

Autoreferat

Dr n. med Tomasz Kryczka

lekarz medycyny

magister medycyny molekularnej

Opis dorobku i osiągnięć naukowych

Warszawa, październik 2015 r.

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

Wrzesień 1996: dyplom i tytuł lekarza medycyny, wydział lekarski Akademii Medycznej w Białymstoku

Marzec 2006: stopień doktora nauk medycznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie; tytuł pracy doktorskiej: "Estrowe pochodne 2'-deoksyadenozyny i kladrybiny jako potencjalne leki przeciwnowotworowe"

Czerwiec 2012: ukończone "Menedżerskie Studia Podyplomowe dla sektora Badań i Rozwoju", zrealizowane pod patronatem Fundacji OIC Poland, Warszawa

Wrzesień 2013: tytuł magistra medycyny molekularnej, uzyskany na Norwegian University of Science and Technology (NTNU) w Trondheim, Norwegia, po odbyciu pełnego cyklu studiów magisterskich zakończonych egzaminem dyplomowym (*International MSc Program in Molecular Medicine*)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:

od 2011 Lekarz Pierwszego Kontakt; NZOZ CMB w Warszawie

od 2010 Adiunkt; Zakład Biologii Medycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny w Warszawie

od 2010 Adiunkt; Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie

2007-2010 Post-Doc; Inst. of Neuroscience, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norwegia

2000-2007 Asystent, a następnie Adiunkt (od 2007 r.); Pracownia Farmakologii Doświadczalnej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

2000-2002 Lekarz Pierwszego Kontakt; Biorenix S.A. Przychodnia Specjalistyczna, Warszawa

1998-1999 Lekarz Pierwszego Kontakt; Telekardiomed S.A. Kardiologiczna Przychodnia Specjalistyczna, Warszawa

1997-1998 Lekarz Stażysta; Szpital Bródnowski, 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.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego będącego podstawą do wnioskowania o uzyskanie stopnia naukowego doktora habilitowanego – cykl prac jednotematycznych objętych wspólnym tytułem:

„Profil biochemiczny rogówek w stanach fizjologicznych i niefizjologicznych - perspektywy zastosowania spektroskopii NMR w okulistyce”

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

PRACA I: Kryczka T., Ehlers N., Nielsen K., Midelfart A. Impact of organ culturing on metabolic profile of human corneas – MAS ¹H NMR study. **Acta Ophthalmol. 90: 761-767, 2012.**

IF= 2,345 wkład własny: 60%

PRACA II: Kryczka T., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Influence of donor age, post-mortem time and cold storage on metabolic profile of human cornea. **Acta Ophthalmol. 91: 83-87, 2013.**

IF= 2,512 wkład własny: 70%

PRACA III: Kryczka T, Chrapusta SJ, Szaflik JP, Szaflik J, Midelfart A. Impact of donor health on corneal biochemistry - an unexpected caveat from a pilot study. **Ann Transplant. 19: 129-137, 2014.**

IF= 1,261 wkład własny: 70%

PRACA IV: Kryczka T. Cellular stress after transferring human cornea from *in vivo* to *in vitro* milieu – a metabolomic approach. **Integr Mol Med. 2: 227-233, 2015.**

IF= 0 wkład własny: 100%

PRACA V: Kryczka T., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Metabolic changes in donor corneas during cold storage – challenging stereotypes. **Integr Mol Med. 2: 234-238, 2015.**

IF= 0 wkład własny: 80%

PRACA VI: Kryczka T, Ehlers N, Nielsen K, Wylegala E, Dobrowolski D, Midelfart A.
Metabolic Profile of Keratoconic Cornea. **Curr Eye Res. 38: 305-309, 2013.**

IF = 1,663 wkład własny: 70%

PRACA VII: Kryczka T., Sel S., Wollensak G., Midelfart A. Metabolic profile of porcine corneas after photodynamic cross-linking treatment. **Acta Ophthalmol. 90: e658-659, 2012.**

