Científicos e Investigadores Españoles en el Extranjero, RAICEx), organizatorem Towarzystwa Cytometrycznego „Red de Citometría IberoLatAm” działającej prężnie w krajach Ameryki Łacińskiej, a także doradcą naukowym wielu firm związanych z cytometrią przepływową. Jest również organizatorem i zarazem prowadzącym wiele kursów i szkoleń cytometrycznych. Niewątpliwie jest uznanym ekspertem w skali światowej z zakresu cytometrii przepływowej. W oparciu o naszą długoletnią współpracę i moje doświadczenie cytometryczne postanowiliśmy połączyć nasze siły i dodatkowo w kooperacji z dr Heleną Moreira z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu organizować konferencje naukowo-szkoleniowe na terenie Polski. Robimy to razem od 2018 roku, a **organizowane przez nas konferencje dotyczą przede wszystkim edukacji z zakresu cytometrii przepływowej, nowych standardów i zastosowania tej metody w badaniach naukowych i medycznych.** Dedykowane są zawsze zróżnicowanej grupie odbiorców, niezależnie od stopnia zawansowania pracy z cytometrią przepływową, uczestnictwo każdorazowo zostaje potwierdzone certyfikatem. We wszystkich spotkaniach należę do grona głównych organizatorów, współtworzę program każdej konferencji, dbam o aspekty organizacji warsztatów praktycznych (które są bardzo istotną częścią naszych spotkań). **Pragnę podkreślić, że na ten moment jesteśmy jedynym organizatorem tego typu szkoleń z zakresu cytometrii przepływowej w Polsce.** W najbliższym czasie razem z dr Helena Moreira planujemy rozszerzenie naszej współpracy z Dr Alfonso Blanco Fernandez o badania mikropęcherzyków (EVs, Extracellular Vesicles) wydzielanych przez komórki nowotworowe. Z myślą o tym projekcie w listopadzie tego roku planowana jest w Bydgoszczy konferencja pt. „Małe jest piękne” (załącznik 4, pkt II/ 8.4.d), a kolejna konferencja z udziałem ExCyte na pierwszą połowę przyszłego roku. Ponadto, z Dr A. Blanco-Fernandez współpracuję również w ramach aktywności związanej z grupą roboczą ISAC.

5.1.6. Współpraca z ISAC (International Society for Advancement of Cytometry)

W 2020 roku zostałam zaproszona przez **Dr Lourdes A. Arriaga-Pizano** do **współpracy w Grupie Roboczej Towarzystw Stowarzyszonych (Council of Associated Societies Subcommittee) największego na świecie towarzystwa cytometrycznego ISAC**

(**International Society for Advancement of Cytometry**), która obecnie stanowi 18 osób z całego świata. Naszym głównym zadaniem jest ułatwienie i wzmocnienie współpracy między Towarzystwami Cytometrycznymi na całym świecie, a także pomiędzy Towarzystwami a ISAC. W kooperacji z Komitetem ds. Edukacji ISAC (**Education Committee**) promujemy wielojęzyczność na konferencjach, opracowujemy wysokiej jakości materiały edukacyjne dotyczące cytometrii, walczymy o równość w dostępie do usług oferowanych przez producentów aparatów na całym świecie oraz promujemy programy mentorskie z udziałem uznanych członków Towarzystw stowarzyszonych z ISAC. W 2022 roku w ramach powyższej współpracy byłam członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji ISAC w Filadelfii, US.

