AUTOREFERAT

I. Imię i nazwisko: Dariusz Boroń

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

1995 – uzyskanie tytułu zawodowego lekarza, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii w Zabrzu, Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

2005 – uzyskanie tytułu specjalisty w zakresie położnictwa i ginekologii - Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi, nr 0724/2005.2/10

2008 – uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy: „Wpływ preekspozycji cynkiem na toksyczne efekty działania kadmu u szczurów", Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Janusz Konecki
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Recenzenci: Prof. dr hab. n. med. Maria H. Borowska
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Prof. dr hab. n. med. Ryszard Brus
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

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

Od 01-10-1995 do 31-03-2001
Asystent w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym nr 7 w Górnośląskim Centrum Medycznym ŚLAM; Oddział Ginekologii

Od 01-03-2002 do 31-01-2009
Starszy asystent w Szpitalu Miejskim w Sosnowcu, Oddział Gienkologiczno-Położniczy w Sosnowcu – lekarz kontraktowy

Od 01-10-2011 do nadal: Wykładowca w Wyższej Szkole Planowania Strategicznego w Dąbrowie Górniczej, 41-303, ul. Kościelna 9

1996 do nadal: Wolontariat w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embiologii Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

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

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji:

Cykl prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe zrealizowane w obszarze badawczym: „Udział wybranych czynników zapalnych w patogenezie osteoporozy pomenopauzalnej"

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem **7 oryginalnych** prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR).* **Sumaryczny IF** wynosi 10,441 (KBN/MNiSW - 122 pkt.). Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

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

1. **Boroń D,** Plewka A, Jędrusik P.: Polimorfizm 1181G/C genu *OPG* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie. Ann. Acad. Med. Siles. 2014; 68: 407-414. **KBN/MNiSW – 4 pkt.** *(praca oryginalna)*
   Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

2. **Boroń D,** Plewka A, Jędrusik P.: Polimorfizm 575C/T genu *RANK* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie. Ann. Acad. Med. Siles. 2014; 68: 192-199. **KBN/MNiSW – 4 pkt.** *(praca oryginalna)*
   Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu, zapewnieniu

integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

3. **Boroń D,** Plewka A, Jędrusik P.: Polimorfizm -643C/T genu *RANKL* i jego związek z osteoporozą u kobiet po menopauzie. Ann. Acad. Med. Siles. 2014; 68: 415-423. **KBN/MNiSW – 4 pkt.** *(praca oryginalna)*
Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, redakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

4. **Boroń D,** Kamiński A, Kotrych D, Bogacz A, Uzar I, Mrozikiewicz PM, Czerny B.: Polymorphism of vitamin D3 receptor and its relation to mineral bone density in perimenopausal women. Osteoporos Int. 2015, 26: 1045–1052. **IF – 4,169; KBN/MNiSW – 35 pkt.** *(praca oryginalna)*
Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, współredakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 70%.

5. **Boroń D,** Seremak-Mrozikiewicz A, Kotrych D, Bogacz A, Kamiński A.: Polymorphism of interleukin-17 and its relation to mineral density of bones in perimenopausal women. Eur J Med Res. 2014, 19:69 p.1-7. **IF – 1,495; KBN/MNiSW – 20 pkt.** *(praca oryginalna)*
Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, współredakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

6. **Boroń D,** Czerny B, Bartkowiak-Wieczorek J, Sieroń D, Wolski H.: Omentin polymorphism and its relations to bone mineral density in women. Arch. Med. Res. 2015; 46: 173-180. **IF – 2,645; KBN/MNiSW – 25 pkt.** *(praca oryginalna)*
Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, współredakcji manuskryptu, zapewnieniu integralności całego badania. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 80%.

7. **Boroń D,** Kotrych D, Bartkowiak-Wieczorek J, Uzar I, Bogacz A, Kamiński A.: Polymorphisms of *OPG* and their relation to the mineral density of bones in pre- and postmenopausal women. Int. Immunopharmacol. 2015; 28: 477–486. **IF – 2,472; KBN/MNiSW – 30 pkt.** *(praca oryginalna)*
Mój wkład w powstanie pracy polegał na: stworzeniu koncepcji projektu, zapewnieniu integralności badania, analizie i interpretacji wyników, przeglądzie piśmiennictwa, współredakcji manuskryptu. Mój proporcjonalny udział w realizacji pracy szacuję na 75%.

W załączeniu :

- kopie powyższych prac (załącznik nr 3)

- oświadczenie współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim (załącznik nr 5)

- potwierdzenie IF z poświadczeniem przez Bibliotekę Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (załącznik nr 7)

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

Osteoporoza należy do najbardziej rozpowszechnionych chorób metabolicznych tkanki kostnej. Biorąc pod uwagę lokalizację schorzenia dzieli się ją na uogólnioną i miejscową. Miejscowa postać osteoporozy odnosi się do określonego fragmentu układu kostnego, w którym obserwowane są cechy odwapnienia. Zdecydowana większość przypadków osteoporozy miejscowej ma charakter wtórny. Jej cechą charakterystyczną jest to, że łatwo można określić przyczynę tej patologii. Drugi typ osteoporozy obejmuje schorzenie całego szkieletu kostnego, ale jej przyczyną może być długotrwałe unieruchomienie na przykład na skutek choroby przewlekłej czy defekty metaboliczne. W zależności od przyczyny wyróżnia się więc dwa rodzaje osteoporozy uogólnionej, tj. osteoporozę pierwotną i osteoporozę wtórną. Ta pierwotna stanowi co najmniej 75% przypadków tego schorzenia.

Osteoporoza jest wieloczynnikową chorobą, w której biorą udział liczne czynniki środowiskowe i genetyczne. Ostatnio ukazały się doniesienia, w których uważa się, że czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w występowaniu osteoporozy. Do najczęstszych branych pod uwagę czynników genetycznych należą geny dla kalcytoniny, receptorów wapniowych, kolagenazy, estrogenów, parahormonu oraz hormonu witaminy D_3. Rozległe badania, w tym rodowodowe oraz na bliźniętach wykazały, że genetyczne czynniki w ponad 80% przypadków warunkują utrzymanie właściwej gęstości kości.

Brak dobrze opracowanych danych oraz wieloczynnikowy charakter osteoporozy wymaga dalszych badań w celu zarówno poszukiwania jak i weryfikacji nowych czynników etiopatogenetycznych, a także retrospektywnej oceny istniejących danych. Analiza wyników dotychczasowych badań nie pozwala jeszcze na jednoznaczne określenie roli badanych cytokin w etiopatogenezie osteoporozy. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono określić rolę powiązań badanych cytokin z procesem osteoporozy postmenopauzalnej, gęstością kości i innymi parametrami osobowymi i klinicznymi.

Jakkolwiek występowanie i rozwój osteopenii i osteoporozy jest związany z polimorfizmami genów *OPG*, *RANK* i *RANKL*, to dodatkowo postanowiono ocenić wpływ innych polimorfizmów, w tym genu *VDR* kodującego receptor witaminy D, genu *IL-17A* kodującego interleukinę 17 oraz genu *ITLN1* kodującego omentynę-1. Analizie został poddany związek badanych wielu wariantów genetycznych w powiązaniu z zaawansowaniem zmian

kostnych, a także powiązanie z parametrami obrotu kostnego oraz ocena znaczenia badanych polimorfizmów genetycznych w etiopatogenezie osteoporozy. Parametrami klinicznymi i osobowymi analizowanymi w niniejszej pracy były: wiek kobiet, ich masa ciała, wzrost, BMI, data wystąpienia pierwszej i ostatniej miesiączki, ilość lat od menopauzy, masa urodzeniowa i inne. Do oceny wybrano te parametry, bowiem istnieją sugestie, że są powiązane z wartościami BMD oraz z ryzykiem wystąpienia osteopenii i osteoporozy.

