

## Autoreferat

**1. Imię i Nazwisko:** Adam Przybyłkowski

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

1999	tytuł lekarza, II Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Warszawie
2005	tytuł specjalisty w dziedzinie chorób wewnętrznych, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
2006	stopień doktora nauk medycznych, Akademia Medyczna w Warszawie, tytuł rozprawy: „Cyklooksygenazy w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona wywołanym 1 metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną u myszy”
2009	tytuł specjalisty w dziedzinie farmakologii klinicznej, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie
2011	tytuł specjalisty w dziedzinie gastroenterologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:**

1999 - nadal	Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
2000 - 2005	Klinika Gastroenterologii i Chorób Metabolicznych, Instytut Żywności i Żywienia w Warszawie
2005 - 2006	Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich i Kości, Centrum Onkologii Instytut Marii Skłodowskiej Curie w Warszawie
2007 - 2009	Poradnia Gastroenterologiczna i Oddział Chorób Wewnętrznych, Wojewódzki Szpital Chirurgii Urazowej im. Św. Anny w Warszawie
2011 - nadal	Oddział Gastroenterologiczny, NZOZ Endoterapia, Warszawa

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

Cykl publikacji na temat choroby Wilsona (IF łącznie 8,405).

Przybyłkowski A, Gromadzka G, Wawer A, Grygorowicz T, Cybulska A, Członkowska A. Intestinal Expression of Metal Transporters in Wilson's disease. *Biometals*. 2013; 26: 925-34. doi: 10.1007/s10534-013-9668-5 (IF 3,284)

Przybyłkowski A, Gromadzka G, Wierzchowska A, Chabik G, Litwin T, Członkowska A. Liver cirrhosis in patients newly diagnosed with neurological phenotype of Wilson's disease. *Functional Neurology* 2014 Mar 5: 1-7 [Epub ahead of print] (IF 1,037)

Przybyłkowski A, Gromadzka G, Członkowska A. Polymorphisms of metal transporters genes: *DMT1* and *ATP7A* in Wilson's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2014; 28: 8-12. doi: 10.1016/j.jtemb.2013.08.002. Epub 2013 Aug 25 (IF 1,959)

Przybyłkowski A, Gromadzka G, Wawer A, Bulska E, Jabłonka-Salach K, Grygorowicz T, Szejder-Pacholek A, Członkowski A. Neurochemical and Behavioral Characteristics of Toxic Milk Mice: An Animal Model of Wilson's Disease. *Neurochem Res*. 2013; 38: 2037-45. doi: 10.1007/s11064-013-1111-3 (IF 2,125)

Choroba Wilsona (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #277900, chW) czyli zwyrodnienie wątrobowo-soczewkowe jest schorzeniem uwarunkowanym genetycznie, dziedziczonym w sposób autosomalny recesywny. Pierwszy wyczerpujący opis chorych na zwyrodnienie wątrobowo-soczewkowe przedstawił brytyjski lekarz Samuel Kinnier Wilson w 1912 roku na łamach czasopisma *Brain*. Częstość występowania choroby szacuje się na 1:30000 osób. Podłożem choroby jest obecność mutacji w obu allelach genu *ATP7B* kodującego białko adenozynotrifosfatazę 7B (ATP7B). ATP7B jest transporterem miedzi, odpowiada między innymi za wydalanie tego pierwiastka z hepatocytów do żółci. Jest to główny sposób usuwania miedzi z organizmu. Następstwem dysfunkcji ATP7B u chorych na chW jest patologiczne nagromadzenie miedzi w wątrobie i w innych narządach. Nadmiar miedzi powoduje uszkodzenie komórek, upośledzenie ich funkcji i wystąpienie objawów klinicznych. W zależności od dominujących symptomów wyróżnia się różne postacie kliniczne choroby: wątrobową (ok. 45% chorych), neurologiczną (ok. 35% chorych) i psychiatryczną (ok. 10% chorych). Rzadko chW manifestuje się niedokrwistością hemolityczną, zespołem Fanconiego, zapaleniem trzustki, niedoczynnością tarczycy i przytarczyc czy kardiomiopatią. Rokowanie u chorych nieleczonych jest złe. Wcześnie rozpoczęte leczenie poprawia przeżywalność i powoduje ustępowanie większości objawów. Normalizację bilansu miedzi osiąga się przy pomocy leków zmniejszających wchłanianie miedzi z przewodu pokarmowego i/lub nasilających jej wydalanie. W uzasadnionych przypadkach konieczne jest przeszczepienie wątroby.