5.1.7. Współpraca z Dr Raifem Yucel, University of Exeter (Wielka Brytania)

Moja współpraca z **Dr Raif Yucel** rozpoczęła się wiele lat temu, kiedy był on pracownikiem Uniwersytetu w Aberdeen w Szkocji (Head of the Iain Fraser Cytometry Centre) i początkowo dotyczyła jedynie konsultacji naukowych dotyczących metody cytometrii przepływowej. W 2019 roku Dr R. Yucel ze względu na swoje ogromne doświadczenie i wiedzę dołączył do grona specjalistów prowadzących sesje na konferencji współorganizowanej przeze mnie we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu i ExCyte. W roku 2019 został też kierownikiem nowo utworzonego centrum: Exeter Centre for Cytomics (EXCC) na Wydziale Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Exeter w Wielkiej Brytanii. Jako główny specjalista ds. cytometrii aktywnie uczestniczy w nauczaniu cytometrii przepływowej i metod pokrewnych w ramach różnych programów nauczania na Uniwersytecie w Exeter i poza nim. **W oparciu o naszą współpracę w 2021 roku jako przedstawiciel Uniwersytetu Exeter poprowadził sesje dotyczące zasad i zastosowania wielokolorowej cytometrii przepływowej na konferencji współorganizowanej przeze mnie we Wrocławiu.** W 2022 roku dr R. Yucel przyjął moje zaproszenie i dzięki wsparciu centrum doskonałości „w kierunku medycyny spersonalizowanej” **był jednym z prelegentów zorganizowanej przeze mnie tygodniowej szkoły cytometrii przepływowej dla studentów, doktorantów i młodych naukowców UMK oraz krajowego interaktywnego spotkania cytometrycznego** (załącznik 4, pkt II/ 8.4.b,c). W ramach prelekcji i warsztatów praktycznych jako pierwsi zaprezentowaliśmy opracowaną przez zespół w Aberdeen metodę oceny czynników zewnątrz- i wewnątrz-komórkowych przy użyciu cytometru spektralnego. Ponadto, Dr R. Yucel w ramach swojego pobytu (14.02-21.02.2022) **przeprowadził liczne konsultacje merytoryczne**

z pracownikami CM UMK w zakresie „wykorzystania technik cytometrycznych do ilościowej i jakościowej analizy ekspresji białek zaangażowanych w procesy metylacji, demetylacji, deaminacji i naprawy DNA”. Moja współpraca z Dr R. Yucel realizowana jest również w ramach aktywności związanej z grupą roboczą ISAC.

5.2. WSPÓŁPRACA Z POLSKIMI INSTYTUCJAMI NAUKOWYMI

5.2.1. Współpraca z Instytutem „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Współpraca naukowa z Instytutem „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” dotyczy długoletnio prowadzonych badań wspólnie z Zakładem Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Kliniką Nefrologii, Transplantacji Nerek i Nadciśnienia Tętniczego oraz Zakładem Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej. Głównym przedmiotem współpracy od samego początku były i są badania oceniające mechanizmy nieswoistej i swoistej odpowiedzi immunologicznej w grupie dzieci ze stłuszczeniem wątroby oraz z NTP, opisane szczegółowo przy prezentacji cyklu prac mojego osiągnięcia naukowego. Współpraca ta była i jest realizowana w ramach zadań badawczych 5 grantów MNiSzW/NCN (**PN1, PN3-PN7**) oraz 4 grantów wewnętrznych, a uzyskane wyniki zostały opublikowane w wielu publikacjach o zasięgu międzynarodowym (**H1-H5, P12, P34, P45**). Wyniki wspólnych badań zostały również zaprezentowane na wielu konferencjach międzynarodowych (8 wystąpień). W 2019 roku moja współpraca została rozszerzona o Klinikę Gastroenterologii, Hepatologii, Zaburzeń Odżywiania i Pediatrii, w ramach której realizowany jest grantu NCN (**PN12**). Głównym celem projektu jest ocena odpowiedzi immunologicznej w kontekście określonych cech mikrobiomu/metabolomu jelitowego u dzieci/młodzieży z NTP oraz niealkoholową chorobą stłuszczeniową wątroby (NAFLD). Szczegółowym zadaniem badawczym jest ocena fenotypu komórek metodą cytometrii przepływowej przed i po stymulacji metabolitami mikrobioty (ekstrakty kału), ocena produkcji cytokin oraz profil ekspresji wybranych genów. Badania immunologiczne, realizowane w ramach umowy Konsorcjum w kierowanej przeze mnie jednostce CM UMK, dotyczą 1) oceny dystrybucji obwodowych limfocytów T subpopulacji komórek Th1, Th2, Th17, komórek regulatorowych Breg oraz Treg, jak również 2) profilu odpowiedzi jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs) indukowanych metabolitami mikrobioty pozyskanymi od pacjenta/dziecka grupy kontrolnej w układzie autologicznym (ekstrakty wodne próbek kału) w zakresie: a) produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych b) charakterystyki fenotypowej, tj. dystrybucji i stanu aktywacji limfocytów T o