Moje zainteresowania i badania w tej dziedzinie zainspirowały mnie do opublikowania uzyskanych wyników w kilku pracach, które stały się podstawą rozprawy habilitacyjnej i stanowią próbę odpowiedzi na poszukiwania nowych genów kandydujących w osteoporozie oraz uzupełnienia danych klinicznych w tym obszarze badań. Osteoporoza inspiruje do wieloośrodkowych badań, których celem jest poszukiwanie nowych genów kandydujących, umożliwiających wykorzystanie ich w profilaktyce, diagnostyce i terapii tej choroby. Opublikowane w niniejszej pracy wyniki eksperymentu oraz ich wzajemne korelacje stanową próbę uzupełnienia danych kliniczych dotychczasowych badań.

Celem badań było zbadanie częstości występowania polimorfizmów *OPG −950T/C*, *OPG −163A>G* w rejonie promotorowym, oraz *OPG 1181G>C* w eksonie 1 genu kodującego osteoprotegerynę, *RANK 575C/T* w eksonie 7 genu kodującego RANK oraz *RANKL −643C/T* ze szlaku cytokinowego RANK/RANKL/OPG, a także analiza polimorfizmów genu *VDR* kodującego receptor witaminy D, genu *IL-17A* kodującego interleukinę 17 oraz genu *ITLN1* kodującego omentynę-1, w grupie kobiet po menopauzie.

Badaniami została objęta grupa niespokrewnionych kobiet populacji kaukaskiej, zamieszkujących w Polsce. Badania przeprowadzono na grupie 800 kobiet, w tym 505 w wieku postmenopauzalnym i 295 rozrodczym, z województw zachodniopomorskiego i wielkopolskiego. Grupa kobiet w wieku pomenopauzalnym obejmowała 314 pacjentek z osteoporozą, 110 z osteopenią i 81 kobiet zdrowych. W celu uzyskania jak największej ilości wyników prowadzonego eksperymentu, które stały się podstawą redakcji maszynopisów, mających stać się bazą do uruchomienia procedury uzyskania tytułu doktora habilitowanego jest fakt, że badania te dotyczyły nie tylko osteoporozy, ale także oceniano łagodniejszy jej wymiar czyli osteopenię.

Moje wyniki są jednymi z niewielu, gdzie w tak szerokim zakresie oceniano wpływ tak dużej liczby polimorfizmów na status tkanki kostnej w wieku okołomenopauzalnym kobiet. Badania molekularne osteoporozy są jednym z najbardziej dynamicznie rozwijających się obszarów badań związanych z biologią kości. Co roku ukazuje się jednak niewiele publikacji na temat genetyki chorób kości. Niezbędne staje się zbieranie wszystkich danych, których wynikiem są próby zidentyfikowania genetycznych czynników oraz interakcji leżących u podłoża tych chorób.

Istnieją już artykuły naukowe, w których określa rolę genetycznych czynników wpływających na powstawanie osteoporozy.

Już od dawna wiemy, że osteoporoza jest chorobą zależną od wielu czynników. W przypadku takich schorzeń zmienność populacyjna określana jest poprzez interakcje czynników genetycznych ze środowiskowymi. Osteoporoza często jest dziedziczona niezgodnie z prawami Mendla. Wynika to stąd, że na przykład w przypadku masy kostnej, mutacja jednego genu może prowadzić do zniesienia wpływu innych genów, które warunkują występowanie określonej cechy. Wykazano, że czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w regulacji gęstości mineralnej kości (BMD). Wykazano to między innymi na podstawie pomiarów wartości BMD w tak zwanych punkach krytycznych. Sugeruje to wyraźny udział czynników genetycznych w realizacji stanu fizjologicznego organizmu. Jednak wyniki jakie uzyskano pozostają nadal dyskusyjne. Nie pozwalają między innymi na jednoznaczne określenie, jaki jest wpływ polimorfizmów genu *OPG* na skłonność do wystąpienia osteoporozy.

Wybór polimorfizmów, które badano w tej pracy oparto na danych literaturowych wskazujących na istnienie związku pomiędzy ich obecnością a pojawieniem się osteoporozy. Brano też pod uwagę ich wpływ na wartości parametrów określających stan tkanki kostnej u kobiet w wielu okołomenopauzalnym. Jednym z elementów, który pozwoli zrozumieć patomechanizm osteoporozy jest między innymi możliwość zbadania obecności polimorfizmów, jak też ich wpływ na tkankę kostną u kobiet po menopauzie. Wpływ polimorfizmu A−163G i G1181C genu *OPG* na gęstość kości pomimo osiągnięcia pewnych sukcesów, nadal pozostaje niejasny. Na przykład, w przypadku polimorfizmu G1181C wiadomo, że zmiana nukleotydu może wiązać się z zaburzeniem wydzielania peptydu osteoprotegeryny.

Osteoprotegeryna której nazwa w wolnym tłumaczeniu oznacza „ochraniacz kości", została odkryta jako pierwsza z kompleksu OPG/RANK/RANKL. Potwierdzono jej zdolność do zahamowania rozwoju osteoklastów zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Jest to sekrecyjny czynnik hamujący różnicowanie i aktywność osteoklastów. Osteoprotegeryna jest glikoproteiną należącą do rodziny TNF. W formie dojrzałej osteoprotegeryna występuje w postaci homodimeru, który stanowi dominującą zewnątrzkomórkową postać tego białka.

Jak wiadomo, wyniki badań w poszczególnych populacjach różnią się od siebie. Jak dotąd, istnieją tylko nieliczne analizy tego typu wykonane na populacji polskiej. Zaobserwowano jak dotychczas pewne tendencje. W przypadku polimorfizmu A-163G genu *OPG* zauważono nieznacznie częstsze występowanie genotypu AG u kobiet ze zdiagnozowaną osteoporozą w porównaniu do grupy z prawidłowymi wartościami T-score oraz porównując łącznie grupę kobiet z osteopenią/osteoporozą z grupą z prawidłowymi wartościami T-score.

W niniejszych badaniach dotyczących częstości rozkładu polimorficznych genotypów T−950C, A−163G oraz G1181C genu *OPG* nie wykazano znamiennie statystycznych różnic w badanych grupach kobiet z osteoporozą, osteopenią i z prawidłową wartością T-score. Jedynie w przypadku polimorfizmu A−163G zaobserwowano niewielką przewagę heterozygot AG w grupie kobiet z osteoporozą. Te wyniki są jednymi z pierwszych, które uzyskano badając populację kobiet polskich. Jest więc oczywistym, że można je obecnie porównywać tylko z danymi uzyskanymi w innych krajach. Na przykład, w badaniach przeprowadzone na populacji kobiet duńskich wykazano statystyczną znamienność częstszego występowania zmutowanych homozygot GG w grupie kobiet z osteoporozą w porównaniu z grupą kontrolną [242]. W ośrodku tym wykazano również niższe wartości BMD L2–L4 u kobiet z osteoporozą z allelem G w porównaniu z grupą kontrolną i niższą częstość występowania zmutowanego genotypu CC polimorfizmu G1181C w grupie pacjentów z osteoporozą i złamaniami kości.

Prezentowane wyniki wskazują na brak wpływu polimorfizmu genotypu G1181C w eksonie pierwszym i przypuszczalnie słaby wpływ polimorfizmu A-163G w promotorze genu *OPG* na rozwój osteoporozy. Jednocześnie częstość występowania genotypów polimorfizmu A−163G i G1181C w grupie z prawidłowym T-score nie różni się zasadniczo od częstości tych genotypów w innych populacjach populacji kaukaskiej. Na podstawie danych literaturowych można sądzić, że niewielkie różnice mogą pojawić się w porównaniu z populacja azjatycką.