U chorych na chorobę Wilsona wydalanie miedzi z moczem jest wzmożone, co prawdopodobnie jest jednym z mechanizmów kompensujących upośledzone wydalanie miedzi z żółcią. W publikacji „Intestinal expression of metal transporters in Wilson’s disease” przedstawiono wyniki badań, których celem było poszukiwanie innych zmian adaptacyjnych u chorych na chW. Oceniano ekspresję transporterów metali w wycinkach z dwunastnicy pobranych od osób chorych na chW i osób zdrowych w celu uzyskania odpowiedzi na pytanie czy dysfunkcja białka ATP7B u chorych na chW wpływa na białka transportujące miedź w jelicie. Wykazano, że ekspresja transportera miedzi 1 (copper transporter 1, CTR1) w jelicie cienkim jest niższa u chorych, a adenozynotrifosfatazy 7A (ATP7A) wyższa w porównaniu do osób zdrowych. Te wyniki dostarczają nowych informacji na temat metabolizmu miedzi u ludzi. Dotychczas nie rozstrzygnięto jednoznacznie, jaki mechanizm u ludzi odpowiada za transport miedzi ze światła przewodu pokarmowego do enterocytów. Sugeruje się udział endocytozy, białka CTR1 oraz transporterów dla anionów. Opisane w omawianej publikacji różnice w ekspresji białka CTR1 w nabłonku jelita cienkiego między osobami chorymi na chW a osobami zdrowymi, jak też zmiany ekspresji tego białka w następstwie leczenia mającego na celu zmniejszenie ilości miedzi w organizmie wskazują na

kluczową rolę CTR1 w transporcie miedzi w enterocytach. Ponadto w prezentowanej publikacji, po raz pierwszy przedstawiono wyniki badań immunohistochemicznych, których celem było określenie lokalizacji CTR1 w komórkach nabłonka jelita u ludzi. Uwidoczniono CTR1 przy błonie luminalnej enterocytów i w mniejszej ilości wewnątrzkomórkowo. Taka lokalizacja może potwierdzać hipotezę na temat udziału CTR1 w przenoszeniu miedzi do wnętrza enterocytów.

Analizując stężenie matrycowego RNA (mRNA) dla CTR1 i ATP7A w nabłonku jelita cienkiego wykazano obniżoną produkcję mRNA dla CTR1 oraz podwyższoną dla ATP7A u chorych na chW. Jest to pośredni dowód na obecność mechanizmu kontrolującego transport miedzi na poziomie ekspresji genów kodujących białka, których funkcją jest przenoszenie miedzi przez błony biologiczne. Powyższe wyniki zmieniają powszechny pogląd na temat regulacji tych białek. Za główny czynnik determinujący ekspresję transporterów miedzi w jelicie uważano dostępność tego pierwiastka w diecie. Ponadto zakładano, że kontrola ekspresji CTR1 w enterocytach odbywa się po translacji.

Przedstawione w publikacji informacje na temat zmian ekspresji białek transportujących miedź mogą być istotne nie tylko w kontekście patogenezy choroby Wilsona. CTR1, ATP7A oraz ATP7B transportują cytostatyki - pochodne platyny (cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna), stosowane w leczeniu chorób nowotworowych. Zmniejszenie ekspresji CTR1 i wzrost produkcji CuATPaz w komórkach nowotworowych wiąże się z powstawaniem oporności na te leki. Na Uniwersytecie w Teksasie w MD Anderson Cancer Center rozpoczęto badania kliniczne I fazy oceniające skuteczność trientyny (leku nasilającego wydalanie miedzi) w połączeniu z karboplatiną w leczeniu raka jajnika. Założono, że zmniejszenie zapasów miedzi w organizmie spowoduje wzrost ekspresji CTR1 w komórkach guza i w ten sposób zmniejszy ryzyko powstawania oporności na leki.