funkcji immunoregulacyjnej (Breg, Treg) oraz c) komórek o potencjale prozapalnym (Th1, Th17). Mój udział w projekcie dotyczy opracowania koncepcji badań i prac eksperymentalnych oznaczeń metodą wielokolorowej cytometrii przepływowej, wykonania analiz dystrybucji populacji i fenotypizacji komórek limfocytów T CD4+ i Treg krwi pełnej i PBMCs po indukcji. Wstępnie opracowane wyniki badań zostały zaprezentowane w Filadelfii na konferencji międzynarodowej w 2022 r. (2 wystąpienia plakatowe). Powyższy grant realizowany jest również we współpracy z Kliniką Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

5.2.2. Współpraca z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu i Wielkopolskim Centrum Onkologii

Moja współpraca naukowa z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu i Wielkopolskim Centrum Onkologii (prof. Andrzej Marszałek) dotyczyła prac naukowych prowadzonych w ramach podstawowych zadań badawczych Katedry Immunologii CM UMK i współpracy z Katedrą Patomorfologii Klinicznej CM UMK, a dotyczyła dwóch tematów badawczych. Pierwszy dotyczył oceny wybranych aspektów immunoregulacyjnego działania egzogenego surfaktantu płucnego na modelu leukocytów krwi obwodowej (PBMC) w warunkach *in vitro*. Moje zadania w ramach tego projektu obejmowały:

- ustalenie optymalnych warunków immunosupresyjnego oddziaływania surfaktantu zewnętrznego na proliferację limfocytów T oraz PBMC w hodowlach *in vitro*,
- próbę odwracania efektu supresyjnego przez cytokiny (IL-2) lub/i autologiczne monocyty,
- określenie które typy limfocytów są konieczne dla uzyskania efektu supresyjnego (limfocyty T CD4+, CD8+, B, NK),
- ostatecznie wykazanie czy monocyty/makrofagi podlegają kontroli limfocytów T w warunkach aktywacji PBMC przez surfaktant egzogeny w obecności mitogenu.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że PBMC indukowane egzogenym surfaktantem charakteryzują się niskim poziomem proliferacji oraz silną supresją odpowiedzi proliferacyjnej komórek stymulowanych mitogenem w warunkach wysokich stężeń surfaktantu w środowisku reakcji, bez względu czy komórkami stymulowanymi były PBMC czy izolowane monocyty. Bardzo cenną obserwacją był fakt supresji odpowiedzi proliferacyjnej izolowanych limfocytów i PBMC indukowanych mitogenem po uprzednim

„primingu” badanych komórek z egzogennym surfaktantem, ściśle zależnym od dawki, w przypadku gdzie ten sam model stymulacji komórek monocytu charakteryzował się nadreaktywnością badanych komórek. Rezultaty badań zaprezentowano w 2008 roku na międzynarodowym kongresie patologów w Barcelonie, w Hiszpanii [K35] oraz na konferencjach krajowych [K37, K41].