Brak korelacji między polimorfizmem T−950C a osteoporozą wykazano również w badaniach przeprowadzonych w Słowenii, które dotyczyły populacji kobiet w wieku pomenopauzalnym. Autorzy tych badań również nie zaobserwowali związku między badanym polimorfizmem a wartościami BMD mierzonymi w segmencie lędźwiowym rdzenia kręgowego oraz szyjce kości udowej. Ponadto, nie zaobserwowano różnic w częstości genotypów polimorfizmu T−950C u pacjentów w porównaniu ze zdrową kontrolą w populacji duńskiej. Podobnych obserwacji dokonano na populacji kobiet irlandzkich w wieku pomenopauzalnym. W badanej grupie nie wykazano żadnych związków między polimorfizmem T−950C a wartościami BMD. W ramach tych rozważań należy zacytować badania, w którzy przebadano populację kobiet australijskich w podeszłym wieku. Nie stwierdzono zasadniczych korelacji między polimorfizmem T−950C a wartością BMD, biochemicznymi parametrami obrotu kostnego czy częstością złamań kości. Brak takich powiązań między polimorfizmem T−950C a wartością BMD jak również złamaniami kości potwierdzili również w analizie w populacji kobiet w starszym wieku ze Szwecji.

W przypadku polimorfizmu G1181C zaobserwowano nieznacznie częstsze występowanie genotypu CC u kobiet z prawidłowymi wartościami T-score zarówno porównując grupę tą z grupą kobiet z osteoporozą/osteopenią łącznie, jak i w porównaniu tylko do grupy z osteoporozą. Genotyp GC wykazywał nieznacznie większą częstość występowania u kobiet z osteopenią oraz

osteopenią/osteoporozą w porównaniu do grupy kobiet z prawidłowymi wartościami T-score. Porównując ten sam genotyp w grupie kobiet z osteoporozą/osteopenią z grupą kobiet przed menopauzą zaobserwowano nieznacznie wyższą częstość występowania heterozygot w grupie kobiet przed menopauzą. Porównując badane polimorfizmy w grupie kobiet z osteopenią/osteoporozą do grupy kontrolnej kobiet przed menopauzą zaobserwowano nieznacznie częstsze występowanie homozygot recesywnych CC oraz allelu C, ale także homozygot dominujących GG w grupie kobiet z osteoporozą czy osteopenią.

Ponadto, polimorfizm genu OPG jest związany z zachowaną masą kostną w kręgosłupie lędźwiowym u osobników homozygotycznych 1181CC, podczas gdy jednostki homozygotyczne 1181GG i heterozygotyczne 1181GC występowały częściej u chorych ze zdiagnozowaną osteoporozą. Jednakże, kilku autorów nie zgłosiło istotnego związku między genotypem OPG G1181C i BMD. To sugeruje, że przewaga genotypu polimorfizmu OPG G1181C i jego wpływu genotypowego na masę kostną może różnić się między grupami etnicznymi lub różnymi krajami o tej samej etniczności. Niestety, mechanizm oddziaływania polimorfizmu OPG G1181C na BMD jest nieznany, aczkolwiek zmiana trzeciego aminokwasu OPG z podstawowej lizyny na asparaginę może wpłynąć na kinetykę wydzielniczą OPG.

Jak opisano to wcześniej w tej pracy, regulacja układu RANKL/RANK/OPG jest związana z czynnikami zapalnymi, wzrostowymi oraz układem hormonalnym. Efektem tej regulacji w tkance kostnej jest nadmiar RANKL w stosunku do OPG, co zwykle prowadzi do zwiększonej aktywności osteoklastów. Oczywiście, nadmiar OPG z kolei hamuje resorpcję kości. Tak więc cytokiny te wpływając na szlak RANKL/RANK/OPG zmieniają wzajemne relacje tych białek i modulują w ten sposób resorpcję kości. Wykazano również zwiększoną ekspresję genu OPG i w konsekwencji biosyntezą białka OPG uzyskano pod wpływem estrogenów w doświadczeniach *in vitro* u ludzi i na osteoblastach szczurów (te i inne obserwacje zostały opisane w **publikacjach nr 1 i 7**).

Regulacja cyklu życiowego osteoklastów jest obecnie dobrze poznana. Proces osteoklastogenezy z prekursorów hematopoetycznych, wymaga czynnika stymulującego, lecz kluczowymi cząsteczkami kontrolującymi różnicowanie, aktywację i przeżycie osteoklastów jest RANK i jego swoisty ligand nazywany ligandem RANKL oraz osteoprotegeryna (OPG), produkowane i uwalniane przez komórki zrębu szpiku kostnego i osteoblasty.

RANKL zlokalizowany jest na powierzchni komórki i wiąże się ze swoistym receptorem RANK na powierzchni prekursorów osteoklastów. Jest to istotny proces w mechanizmie wytwarzania nowych osteoklastów. Ponadto, wiązanie RANKL do RANK na dojrzałych osteoklastach wspomaga ich przyleganie do kości i hamuje ich apoptozę. OPG jest fizjologicznym receptorem pułapkowym dla RANKL, który wiąże zarówno rozpuszczalne, jak i związane z błoną cząsteczki RANKL, przez co kompetycyjnie hamuje wiązanie RANKL z RANK na osteoklastach

i ich prekursorach. Wiązanie OPG z RANKL powoduje hamowanie różnicowania osteoklastów, blokuje aktywację dojrzałych osteoklastów i pozwala na apoptozę osteoklastów. RANKL i jego receptor, tj. RANK stanowią więc istotne determinanty resorpcji kości za pośrednictwem osteoklastów, a więc przemiany kostnej i remodelowania całego szkieletu.

M-CSF indukuje ekspresję receptora dla RANKL w osteoblastach i ekspresję RANK w prekursorach osteoklastu, inicjując w ten sposób różnicowanie tych komórek w osteoklasty w obecności RANKL. RANKL eksponowany na powierzchni komórek preosteoblastycznych wiąże się z RANK na komórkach prekursora osteoblastów. Ligand RANK jest niezmiernie ważny dla różnicowania, a następnie fuzji do komórek wielojądrzastych, a także do aktywacji i przeżycia komórek osteoblastycznych.

Analizując polimorfizm *RANK* C575T we wszystkich badanych grupach kobiet w wieku pomenopauzalnym, stwierdzono częstsze występowanie homozygoty CC oraz wyższą częstość występowania heterozygoty CT w grupie kobiet ze zdiagnozowaną osteoporozą. W sumarycznej grupie kobiet obejmującej chorych na osteopenię i osteoporozę z grupą pacjentek o prawidłowych wartościach T-score, ujawniono podobną obserwację. Porównanie częstości genotypów CC i CT w grupie kobiet z osteopenią z ich częstościami w grupie kobiet w wieku rozrodczym nie wykazało opisanych powyżej zależności.

Należy pamiętać, że dane literaturowe są niejednoznaczne odnośnie wpływu polimorfizmu *RANK* C575T na parametry kostne. Wyniki badań tej pracy dotyczącej populacji polskiej raczej potwierdzają inne wyniki, na podstawie których wykazano, że polimorfizm *RANK* C575T nie wydaje się być czynnikiem genetycznym związanym z gęstością mineralną kości odcinka lędźwiowego kręgosłupa kobiet w wieku pomenopauzalnym. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych badań można przyjąć tezę, że genetyczne zróżnicowanie w obrębie genu *RANK* może mieć wpływ na obrót kostny.

Zaobserwowano związek jednego z polimorfizmów *RANK* z BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa oraz stawu biodrowego. Można sądzić, że geny *RANK* i *RANKL* wykazują związek z wiekiem wystąpienia pierwszej miesiączki i wiekiem wystąpienia naturalnej menopauzy.

Można również wnioskować, że homozygota mutant TT polimorfizmu genu receptora RANK nie jest czynnikiem zwiększonego ryzyka wystąpienia osteoporozy i jest powiązany z niższymi wartościami opisującymi gęstość kostną u kobiet z osteoporozą i osteopenią, co sugeruje, że polimorfizm ten może wpływać modulująco na stopień nasilenia utraty masy kostnej po wystąpieniu choroby. Obserwacje te zostały opisane w **publikacji nr 2**.