Naturalny przebieg chW nie jest w pełni poznany. Panuje pogląd, że uszkodzenie układu nerwowego jest wtórne do uszkodzenia wątroby. Sugeruje się, że po przekroczeniu zdolności spichrzeniowych wątroby i na skutek uszkodzenia hepatocytów dochodzi do uwalniania miedzi, która gromadzi się w innych narządach, również w mózgu. W artykule „Liver cirrhosis in patients newly diagnosed with neurological phenotype of Wilson’s disease” opisano częstość występowania klinicznych objawów marskości wątroby w chwili rozpoznania chW. Porównano częstość ich występowania u pacjentów z różnymi postaciami klinicznymi choroby: wątrobową, neurologiczną oraz u pacjentów bezobjawowych (presymptomatycznych) zidentyfikowanych dzięki badaniu rodzin chorych. Wykazano, że w chwili rozpoznania choroby Wilsona częstość występowania klinicznych objawów marskości wątroby u pacjentów z neurologiczną postacią choroby, jak i u tych z postacią wątrobową jest podobna. Wydaje się zatem, że destrukcja struktur mózgu nie jest ściśle powiązana z

chorobą wątroby. Obserwacje zaprezentowane w publikacji wpisują się w pogląd, w myśl którego uszkodzenia mózgu i wątroby w przebiegu choroby Wilsona dokonują się niezależnie, ponieważ w obu tych narządach nieprawidłowe białko ATP7B może powodować zaburzenia transportu miedzi. W artykule przedstawiono również wyniki badań endoskopowych górnego odcinka przewodu pokarmowego wykonywanych w celu wykrycia objawów nadciśnienia wrotnego. Wykazano, że częstość występowania żylaków przełyku w momencie rozpoznania choroby Wilsona jest duża i wynosi około 36%. Żylaki przełyku były obecne nawet u chorego w presymptomatycznej fazie choroby. Obserwacje te wskazują na konieczność dokładnej oceny stanu czynnościowego i morfologicznego wątroby jak również przeprowadzenia badania mającego na celu potwierdzenie bądź wykluczenie obecności objawów nadciśnienia wrotnego w chwili rozpoznania chW, niezależnie od postaci klinicznej choroby.

Znanych jest ponad 500 mutacji ludzkiego genu *ATP7B*, spośród których około 350 jest uważanych za patogenne. Udowodniono, że rodzaj mutacji *ATP7B* tylko częściowo tłumaczy zmienność obrazu fenotypowego chW. Zmienność ta dotyczy postaci klinicznej choroby, wieku chorych w chwili wystąpienia pierwszych objawów choroby oraz nasilenia zaburzeń metabolizmu miedzi. Uważa się, że za różnorodność przebiegu klinicznego chW odpowiadają czynniki środowiskowe oraz zmienność genetyczna dotycząca innych genów. W publikacji „Polymorphisms of metal transporters genes: *DMT1* and *ATP7A* in Wilson's disease” przedstawiono wyniki analizy powiązań pomiędzy polimorfizmem genów kodujących transportery metali *DMT1* oraz *ATP7A* a obrazem klinicznym chW. Białko *DMT1* jest obecne w rąbku szczoteczkowym enterocytów, u ssaków główną funkcją tego białka jest dokomórkowy transport dwuwartościowego żelaza. *ATP7A* jest odpowiedzialne za transport miedzi i za jej usuwanie z komórek. Nie znaleziono związku pomiędzy badanymi genotypami a obrazem klinicznym choroby. Wykazano natomiast, że allel *DMT1* IVS4 C występuje częściej u chorych na chW niż u osób zdrowych. Inni autorzy wykazali, że allel *DMT1* IVS4 C jest częstszy u chorych na chorobę Parkinsona oraz u chorych na zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem. Wydaje się zatem uzasadnione prowadzenie dalszych badań nad udziałem białka *DMT1* w patogenezie chorób układu nerwowego.