Drugi temat badawczy dotyczył wpływu czynników apoptotycznych i mitotycznych (głównie dokсорubicyny) na zmiany cytoszkieletu aktynowego i ekspresji kofiliny w linii komórkowej CHO AA8. Badania realizowane były w oparciu o wspólnie realizowany grant MNiSzW (PN2). Do moich głównych zadań badawczych należała ocena zmian komórkowych metodą cytometrii przepływowej takich jak: ocena odsetka komórek apoptotycznych w układzie AnnexinV/7-AAD, ocena zmian cyklu komórkowego traktowanych komórek i fragmentacji DNA metodą TUNEL. Dodatkowo oceniałam wewnątrzkomórkową ekspresję aktyny w komórkach linii CHO AA8 oraz izolowanych jądrach komórkowych po traktowaniu dokсорubicyną. Końcowe wnioski badań objętych współpracą ukazały, że dokсорubicyna indukuje dwa różne sposoby śmierci komórek w linii komórkowej CHO AA8: apoptozę i katastrofę mitotyczną. Komórki przechodzące katastrofę mitotyczną oprócz charakterystycznych zmian wykazywały cechy apoptozy i martwicy. Sugeruje się również, że w obu przedstawionych procesach bierze udział specyficzna reorganizacja układu F-aktyny wraz z jego znaczącymi zmianami ilościowymi (obserwowany wyraźny wzrost). Artykuły będące efektem współpracy to: **P5, P7, P8, P15**. Wyniki zostały zaprezentowane również na 6 konferencjach międzynarodowych.

5.2.3. Współpraca z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu

Od wielu lat ściśle współpracuję z dr Heleną Moreira z Katedry i Zakładu Podstaw Nauk Medycznych, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w ramach prowadzenia działalności badawczo-szkoleniowej. Wraz z dr H. Moreira organizujemy razem krajowe oraz międzynarodowe konferencje i szkolenia (we współpracy z ExCyte) dotyczące cytometrii przepływowej, jej wykorzystania w pracach badawczych i diagnostycznych (załącznik 4, pkt II/8.3., 8.4.d). W ramach naszej współpracy, w roku 2019 dr H. Moreira odbyła również staż naukowy w Katedrze Immunologii CM UMK, którego byłam bezpośrednim koordynatorem. Wspólnie prowadzone prace badawcze dotyczą głównie zastosowania cytometrii przepływowej do analizy nowotworowych komórek macierzystych. Wstępne wyniki wspólnie prowadzonych badań z Katedrą i Zakładem

Podstaw Nauk Medycznych oraz grupą badawczą kierowaną przez dr Christiana D. Muller we Francji, zostały przedstawione podczas konferencji cytometrycznej w Strasburgu w październiku 2021 roku (**K145**). Ponadto planujemy rozszerzyć współpracę naukową o wspólny projekt badawczy NCN dotyczący oceny oznak przedwczesnego starzenia się układu immunologicznego u dzieci i młodzieży z zespołem Downa oraz wpływu obserwowanego polimorfizmu w trisomii 21 na zaburzenia procesów aktywnej metylacji i demetylacji DNA (projekt w opracowaniu). W oparciu o duże doświadczenie metodyczne obu zespołów zamierzamy wykorzystać najnowocześniejsze metody badawcze związane z wykorzystaniem wielokolorowej cytometrii przepływową do oceny fenotypów populacji limfocytów (zwłaszcza komórek "starzeniowych", komórek regulatorowych oraz o potencjale apoptotycznym i prozapalnym) oraz w oparciu o wystandardyzowaną metodykę oceny enzymów zaangażowanych w proces aktywnej metylacji/demetylacji DNA ocenić w jaki sposób zaburzenia epigenetyczne wiążą się z obserwowanym polimorfizmem Zespołu Downa.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ

6.1. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

6.1.1. Zajęcia dydaktyczne ze studentami CM w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Dydaktyka stanowi istotną część mojej pracy zawodowej. Od 2000 roku prowadzę zajęcia dydaktyczne, w tym seminaria, ćwiczenia audytoryjne, zajęcia praktyczne i fakultatywne, z zakresu immunologii, immunodiagnostyki i immunopatologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego CM UMK: kierunek farmacja, kierunek analityka medyczna, kierunek kosmetologia, dla studentów Wydziału Lekarskiego CM UMK: kierunek lekarski (studia stacjonarne i niestacjonarne), kierunek biotechnologia i biotechnologia medyczna (średnio ok. 300 godzin dydaktycznych rocznie). Biorę czynny udział w opracowaniu treści prowadzonych przez siebie zajęć, jak również w opracowywaniu sylabusów tematów przeze mnie realizowanych. Ponadto w latach 2010-2012 prowadziłam również zajęcia w języku angielskim ze studentami kierunku Lekarskiego English Division oraz zajęcia ze studentami z programów wymiany ERASMUS. Dodatkowo prowadziłam zajęcia w ramach studiów podyplomowych dla kierunku Analityka Medyczna na Wydziale Farmaceutycznym CM UMK. Współtworzyłam również dwa autorskie programy zajęć fakultatywnych pt. „Podstawy

immunoprofilaktyki i immunoterapii” oraz „Immunologia i immunopatologia skóry”, które prowadziłam na kierunkach kosmetologia oraz analityka medyczna.

W ramach promocji uczelni macierzystej prowadziłam warsztaty naukowe podczas Dni Nauki CM UMK „MEDICALIA” oraz zajęcia warsztatowe dla licealistów w ramach promocji kierunków studiów Wydziału Farmaceutycznego.

6.1.2. Promotorstwa i opieka nad naukowymi pracami studentów

- a) **Opiekun 11 oraz recenzent 3** prac magisterskich wykonanych przez studentów kierunku Farmacja, Analityka Medyczna i Biotechnologia CM UMK.
- b) **Promotor pomocniczy przewodu doktorskiego** mgr Izabeli Kubiszewskiej. Uchwała Nr 167/2014 Rady Wydziału Farmaceutycznego z dnia 9 grudnia 2014 r.

6.2. DZIAŁALNOŚĆ ORGANIZACYJNA ORAZ POPULARYZUJĄCA NAUKĘ

6.2.1. Organizacja międzynarodowych i krajowych konferencji, szkoleń i warsztatów naukowych

Od wielu lat zajmuję się organizowaniem konferencji, szkoleń i kursów, zarówno międzynarodowych jak i krajowych z zakresu podstaw techniki cytometrii przepływowej, jak i jej zastosowania w diagnostyce i badaniach naukowych. W 2012 roku byłam członkiem komitetu naukowego II Zjazdu Polskiego Towarzystwa Cytometrii (PTC) w Kazimierzu Dolnym (załącznik 4, pkt II/8.1.) oraz członkiem rady naukowej kwartalnika Polskiego Towarzystwa Cytometrycznego pt. „*Cytometria Polska*” (załącznik 4, pkt II/12). Od 2015 roku jestem wolontariuszem Europejskiego Towarzystwa Klinicznej Analizy Komórki (ESCCA), gdzie odpowiedzialna jestem za pomoc w organizacji logistycznej konferencji międzynarodowych Organizatorów Głównym (załącznik 4, pkt II/8.2.). Od roku 2018 jestem głównym współorganizatorem i członkiem komitetu naukowego międzynarodowych spotkań organizowanych w Polsce we współpracy z ExCyte i Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu (załącznik 4, pkt II/8.3.). W ramach swojej działalności promującej naukę zorganizowałam również 6 konferencji i szkoleń/warsztatów krajowych (załącznik 4, pkt II/8.4. oraz pkt II/8.5.), w tym dwa we współpracy ze Studenckim Towarzystwem Diagnostów Laboratoryjnych CM UMK. Pragnę podkreślić, że organizowane przeze mnie spotkania każdorazowo potwierdzone są certyfikatem uczestnictwa i wielokrotnie umożliwiły uzyskanie

punktów „twardych” KIDL w ramach ciągłego szkolenia zawodowego dla diagnostów laboratoryjnych. W 2022 roku byłam również członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji ISAC w Filadelfii, US (załącznik 4, pkt II/8.6.).