Ligand RANK (RANKL), kluczowy mediator resorpcji kości w stanach normalnych i patologicznych, ulega ekspresji, jako związany z błoną lub rozpuszczalna forma w różnych tkankach, w tym w kości. W normalnej przemianie kostnej i w przerzutach kostnych RANKL

stymuluje tworzenie i aktywność komórek usuwających kość, czyli osteoklastów przez wiązanie się z jego swoistym receptorem RANK na osteoklastach i ich komórkach progenitorowych. Procesy te są czasami zaburzane przez wiązanie RANKL z OPG, będącą rozpuszczalnym receptorem pułapkowym. Synteza tych substancji jest uwarunkowana również genetycznie a odpowiadające za nią geny wykazują polimorfizm.

Osteoblasty różnią się między sobą we względnej ekspresji RANKL w kwestii regulacji tworzenia osteoklastów i ich funkcji. Nadmiar RANKL wiąże się z RANK na prekursorach osteoklastów, umożliwiając niektórym czynnikom związanym z receptorem czynnika martwicy guza (TRAF) ich łączenie z RANK w domenie wewnątrzkomórkowej. Szlaki te następnie regulują fuzję prekursorów osteoklastów, różnicowanie ich w dojrzałe osteoklasty oraz w konsekwencji ich aktywację i przeżycie. Nadmiar OPG wiąże RANKL i zapobiega jego interakcji z RANK, zmniejszając liczbę i czynność osteoklastów.

Brak dobrze opracowanych danych oraz wieloczynnikowy charakter osteoporozy wymaga dalszych badań w celu zarówno poszukiwania jak i weryfikacji nowych czynników etiopatogenetycznych, a także retrospektywnej oceny istniejących danych. Analiza wyników dotychczasowych badań nie pozwala jeszcze na jednoznaczne określenie roli badanych cytokin w etiopatogenezie osteoporozy. Dlatego też w niniejszej pracy postanowiono określić rolę powiązań badanego ligandu z procesem osteoporozy pomenopauzalnej, gęstością kości i innymi parametrami osobowymi i klinicznymi.

Skoro główną rolą RANKL jest regulowanie metabolizmu kości przez kontrolowanie rozwoju osteoklastów, to większość badań polimorfizmu genu *RANKL* skupia się na związku pomiędzy genetyczną wariacją RANKL i chorobami kości, takimi jak osteoporoza.

RANKL eksponowany na powierzchni komórek preosteoblastycznych wiąże się z RANK na komórkach prekursora osteoblastów. Ligand RANK jest niezmiernie ważny dla różnicowania, a następnie fuzji do komórek wielojądrzastych, a także do aktywacji i przeżycia komórek osteoblastycznych. Zdolność preosteoblastycznych komórek do podtrzymywania rozwoju osteoklastów jest silnie zaburzona podczas różnicowania osteoblastu, głównie z powodu „down regulation" ze strony RANKL. Należy pamiętać, że, osteoblasty produkują osteoprotegerynę, która jest receptorem wabikowym dla RANKL.

Jedną z przyczyn osteoporozy są zaburzenia w metabolizmie kostnym, które podlegają regulacji przez trzy peptydy, tj. RANK, RANKL oraz OPG tworzące szlak sygnałowy RANK/RANKL/OPG. Poznanie polimorfizmów genetycznych wymienionych genów traktowanych, jako kandydujące, może ułatwić zrozumienie mechanizmu powstawania choroby kości, a przez to umożliwić wczesne diagnozowanie i wreszcie skuteczne leczenie.

Porównując częstości genotypu polimorfizmu *RANKL* C-643T w grupie kobiet z osteoporozą i w grupie kobiet o prawidłowych wartościach T-score z parametrami kostnymi nie wykazano istotnego związku tego polimorfizmu z wystąpieniem choroby. Nie zaobserwowano także wpływu badanego polimorfizmu na gęstość mineralną kości.

W grupie kobiet o prawidłowych wartościach T-score wykazano istotne statystycznie zależności między genotypem a niektórymi parametrami klinicznymi. W przypadku polimorfizmu *RANKL* C-643T wykazano istotną statystycznie zależność między poszczególnymi genotypami a masą ciała oraz BMI w grupie kobiet z osteoporozą. W przypadku kobiet o genotypie CC zaobserwowano wystąpienie niższej masy ciała oraz niższych wartości wskaźnika masy ciała BMI.

W badaniu polimorfizmu *RANKL* C-643T stwierdzono częstsze występowanie genotypu TT oraz niższą frekwencję genotypu CT zarówno w grupie kobiet chorych na osteoporozę względem kobiet zdrowych w wieku pomenopauzalnym, jak i zestawiając łącznie grupę kobiet chorych na osteopenię i osteoporozę z grupą o prawidłowych wartościach T-score. Ponadto porównując częstości genotypów TT i CT w grupie kobiet ze zdiagnozowaną osteopenią z ich częstościami w grupie kobiet w wieku rozrodczym stwierdzono, że różnice pomiędzy częstościami tych genotypów nie były już tak znaczące, przy czym nadal u chorych kobiet po menopauzie genotyp TT występował częściej, a heterozygota CT rzadziej. W wyniku analizy częstości występowania alleli zaobserwowano, że allel T pojawiał się częściej zarówno w grupie kobiet z osteoporozą, jaki i ogólnie w grupie pacjentek z T-score < -1 w porównaniu do osób z prawidłowymi wartościami tego współczynnika. W zestawieniu grupy osób chorych po menopauzie (T-score < -1) z grupą kontrolną w wieku reprodukcyjnym również allel T miał wyższą frekwencję. Obserwacje te zostały opisane w **publikacji nr 3**.

Wykazałem istnienie zależności między gęstością mineralną kości a wariantami genu *VDR*, kodującego receptor dla witaminy D. Fizjologiczny mechanizm wpływu polimorfizmu tego genu na gęstość mineralną kości jest jak dotąd nie w pełni poznany. Sugeruje się istnienie związku z zaburzeniem jelitowego wchłaniania jonów wapnia, a także zmianą tkankowej wrażliwości na witaminę D. Bardzo wczesny wpływ witaminy D na osteogenezę wykazano poprzez odkrycie receptora dla tej witaminy na komórkach mezenchymalnych. 1,25-dihydroksycholekalcyferol pobudza różnicowanie się osteoblastów, zwiększa ekspresję receptorów VDR na rozrastającej się kości oraz stymuluje syntezę kolagenu typu I. Można z tego wnosić, że rola witaminy D w procesach rozwojowych kości jest szczególnie ważna dla procesów mineralizacji kości. Wiadomo, że wpływ polimorfizmu na gęstość mineralną kości nie jest jednoznaczny i może interferować z innymi czynnikami tak o charakterze genetycznym, jak i środowiskowym. Zmobilizowało to świat nauki do zbadania skutków, jakie wywołują polimorfizmy między innymi

w obrębie genu *VDR* i jednocześnie rozpoczęto nową erę badań nad identyfikacją genów zaangażowanych w patogenezę osteoporozy.

Gen *VDR* od dawna jest uznawany, jako jeden z najważniejszych „genów kandydatów" zaangażowanych w rozwój osteoporozy. Dlatego udowodnienie genetycznej skłonności do osteoporozy może stać się jedną z metod wykorzystywanych w identyfikacji indywidualnych predyspozycji na tę chorobę. Należy zatem sprawdzać badaną populację w celu znalezienia jakichkolwiek związków między genotypem a fenotypem. Pojawiły się już publikacje, w których te korelacje są omawiane.