Mechanizm uszkodzenia komórek i narządów u pacjentów chorych na chW nie jest jasny. Sugeruje się udział stresu oksydacyjnego, zaburzenia w funkcjonowaniu enzymów zależnych od miedzi, nieprawidłowe utlenianie lipidów, uszkodzenie DNA, aktywację mechanizmów prowadzących do apoptozy. Również wpływ czynników środowiskowych na przebieg choroby nie został w pełni scharakteryzowany. W poszukiwaniach odpowiedzi na pytania

dotyczące patologii choroby Wilsona mogą być pomocne zwierzęce modele tej choroby. *Toxic milk* to myszy szczepu C3HeB/FeJ, u których wystąpiła spontaniczna mutacja w genie *Atp7b*, ortologicznym do ludzkiego genu *ATP7B*. Zwierzęta te rozwijają marskość wątroby na skutek przeładowania miedzią, ponadto nie wydzielają miedzi do mleka. Osiki *toxic milk* umierają przed ukończeniem 2 tygodnia życia z powodu niedoboru miedzi. Jedynym sposobem ratującym im życie jest zastąpienie mleka ich matek mlekiem myszy zdrowych. Wyniki badań nad fenotypem myszy *toxic milk* opublikowano w artykule "Neurochemical and behavioral characteristics of toxic milk mice: an animal model of Wilson's disease". Wykazano, że u tych zwierząt obecne są objawy uszkodzenia wątroby zbliżone w swojej charakterystyce do objawów uszkodzenia wątroby opisywanych u chorych na chW. Posługując się badaniami behawioralnymi dowiedziono, że u myszy *toxic milk*, podobnie jak u chorych na chW, obecne są zaburzenia neurologiczne. Ich wystąpienie związane jest z nagromadzeniem miedzi w mózgu. U gryzoni objawom uszkodzenia układu nerwowego towarzyszy spadek stężenia dopaminy w strukturach tworzących prążkowie oraz uogólnione podwyższone stężenie serotoniny w mózgu. Wyniki przedstawionych badań sugerują, że myszy *toxic milk* mogą być wykorzystywane do dalszych szczegółowych badań nad neuropatologią choroby Wilsona.

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

Prace oryginalne, których jestem autorem, poza tematyką choroby Wilsona, opisują przede wszystkim udział układu immunologicznego w neurodegeneracji. Powstały one w oparciu o wyniki badań nad zwierzęcym modelem choroby Parkinsona wywołanym podaniem 1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP) myszom szczepu C57BL/6. MPTP w sposób wybiórczy uszkadza neurony dopaminergiczne tworzące szlak istota czarna-prążkowie. W publikacjach przedstawiono reakcję mikro- i astrogleju oraz limfocytów T w odpowiedzi na uszkodzenie neuronów wywołane MPTP. Scharakteryzowano profil produkowanych cytokin, udowodniono udział cyklooksygenaz i syntaz tlenu azotu w reakcji na podanie toksyny. Zidentyfikowano zależne od płci i wieku różnice w przebiegu neurodegeneracji oraz w towarzyszącej jej odpowiedzi immunologicznej. W konsekwencji uzyskanych wyników przeprowadzono serię eksperymentów oceniających działanie glikokortykosteroidów, niesteroidowych leków przeciwzapalnych i 17 $\beta$ - estradiolu w mysim modelu choroby Parkinsona. Wykazano neuroprotektoryjne działanie tych leków.

## Podsumowanie osiągnięć naukowo- badawczych

Wyniki badań, w których uczestniczyłem, zaprezentowano w postaci 60 doniesień i streszczeń prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach i sympozjach naukowych. Ponadto zostały przedstawione w formie 19 publikacji oryginalnych, których łączny współczynnik oddziaływania (impact factor, IF) wynosi 35,877. Jestem autorem 4 publikacji poglądowych i 1 rozdziału w książce. Pozostałe parametry oceny bibliometrycznej przedstawiają się następująco: liczba punktów KBN/MNiSW – 298,5; IC- 170,08; liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science z dn. 11.03.2014 - 175 , index Hirscha z bazy Web of Science  $h= 7$ .

Adam Buntkowski  
17 marca 2014