Prowadziłam też wykłady w ramach sesji naukowych spotkań konferencyjno-szkoleniowych na zaproszenie (załącznik 4, pkt II/7).

6.2.2. Członkostwa w towarzystwach naukowych, członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

Jestem członkiem wielu międzynarodowych i krajowych organizacji i towarzystw naukowych w obszarze immunologii/cytometrii/analizy komórek. Do jednych z ważniejszych zaliczyć mogę swoją działalność jako **egzaminator w Państwowej Komisji Egzaminacyjnej w obszarze Laboratoryjna Immunologia Medyczna**, która odpowiada za przeprowadzenie PESDL, zarówno egzaminu części teoretycznej, jak i praktycznej. Również, już od wielu lat, zaangażowana jestem w scalanie środowiska cytometrycznego w Polsce, wspierania i promowania Polskiego Towarzystwa Cytometrii (PTC) i osób, które związane są z metodą cytometrii przepływową, zarówno w obszarach diagnostyki, jak i nauki. Od 2012 roku jestem członkiem, a od **2017 roku Prezesem-elektem PTC**. Od 2020 roku jestem **radnym komisji Towarzystw Stowarzyszonych ISAC** oraz **radnym komisji przyznającej nagrody i wyróżnienia** zasłużonych osób dla ISAC (Awards and Nominating Committee: 2021-2022) (załącznik 4, pkt II/10).

6.2.3. Uczestnictwo w edukacyjnych programach europejskich

W roku 2021 byłam autorem projektu naukowego i opiekunem studenta 5 roku kierunku: Medycyna i Chirurgia University College Hospital, Ibadan, Oyo State, z Nigerii, przebywającego w Katedrze Immunologii CM UMK w ramach międzynarodowego programu TABMED (Toruń and Bydgoszcz Medical Summer Program) realizującego temat pt: „Phenotypic and functional characteristics of mucosal associated invariant T cells -MAITs in patients with civilization diseases (hypertension, cardiac diseases)” (załącznik 4, pkt II/14).

7. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE DZIAŁANOŚCI NAUKOWEJ

7.1. Udział w konferencjach naukowych, szkoleniach i warsztatach

Od początku swojej pracy zawodowej regularnie i czynnie uczestniczę w krajowych i zagranicznych konferencjach oraz warsztatach i kursach poświęconych tematom mojego obszaru naukowego. Oprócz **rozdziałów monografii i publikacji** zamieszczonych w wykazie osiągnięć naukowych (załącznik 4, pkt II/2 i pkt 4) jestem autorem/współautorem łącznie 147 krajowych i zagranicznych doniesień konferencyjnych (załącznik 4, pkt II/7.4.).

W celu doskonalenia wiedzy i umiejętności praktycznych byłam również uczestnikiem 17 kursów doszkalających z zakresu cytometrii przepływowej i immunologii, każdorazowo potwierdzonych certyfikatem (załącznik 4, pkt II/17.2.).

7.2. Realizacja projektów badawczych

Jestem zaangażowana w realizację wielu projektów naukowych finansowanych zarówno ze źródeł zewnętrznych (13 grantów MNiSzW/NCN), jak również źródeł wewnętrznych, w tym **jestem kierownikiem** jednego z nich. Od roku 2000 do chwili obecnej (corocznie) jestem członkiem zespołu wykonującym badania w ramach podstawowej działalności badawczej i statutowej Katedry Immunologii CM UMK (załącznik 4, pkt II/9).

W latach 2020-2022 byłam członkiem wielośrodkowego zespołu badawczego w obszarze „New insight into chronic diseases: from risk factors, through prevention, diagnosis to treatment” w ramach konkursu Inicjatywy Doskonałości - Uczelni Badawczej (IDUB) (załącznik 4, pkt II/15).

7.3. Staże naukowe

Odbyłam **4 staże w renomowanych ośrodkach zagranicznych** oraz **trzymiesięczny staż** naukowo-dydaktyczny w ramach Projektu pt. „**Z nauki do biznesu-II edycja**” współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego, Programu Operacyjnego Kapitału Ludzkiego (załącznik 4, pkt II/11).