Dlatego też w swoich badaniach postanowiłem określić rolę powiązań badanego genu z procesem osteoporozy postmenopauzalnej, gęstością kości i innymi parametrami osobowymi i klinicznymi. Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu genu *VDR* kodującego receptor witaminy D_3 w grupie kobiet po menopauzie. Analizie został poddany między innymi związek badanego wariantu genetycznego w powiązaniu z parametrami obrotu kostnego oraz ocena znaczenia badanego polimorfizmu genetycznego w etiopatogenezie osteoporozy.

Niezwykłe rozbieżności odnotowano na porównanie wyników uzyskanych przez różne zespoły, śledzące polimorfizmy receptora witaminy D, w odniesieniu do warunków kostnych. Główną przyczyną jest liczba pacjentów objętych badaniami. Moje badania obejmowały 800 pacjentów. Należy również zauważyć, że oceniana populacja była bardzo jednorodna. Poza tym, kobiety ujęte w grupach badanych mieszkały na ocenianym obszarze kraju, praktycznie od urodzenia.

Mutacja genu może skutkować zmienioną aktywacją innych genów i/lub ich produktów posiadających istotną rolę w tych samych ścieżek metabolicznych. Takiego rodzaju efekt wykazano w badaniach, w których udział allelu B genu *VDR* wiązało się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia osteoporozy. Badania wykazały niskie wartości BMD od podporządkowania allelu B genu *VDR*. Te i inne obserwacje zostały opisane w **publikacji nr 4.** Potrzebne są dalsze badania w celu potwierdzenia ważności tych obserwacji. Uzyskane w tej kwestii wyniki wykazały, że polimorfizm 283G/A genu *VDR* jest czynnikiem warunkującym rozwój osteoporozy postmenopauzalnej. Należy go rozpatrywać jako marker zmian osteoporotycznych.

Od kilku lat wiadomo, że IL-17 ma właściwości prodestrukcyjne, stymuluje komórki nabłonkowe, śródbłonka i fibroblastyczne do wytwarzania chemokin, innych cytokin prozapalnych (np. IL-6 czy TNF-α), czynników i cytokin proangiogennych (np. IL-8), metaloproteinaz degradujących chrząstki, a także ważnych cytokin, promujących osteoklastogenezę i w rezultacie destrukcję kości.

Erozja tkanki kostnej realizowana jest dwiema drogami: od strony jamy szpikowej, powodując osteoporozę okołostawową i powstawanie geod, oraz od strony jamy stawowej, czego

konsekwencją jest tworzenie nadżerek kostnych. Główną przyczyną resorpcji kości jest nadmiar cytokin, które promują osteoklastogenezę indukowaną przez RANKL, w tym IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-7 i oczywiście IL-17, przy równoczesnym niedoborze cytokin hamujących ten proces. IL-17 nie tylko zwiększa wytwarzanie osteoklastów inicjowanych przez RANKL, ale ma również zdolność indukowania tego procesu w sposób niezależny. Najnowsze badania wykazały, że IL-17 pobudza osteoblasty do syntezy prostaglandyny E2 i ekspresji RANK, w następstwie czego dochodzi do indukcji osteoklastogenezy. Prawdopodobnie IL-17 jest odpowiedzialna za nasiloną resorpcję tkanki kostnej.

Dlatego też w niniejszej pracy postanowiłem określić rolę powiązań genu *IL-17* z procesem osteoporozy postmenopauzalnej, gęstością kości i innymi parametrami osobowymi i klinicznymi. Celem pracy było zbadanie częstości występowania polimorfizmu genu *IL-17A* kodującego interleukinę 17 w grupie kobiet po menopauzie. Analizie poddano związek badanego wariantu genetycznego w powiązaniu z zaawansowaniem zmian kostnych, a także powiązanie z parametrami obrotu kostnego oraz ocena znaczenia badanych polimorfizmów genetycznych w etiopatogenezie osteoporozy.

W badaniach nie stwierdziłem istotnych zmian związanych z wpływem badanego polimorfizmu dla *IL-17*. Wykazałem jednak dość wyraźną tendencje do wpływu tej cytokiny na hamowanie osteoporozy u osób z polimorficznym homozygotycznym genotypem AA. Jest to dobra wiadomość w tym sensie, że rola IL-17 w gospodarce kostnej może wiązać się z wpływem negatywnym. W niniejszych badaniach starano się ocenić potencjalną rolę IL-17 jako mediatora przebudowy kości, w tym osteoklastogenezy.

Pacjenci ze zdiagnozowaną chorobą stawów i kości, wykazują zwiększoną aktywność osteoklastów i osteoklastów wraz z zaburzeniami remodelingu kostnego. Wiadomo, że tkanka kostna erozji następuje dwie drogi z jamy szpikowej skutkujące osteoporoza, oraz z jamy stawu, co prowadzi do erozji kości. W normalnych warunkach, RANKL występuje w osteoblasty, natomiast w warunkach patologicznych, źródła inne komórki. Główną przyczyną resorpcji kości jest nadmiar cytokin (w tym IL-17), promowanie osteoklastów poprzez indukcję RANKL, towarzyszy niedobór cytokin hamujących takiego procesu. Z drugiej strony, IL-17 nie tylko zwiększa wytwarzanie osteoklastów, zainicjowanej przez RANKL, ale może również wywoływać taki sposób niezależny.

W związku z tym badano rolę genu *IL-17* ocenie w procesu osteoporozy pomenopauzalnej w kontekście gęstość kości, a także innymi parametrami osobistymi i klinicznymi. Celem było zbadanie częstości występowania rs2275913 (-197G>A) polimorfizmu genu *IL-17A* kodującego interleukinę 17 u kobiet po menopauzie. Przedmiotem analizy była relacja ocenianego wariantu genetycznego na etapie zmian kostnych, a także powiązanie z kostnych parametrów obrotowych i oceny roli polimorfizmu genetycznego badanego w etiopatogenezie osteoporozy.

Wykazałem ostatecznie **(publikacja nr 5)**, że polimorfizm −197G/A genu *IL-17* może wpływać na rozwój osteoporozy postmenopauzalnej. Moje wyniki sugerują, że polimorfizm -197G>A genu *IL-17*, może być uznany za genetyczny czynnik osteoporozy pomenopauzalnej. Polimorfizm Ten może mieć wpływ na gęstość mineralną kości i wartości T-score w młodych kobiet i kobiet po menopauzie.

Wykazałem, że omentyna-1 (białko genu *ITLN-1*) stymuluje proliferację ludzkich osteoblastów oraz, że szlak sygnałowy PI3K/Akt jest kluczowym mediatorem takiego wpływu. Ponadto, omentyna-1 odgrywa krytyczną rolę w hamowaniu różnicowania osteoblastów z komórek mięśni gładkich. Kilka adipokin indukuje proliferację osteoblastów, co wskazuje między innymi na ścisły związek między omentyną-1 i osteoblastami. Stwierdzono również, że omentyna-1 łagodzi utratę kości, stymuluje proliferację oraz hamuje różnicowanie osteoblastów.

Chociaż biologiczna funkcja omentyny-1 w dużej mierze jest nieznana, to ostatnie doniesienia wykazały, że między innymi promuje ona transport glukozy w adipocytach czy też indukuje rozszerzanie naczyń krwionośnych. Prawdopodobnie omentyna-1 jest zaangażowana w procesy resorpcji tkanki kostnej. Wykazano między innymi, że poziomy omentyny-1 miały odwrotną korelację z BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa w irańskich kobiet po menopauzie. Dokładne poznanie mechanizmów jej działania być może pozwoli na zastosowanie nowych metod leczenia. Aby lepiej zrozumieć rolę omentyny-1 w przemiany mineralnej kości, badania koncentrujące się na BMD i złamaniach osteoporotycznych uznałem, że badania te należy kontynuować.