IF= 2,345 wkład własny: 40%

IF całkowity: 10,126

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

Wstęp

Metabolomika

Metabolomika jest nauką, która zajmuje się badaniem i analizą metabolitów w komórkach i tkankach żywych organizmów. Wraz z proteomiką, transkryptomiką i genomiką stanowią element tzw. biologii systemowej, zajmującej się badaniem złożonych i skomplikowanych oddziaływań jakie zachodzą w komórkach, tkankach i większych systemach biologicznych. Dzięki metabolomice możliwe jest śledzenie zmian metabolizmu człowieka wywołanych różnymi czynnikami, np. środowiskowymi, a w szczególności – chorobotwórczymi [1,2].

Rogówka człowieka

Rogówka, ze względu na swoją lokalizację w przedniej części oka jest uważana za główną barierę anatomiczną chroniącą przed uszkodzeniami fizycznymi i chemicznymi narządu, jak również barierę immunologiczną - zabezpieczającą struktury wewnętrzne gałki ocznej przed infekcjami. Najważniejszymi cechami warunkującymi prawidłowe funkcje tej tkanki w obrębie narządu wzroku są: przejrzystość, brak naczyń krwionośnych oraz regularne ułożenie składników komórkowych i niekomórkowych w istocie właściwej (zrębie) rogówki. Rogówka graniczy z twardówką, a granica między twardówką i rogówką określa się mianem rąbka rogówki [3-6].

W okulistyce klinicznej badanie rogówki człowieka polega na zastosowaniu szeregu metod diagnostycznych, których głównym celem jest ustalenie cech morfologicznych tkanki i

wykluczenie zmian patologicznych. Powyższe techniki diagnostyczne łączy metodyka – w zdecydowanej większości są to badania nieinwazyjne, ponieważ pobranie nawet fragmentu rogówki od pacjenta wiąże się z nieodwracalnymi zmianami w tej części oka. Stąd, jakiegokolwiek pozastandardowe procedury diagnostyczne i analityczne wymagające postępowania inwazyjnego wobec tej tkanki są, ze względów etycznych i zdrowotnych wobec pacjentów – absolutnie niedozwolone [4,6,7].

Powyższe zagadnienia stanowią największy problem przy planowaniu badań wykorzystujących techniki metabolomiczne, ponieważ są to metody z reguły realizowane w warunkach *in vitro*, oparte o analizę tkanki wcześniej odseparowanej od głównego organu. Jednakże w przypadku chorób, w wyniku których rogówka lub jej fragment są usuwane, tak pobrany materiał zawsze może być wykorzystany do badań metabolomicznych, choć zawsze pozostaje problem kontroli, którą powinna być tkanka pochodząca od zdrowych osób. Opcjonalnym rozwiązaniem jest uzyskiwanie takich rogówek z banku tkanek oka, gdzie materiałem kontrolnym może być rogówka niekwalifikująca się do przeszczepu np. ze względów serologicznych. W przypadku rogówek spełniających kryteria kwalifikacyjne do transplantacji, do analizy metabolomicznej można wykorzystać pozostałości tkankowe po przeszczepie. Tym niemniej, każda taka procedura analityczna czy diagnostyczna, wykorzystująca pozostałości tkankowe po zastosowaniu głównej procedury medycznej, musi opierać się o zgodę Komisji Bioetycznej dla realizowanych celów badań [2,8,9].