7.4. **Recenzowanie publikacji i projektów**

- 7.4.1. Jestem recenzentem projektów konkursowych **Grants4NCUStudents** IDUB UMK.
- 7.4.2. Recenzowałam projekt naukowy na prośbę Medical Research Council (**Singapur**):
“Evaluation of Lactobacillus strains and routes of delivery for optimization of immune responses to secreted antigens”.
- 7.4.3. Byłam recenzentem zagranicznego czasopisma: Oxidative Medicine and Cellular Longevity (załącznik 4, pkt II/13 i pkt 16).

7.5. **Nagrody i wyróżnienia.**

Trzykrotnie otrzymałam nagrodę zespołową Jego Magnificencji Rektora UMK za osiągnięcia naukowo-badawcze. W roku 2016 zostałam wyróżniona listem gratulacyjnym Ministra Zdrowia i otrzymałam tytuł „*Specjalista 2016*” (załącznik 4, pkt II/17.1.).

7.6. **Współpraca z otoczeniem gospodarczym.**

Jestem współzałożycielem i wspólnikiem spółki spin-off, spółki z o.o. „Immbionicscience for health”, w której skład wchodzi między innymi Centrum Transferu Technologii UMK. Spółka prowadzi działalność naukowo-badawczą i edukacyjną. Od kilku lat współpracuję również z firmą **SANPROBI**, spółką z o.o. Sp.k. (uznany w Polsce ekspert w suplementacji probiotycznej) w zakresie wykorzystania metody cytometrii przepływowej w badaniach mikrobiologicznych (załącznik 4, pkt III/3).

7.7. **Informacje naukometryczne**

Researcher ID: G-8885-2014

ORCID: 0000-0001-7666-504X

Scopus Author ID: 26658949100

INFORMACJE DODATKOWE

Liczba cytowań według Web of Science: 586 (bez autocytowań: 547)

Index Hirscha według Web of Science: 16

Liczba cytowań według Scopus: 619 (bez autocytowań: 577)

Index Hirscha według Scopus: 16

	przed uzyskaniem stopnia doktora	po uzyskaniu stopnia doktora	łącznie
publikacje w czasopismach indeksowanych w JCR	0	45	45
IF/pkt. MNiSW/pkt. MEiN	IF=0/0 pkt. MNiSW	IF=111,348 /828 pkt. MNiSW /710 pkt MEiN	IF=111,348 /828 pkt. MNiSW /710 pkt MEiN
publikacje w czasopismach spoza JCR (bez IF)	2	2	4
pkt. MNiSW/pkt. MEiN	8 pkt. MNiSW	4 pkt. MNiSW /20 pkt. MEiN	12 pkt. MNiSW /20 pkt. MEiN
Rozdziały w monografiach	1	18	19
pkt. MNiSW/pkt. MEiN	3 pkt. MNiSW	82 pkt. MNiSW /20 pkt. MEiN	85 pkt. MNiSW /20 pkt. MEiN
inne doniesienia naukowe	9	138	147
w tym w formie wykładów na zaproszenie	0	3	3
w tym w formie streszczeń, referatów i plakatów	9	135	144
w tym jako autor prezentujący	2	9	11
udział w projektach badawczych zewnętrznych	0	13	13
w tym jako kierownik/wykonawca	0/0	0/13	0/13
udział w projektach badawczych wewnętrznych	0	8	8
w tym jako kierownik/wykonawca	0/0	1/7	1/7
promotorstwo pomocnicze	0	1	1
recenzje prac naukowych	0	1	1
recenzje projektów badawczych	0	1	1
opieka nad pracami dyplomowymi	0	11	11
recenzje prac dyplomowych	0	3	3
suma IF	0	111,348	111,348
suma pkt MNiSW	11	914	925
suma pkt MEiN	0	750	750