Ponieważ omentyna-1 bezpośrednio reguluje ekspresję OPG i RANKL w osteoblastach *in vitro*, to zapewne może odgrywać ważną rolę w przebudowie kości w warunkach *in vivo*. Wykazano, że omentyna-1 stymuluje uwalnianie OPG i hamuje wytwarzanie RANKL w osteoblastach za pośrednictwem sygnalizacji szlaku PI3K-Akt *in vitro*. Okazało się ponadto, że omentyna-1 hamuje różnicowanie osteoblastów, co może wynikać z hamowania ekspresji osteokalcyny i mineralizacji macierzy, ale okazało się, że omentyna-1 również stymuluje proliferację osteoblastów. Jeśli jest prawdą, że omentyna-1 jest ważnym regulatorem w ludzkiej przebudowie kości, promując proliferację ludzkich osteoblastów w szlaku sygnalizacyjnym PI3K/Akt, to wszelkie zaburzenia w jej produkcji i dystrybucji mogą mieć istotne konsekwencje dla organizmu. Dlatego poznanie metabolizmu kostnego z udziałem omentyny pozwoli nam na lepsze zrozumienie szlaków sygnalizacyjnych zaangażowanych w obrót kostny. Dalsze badanie omentyny-1 w powiązaniu z osteoblastami być może ujawnią nam nowy cel w zapobieganiu i leczeniu osteoporozy.

W moich badaniach wykazałem, że nosicielstwo genotypu TT genu *ITLN-1* związane jest z obniżeniem wartości T-score oraz wartości BMD odcinka lędźwiowego kręgosłupa, co koreluje ze zwiększonym ryzykiem występowania złamań **(publikacja nr. 6)**.

Badania zaprezentowane w niniejszej pracy potwierdziły, że występuje statystycznie istotny związek pomiędzy wyższą masą ciała i wartościami BMI a także wyższymi wartościami BMD i mniejszym ryzykiem wystąpienia osteoporozy. Badania te wykazały również statystycznie istotną korelację pomiędzy niską masą urodzeniową a niskimi wartościami BMD i występowaniem osteoporozy u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Jednak wyniki jakie uzyskano pozostają nadal dyskusyjne. Nie pozwalają między innymi na jednoznaczne określenie, jaki jest wpływ polimorfizmów genu *OPG* na skłonność do wystąpienia osteoporozy. Również w niniejszej pracy trudno określić, czy któryś z badanych polimorfizmów *OPG* przeważał w grupach z osteoporozą.

Biorąc pod uwagę wyniki tej pracy oraz istniejący stan wiedzy, można przypuszczać z dużym prawdopodobieństwem, że polimorfizm -950T/C genu *OPG* może stać się kandydatem markerów genetycznych odpowiedzialnych za rozwój osteoporozy. Co więcej, wykazano w tym opracowaniu, że polimorfizm 283G/A genu *VDR* oraz polimorfizm -197G/A genu *IL-17* mogą być czynnikiem warunkującym rozwój osteoporozy postmenopauzalnej.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć

Moje zainteresowania naukowe obejmują zagadnienia dotyczące badań doświadczalnych i klinicznych. Obydwa obejmują zagadnienia związane z problemami zawodowymi tj. rozwojem płodu i stanem poporodowym noworodka, zarówno u zwierząt, jak i u kobiet narażonych lub poddanych działaniu różnorodnych niekorzystnych czynników środowiskowych.

W pierwszym okresie pracując dodatkowo jako wolontariusz w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (SlAM) w okresie od 1996 do nadal, oraz w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Wydziału Lekarskiego w Zabrzu SUM (2007 - 2010) przeprowadziłem wraz z innymi szereg doświadczeń mających na celu ocenę wpływu czynników środowiska, w tym metale ciężkie i neurotoksyny, stosowanych w okresie płodowym i pozapłodowym u ssaków na dalszy rozwój doświadczalnych zwierząt (szczurów) oraz funkcję ośrodkowego układu nerwowego (OUN) dorosłych osobników (toksykologia rozwojowa).

Po ukończeniu studiów obowiązki zawodowe starałem połączyć się z ciągłym rozwojem naukowym. W tym czasie moje zainteresowania naukowe związane były z procesami nowotworzenia. Chciałem poznać znane mechanizmy odpowiedzialne za rozwój nowotworu oraz brać udział w badaniach, które mogłyby być związane z zapobieganiem progresji nowotworu. Jedną z hipotez, które sugerowały możliwość zahamowania nowotworzenia były badania związane z tzw.

angiogenezą. Jak wiadomo jest to proces tworzenia nowych naczyń na bazie istniejącego łożyska naczyniowego. Angiogeneza jest niezbędnym procesem dla wzrostu guza, bo jak wiadomo odżywianie na drodze dyfuzyjnej może odnosić się do guzów, których średnica w zasadzie nie przekracza 2 mm. Realizując swoje cele naukowe brałem udział w badaniach dotyczących angiogenezy w nowotworach mózgu. Efektem tych prac są dwie publikacje. Wykorzystując przeciwciało monoklonalne CD31 lokalizowaliśmy immunohistochemicznie komórki śródbłonka, aby ocenić przerzuty nowotworowe do mózgu. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano 6-krotnie wyższe wskaźniki nasilenia angiogenezy podczas przerzutów, w porównaniu z prawidłową tkanką nerwową. Największe zagęszczenie naczyń krwionośnych stwierdzono w strefach nowotworu charakteryzującego się obfitym podścieliskiem łącznotkankowym. Stwierdzone w tych badaniach występowanie obszarów guza o wysokiej gęstości unaczynienia ulokowanego w dobrze rozbudowanym zrębie łącznotkankowym sugeruje istnienie silnego związku czynnościowego komórek śródbłonka z elementami macierzy międzykomórkowej. Jeśli ta teza zostanie uwiarygodniona, to należy oczekiwać, że ocena angiogenezy w guzach, szczególnie litych oraz analiza elementów anatomicznych i histologicznych okaże się uzasadniona. Może to bowiem mieć związek z opracowaniem terapii antyangiogennej, na przykład poprzez stosowanie humanizowanych przeciwciał monoklonalnych do czynników angiogennych, takich jak VEGF.

Kolejnym obszarem moich zainteresowań było toksyczne oddziaływanie mikro- oraz makroelementów zawartych w pokarmie jak też w środowisku naturalnym i ich wpływ na organizmy żywe. Na podstawie uzyskanych wyników z przeprowadzanych badań opublikowałem rozdział w monogragfii dotyczący ochronnego wpływu proekspozycji cynkiem na toksyczne efekty działania kadmu u szczurów. Praca ta ukazała się w 2009 roku jako rozdział w 11 tomie dużego opracowania wydanego przez Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska.

Głównym źródłem kadmu w środowisku jest przemysł. Jest on stosowany do produkcji baterii, stopów z miedzią stosowanych w elektronice, czy w reaktorach jądrowych, gdzie jest używane służy jako regulator ilości powstających neutronów z rozpadu uranu. Kadm jest również stosowany jako stabilizator w procesie wytwarzania tworzyw sztucznych i barwników a chlorek kadmu jest stosowane jako pestycyd w rolnictwie. Kadm występuje również w produkcji zawiesin przemysłowych. Z tego też powodu WHO umieściła kadm na pierwszym miejscu w rankingu metali toksycznych z powodu wyjątkowych właściwościach toksycznych.

Całkowita ilość kadmu zgromadzonego w nerkach 50-letniego mieszkańca Europy czy Ameryki Północnej jest szacowana na 15÷50 mg/kg. Najwyższe niebezpieczeństwo zatrucia kadmem dotyczy osób zaangażowanych w produkcji i przetwórstwie tego metalu, a także palaczy tytoniu. Po wypaleniu 20 papierosów dziennie wchłanianie kadmu wynosi od 3,6 do 6,0 μg na

dzień, a niepalących nawet do 2,4 μg na dzień. Ponadto kadm jest wchłaniany przez płuca w 10÷50% dawki.

Celem badań była ocena wpływu pojedynczej dawki cynku na metabolizm kwasów nukleinowych i białek u dorosłych szczurów oraz poddanych działaniu kadmu w rozwoju prenatalnym. Znakowana trytem tymidyna została użyta w celu dokonania oceny transformacji DNA, oznakowaną trytem urydynę wykorzystano w celu dokonania oceny przemian RNA a oznakowaną trytem glicynę wykorzystano w celu dokonania oceny przemian białek w tkankach szczurów potomnych, które zostały poddane działaniu kadmu i cynku w rozwoju macicznym (prenatalnym). Eksperymenty prowadzono na samicach szczurów, ich noworodków oraz 6-7 tygodniowego potomstwa płci męskiej.

Przeprowadzone eksperymenty pozwalają sformułować dwa podstawowe wnioski:

Pojedyncza dawka cynku podanego prenatalnie zmniejsza ryzyko u szczurów na wpływ kadmu, głównie na transformację DNA, a także (chociaż w mniejszym stopniu), na RNA i białka w organizmach ssaków.

Badania potwierdziły ochronny wpływ cynku wobec toksycznego działania kadmu na ssaki.

Wyniki badań zaowocowały rozprawą doktorską pt.: „Wpływ pre-ekspozycji cynkiem na toksyczne efekty działania kadmu u szczurów". Podsumowując rozprawę doktorską wykazałem co następuje:

Kadm jest jednym z najbardziej toksycznych i niebezpiecznych dla zdrowia ludzkiego metalem. Stosowany jest szeroko w przemyśle oraz w produkcji przedmiotów i urządzeń powszechnego użytku, przeto z łatwością może prowadzić do narażenia nań ludzi. Wchłania się głównie drogą wziewną a także poprzez przewód pokarmowy. Po dostaniu się do organizmu odkłada się w różnych narządach zaburzając ich funkcję oraz powodując liczne zmiany morfologiczne i biochemiczne. Szczególnie wrażliwe na toksyczne działanie kadmu są rozwijające się i młode organizmy. Ssaki wytworzyły swoiste mechanizmy obronne przed toksycznym działaniem kadmu. Jednym z głównych jest metalotioneina, białko składające się w około 30% z aminokwasu cysteiny wiążącej i kumulującej kadm. Kadm uszkadza syntezę DNA, RNA i tym samym wielu białek enzymatycznych.

Wykazano, że niektóre metale głównie cynk i miedź konkurują z kadmem o miejsca wiązań w strukturach komórkowych i białkach, w tym metalotioneinie. Co więcej, cynk na przykład może zapobiegać wchłanianiu, magazynowaniu a także efektom toksycznym kadmu na organizmy ssaków.

W świetle powyższego celem pracy było zbadanie wpływu jednorazowej dawki cynku na metabolizm kwasów nukleinowych i białek u dorosłych szczurów narażonych na kadm w trakcie rozwoju śródmacicznego. W związku z powyższym do oceny przemian DNA użyto znakowaną

trytem tymidynę oraz celem oceny przemian RNA znakowaną trytem urydynę a także znakowaną trytem glicynę celem oceny przemian białek w tkankach potomnych szczurów, które poddane były działaniu kadmu i cynku w okresie rozwoju śródmacicznego (prenatalnego).

Doświadczenia wykonano na ciężarnych szczurzych samicach, które podzielono na cztery grupy jak następuje: grupa pierwsza szczurzyc otrzymała roztwór 0,9% NaCl 1,0 ml/kg IP przed zapłodnieniem a w trakcie ciąży piła wodę, grupa druga otrzymała przed zapłodnieniem jednorazową iniekcję siarczanu cynku ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) 10,0 mg/kg IP i w trakcie ciąży piły wodę, grupa trzecia przed zapłodnieniem otrzymała roztwór 0,9% NaCl 1,0 ml/kg i w trakcie ciąży piła wodny roztwór octanu kadmu ($Cd(CH_3COO)_2$) o stężeniu metalu 50 ppm oraz grupa czwarta, która przed zapłodnieniem otrzymała iniekcję siarczanu cynku 10,0 mg/kg IP i w trakcie ciąży piła roztwór octanu kadmu o stężeniu metalu 50 ppm.

Potomne szczury płci męskiej wszystkich czterech grup otrzymały iniekcję 6-^{3}H-tymidyny 1μCi/kg IP masy ciała, lub iniekcję 6-^{3}H-urydyny 1μCi/kg IP lub też 6-^{3}H-glicyny również 1μCi/kg IP masy ciała. Po czterech godzinach od podania izotopów zwierzęta uśmiercono przez zgilotynowanie i w temperaturze 0° C pobierano 6 części mózgu oraz 14 fragmentów tkanek lub narządów obwodowych. W pobranych próbkach oznaczano radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym a wyniki po odliczeniu tła i wydajności licznika wyrażano w liczbie rozpadów na 100 mg świeżej tkanki (DPM/100 mg). Uzyskane dane poddano analizie statystycznej.

Wyniki przedstawionych badań wykazały, że jednorazowa iniekcja cynku przed prenatalnym narażeniem szczurów na kadm zapobiega toksycznym efektom tego drugiego metalu głównie na przemiany DNA a także (chociaż w mniejszym stopniu) RNA i białek w organizmach potomnych zwierząt. Niniejsze badania potwierdziły ochronny wpływ cynku przed toksycznym działaniem kadmu u ssaków.

Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników stwierdziłem, że narażenie szczurów w okresie płodowym, to jest od chwili poczęcia do porodu (21 dni) na kadm w stężeniu 50 ppm zawartego w pitnej wodzie, spożywany przez szczurzyce od 1 dnia ciąży do porodu, wywołuje u dorosłego potomstwa wyraźne zaburzenia metaboliczne w ośrodkowym układzie nerwowym, jak też w tkankach obwodowych mierzone stopniem wychwytu (^{3}H)-tymidyny, (^{3}H)-urydyny i (^{3}H)-glicyny. Jednorazowa iniekcja cynku 10 mg/kg szczurzycom w dniu zapłodnienia zapobiega obserwowanym niekorzystnym efektom działania kadmu, wskazując na jego ochronną rolę, przed toksycznym działaniem wspomnianego metalu. Wyniki badań opublikowano w **Pol. J. Environ. Stud. 2010; 19: 1377-1382**.

Opisane powyżej badania poszerzone o model doświadczalnej toksykologii rozwojowej kontynuowałem następnie w Katedrze Farmakologii w Zabrzu SUM. Badania te dotyczyły

teratogennego działania niektórych pierwiastków oraz wybranych leków co w sposób ścisły wiązało się z zainteresowaniami w obszarze mojej specjalności klinicznej.

1. **Boroń D.**, Konecki J., Batoryna O., Jośko J., Drab J., Szkilnik R., Rycerski W., Gorczyca P., Brus R.: Effect of zinc on [3H]thymidine, [3H]uridine and [3H]glicine incorporation in the tissues of rats prenatally exposured to cadmium. Pol. J. Environm. Stud. 2010; 19: 1377-1382. **IF – 0,543; KBN/MNiSW - 13**. *(praca oryginalna).*

W kolejnych przeprowadzonych eksperymentach zająłem się wpływem prenatalnego narażenia szczurów manganem na czynność niektórych ośrodkowych układów neuroprzekaźnikowych u dorosłych zwierząt. Wraz z innymi wykazałem, iż narażenie szczurów na mangan w okresie prenatalnym tj. od dnia poczęcia do urodzenia (21 dni) poprzez stosowanie metalu w pitnej wodzie w stężeniu 10000 ppm ciężarnym szczurzycom powoduje uszkodzenie ośrodkowego układu dopaminergicznego u dorosłych szczurów oceniane metodami biochemicznymi (oznaczenie metodą HPLC zawartości dopaminy) a także behawioralnymi. Co więcej, takie narażenie na mangan nasila niekorzystne objawy obserwowane w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona (wywołanym podaniem domózgowym trzeciego dnia życia szczurów neurotoksyny 6-hydroksydopaminy) oceniane również metodami biochemicznymi i behawioralnymi u dorosłego potomstwa. Badania mają znaczenie poznawcze wskazujące, że narażenie na środowiskowy mangan może przyspieszać lub pogłębiać rozwój choroby Parkinsona. Wyniki badań opublikowano w **Naurotoxicity Research 2011; 19: 536-543**.

Kontynuując badania dotyczące toksycznego prenatalnego działania manganu wykazałem wraz z innymi, że narażenie wspomnianym metalem jak wyżej znamiennie zwiększa zawartość histaminy w niektórych częściach OUN dorosłego potomstwa (głównie w podwzgórzu, korze mózgowej i zakręcie hipokampa). Zmiany zawartości histaminy w badanych częściach mózgu były znamiennie nasilone u zwierząt z doświadczalnym modelem choroby Parkinsona opisanym wyżej. Powyższe wyniki wydają się świadczyć, że po uszkodzeniu ośrodkowego układu dopaminowego zarówno metalami ciężkimi – manganem, jak też neurotoksyną – 6-hydroksydopaminą nasila funkcję ośrodkowego układu histaminowego u dorosłego potomstwa, który jak się wydaje częściowo rekompensuje (zastępuje) funkcję niedoczynnego układu dopaminowego w OUN. Wyniki badań opublikowano w **Neurotoxicity Research 2012; 21: 143-148**.

Stwierdzając istotną rolę układu histaminowego w OUN oraz jego interakcję z układem dopaminowym w kolejnych doświadczeniach postanowiono zbadać współdziałanie w mózgu wymienionego układu z innymi niezmiennie ważnym układem serotoninowym, którego zaburzenia leżą u podstawy wielu schorzeń w tym depresji. W badaniach tych posłużyłem się neurotoksyną ośrodkowego układu serotoninowego, a mianowicie 5,7-dihydroksytryptaniną. I tak wykazałem, że

ma miejsce zniszczenie ośrodkowego układu serotoninowego u dorosłych zwierząt. Towarzyszy temu zmniejszenie zawartości histaminy w mózgu oraz zmiany w zachowaniu się zwierząt oceniane doświadczalnymi metodami behawioralnymi. Powyższe świadczy o wzajemnej funkcjonalnej interakcji między ośrodkowym układem serotoninowym i histaminowym w mózgu ssaków. Wyniki opublikowano w **Neurotoxicity Research 2011; 20: 103-108**.

1. Nowak P, Bojanek K, Szkilnik R, Jośko J, **Boroń D**, Adwent M, Gorczyca P, Kostrzewa RM, Brus R.: Ontogenetic exposure of rats to pre- and postnatal manganese enhances behavioral impairments produced by perinatal 6-hydroxydopamine. Neurotox. Res. 2011; 19: 536-543. **IF – 3,514; KBN/MNiSW - 25**. *(praca oryginalna)*.
2. Brus R, Jochem J, Nowak P, Adwent M, **Boroń D**, Brus H, Kostrzewa RM.: Effect of pre- and postnatal manganese exposure on brain histamine content in a rodent model of Parkinson's disease. Neurotox. Res. 2012; 21: 143-148. **IF – 2,865; KBN/MNiSW - 25**. *(praca oryginalna)*.
3. Jośko J, Drab J, Jochem J, Nowak P, Szkilnik R, Korossy-Mruk E, **Boroń D**, Kostrzewa RM, Brus H, Brus R.: Ontogenetic serotoninergic lesioning alters histaminergic activity in rats in adulthood. Neurotox Res. 2011; 20: 103-108. **IF – 3,514; KBN/MNiSW - 25**. *(praca oryginalna)*.

Kontynuując powyższe badania na modelu zwierzęcym, oceniałem jak zmiana funkcji ośrodkowego układu serotonionowego i histaminowego wpływa na procesy energetyczne w mózgu dorosłych szczurów. Ponieważ głównym źródłem energii w OUN ssaków jest glukoza, w badaniach posłużono się znakowaną trytem glukozą (^{3}H-glukoza) oceniając jej wychwyt przez poszczególne części mózgu dorosłych ssaków. W badaniach posłużono się modelem doświadczalnym tj. dorosłymi szczurami z uszkodzonym w okresie noworodkowym ośrodkowym układem serotoninowym domózgowym podaniem w trzecim dniu życia neurotoksyny 5,7-dihydroksytryptaminy.

W przeprowadzonych eksperymentach analiza wyników wykazała , że u dorosłych szczurów, że zniszczonym w okresie noworodkowym ośrodkowym układem serotoninowym znaczne zwiększenie wychwytu (^{3}H)-glukozy praktycznie we wszystkich badanych częściach mózgu w tym największy w korze mózgowej o około 88%, a w innych częściach (podwzgórze, wzgórze, most, prążkowie i móżdżek) w granicach od 35% do 56%. Należy dodać, że podany wcześniej antagonista ośrodkowych receptorów histaminowych, tj. H^3- tioperamid zapobiegał poważnym efektom, we wszystkich badanych częściach mózgu. Powyższe świadczy o funkcjonalnym powiązaniu procesów energetycznych ośrodkowego układu serotoninowego i histamionowego w mózgu ssaków. Badania mają znaczenie poznawcze i zostały opublikowane w **Neurotoxicity Research 2011; 20: 93-96**.

Podobne efekty na procesy energetyczne oceniane w modelu doświadczalnym opisanym wyżej, lecz znacznie słabsze wywierała cymetydyna - antagonista ośrodkowego receptora H2 oraz S(+)chlorfeniramina - antagonista ośrodkowego receptora H1. Wyniki tych badań opublikowano w **Annales Academiae Medicae Silesiensis 2012; 66: 13-19**.

Wszystkie powyższe badania doświadczalne wynikały z moich zainteresowań jako położnika i ginekologa szukając odpowiedzi jak narażanie na różne czynniki środowiska (metale, neurotoksyny) w okresie rozwoju płodowego, jak też po urodzeniu rzutują na funkcję głównie ośrodkowego układu nerwowego dorosłego potomstwa ssaków w określonych doświadczalnych modelach zwierzęcych.

1. Jośko J., Drab J., Nowak P., Szkilnik R., Korossy E., **Boroń D.**, Brus H., Kostrzewa R.M., Brus R.: Thioperamide, an H3 receptor antagonist prevents [3H]glucose uptake in brain of adult rats lesioned as neonates with 5,7-dihydroxytryptamine. Neurotox. Res. 2011; 20: 93-96. **IF – 3,514; KBN/MNiSW - 25**. *(praca oryginalna)*.
2. Jośko J., Drab J., Nowak P., Szkilnik R., **Boroń D.**, Elwart M., Konecki J., Brus H., Brus R.: Effect of chlorpheniramine and cimetidine, a histamine H1 and H2 antagonist on (3H)glucose uptake in the brain of adult rats lesioned with 5,7-dihydroxytryptamine as neonates. Ann. Acad. Med. Siles. 2012; 66: 13–19. **KBN/MNiSW - 4**. *(praca oryginalna)*.

Podsumowując, mój łączny dorobek naukowy obejmuje **17** publikacji pełnotekstowych oryginalnych o współczynniku oddziaływania **IF=26.475 (KBN/MNiSW = 299 pkt.)**. W **8** publikacjach jestem pierwszym autorem.

W oparciu o listę *Journal Citation Reports* liczba cytowań moich publikacji według bazy *Web of Science* wynosi: **17;** Indeks Hirscha według bazy *Web of Science* wynosi **3,** liczba cytowań według bazy *Scopus* = **12**; Indeks Hirscha według bazy *Scopus* wynosi **2;** liczba artykułów cytowanych **6**.