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego

Jedną z fundamentalnych metod analitycznych stosowanych w metabolomice jest spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. *nuclear magnetic resonance*, *NMR*). Spektroskopia NMR polega na wzbudzaniu spinów jądrowych atomów znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym poprzez szybkie zmiany pola magnetycznego oraz rejestracji promieniowania elektromagnetycznego powstającego na skutek zjawisk relaksacji, gdzie przez relaksację rozumiemy powrót układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej. W przypadku substancji składającej się z bardziej złożonych cząsteczek, różne atomy wodoru obecne w tej cząsteczce wysyłają promieniowanie elektromagnetyczne o nieco innej częstotliwości. Wynika to z efektu ekranowego elektronów znajdujących się wokół tych jąder. Elektrony są również w stałym ruchu i także są obdarzone ładunkiem elektrycznym, dlatego ich ruch generuje pole magnetyczne o innej biegunowości niż zewnętrzne pole magnetyczne generowane przez aparat NMR. W rezultacie jądra atomów znajdują się faktycznie w nieco innym polu, niż to generowane przez aparat NMR – w polu będącym wypadkową pola spektroskopu NMR i pola generowanego przez elektrony. To

wypadkowe pole jest różne dla każdego z jąder atomów tworzących daną cząsteczkę, bo wokół każdego z nich jest inny zbiór elektronów, wynikający z układu wiązań chemicznych. W wyniku powyższych oddziaływań powstaje widmo NMR, w którym poszczególne komponenty chemiczne wykazują się specyficznym przesunięciem chemicznym (ppm, ang. *parts per million*), multipletowością, stałą sprzężenia, integracją itp. - umożliwiając efektywne rozpoznawanie metabolitów w uzyskanym widmie [10,11].

Spektroskopia NMR umożliwia detekcję jąder atomów m.in. ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{15}N , ^{31}P , w molekułach znajdujących się w tkankach płynnych (takich jak ślina, mocza, płyn mózgowo-rdzeniowy czy osocze/surowica krwi), jak również stałych i ekstraktach tkanek. Związki chemiczne oznaczone w ten sposób odpowiadają całemu zakresowi biochemii i metabolizmu człowieka będąc końcowymi lub pośrednimi składowymi szlaków metabolicznych. Różnorodność oraz modyfikacje istniejących metod spektroskopii NMR przyczyniają się do coraz sprawniejszej analizy tkanek oraz poprawy czułości pomiarów. Przykładem jest zastosowanie techniki tzw. magicznego kąta (ang. *magic angle spinning, MAS*) w pomiarach NMR; aby otrzymane widma miały dobrą rozdzielczość, próbki są wirowane pod kątem $54^\circ 44,1'$ w stosunku do pola magnetycznego magnezu. Istotną przewagą tej techniki analitycznej nad innymi jest brak procedur ekstrakcyjnych tkanki w procedurach pomiarowych. Tkanina przeznaczona do analizy tą metodą wymaga jedynie zamrożenia do -80°C po pobraniu od pacjenta lub dawcy. W tych warunkach może być przechowywana przez dłuższy czas i w tej postaci, jako zamrożona próbka, jest wprowadzana do spektroskopu NMR. W związku z powyższym skład związków chemicznych uzyskany w pomiarze próbki odzwierciedla rzeczywisty skład tkanki w warunkach *in vivo* [11-14].

Wcześniejsze badania nad rogówką z użyciem technik spektroskopii NMR

W początkach badań metabolomicznych w okulistyce, stosowano spektroskopię NMR opartą o atomy fosforu ^{31}P w celu zbadania profilu metabolitów zawierających fosfor, szczególnie związków wysokoenergetycznych. W badaniach oceniano ciało szkliste oka, ciecz wodnistą oraz ekstrakty rogówek i soczewek. W związku z ograniczeniami technicznymi jakie istniały 20-30 lat temu, w rogówkach zwierzęcych i ludzkich (te ostatnie uzyskiwano z banków tkanek) tylko niewielka liczba ufosforowanych metabolitów mogła być opisana. Mimo to, spektroskopia ^{31}P NMR okazała się być przydatna dla śledzenia zmian metabolicznych zachodzących w rogówkach podczas ich przechowywania w bankach tkanek oka. Porównanie rogówek pochodzących od różnych gatunków (bydło, świnie i ludzie) wykazało znaczące różnice poziomu związków energetycznych w zależności od gatunku. Zasygnalizowano zmiany poziomu ATP w rogówce w trakcie procesu gojenia oraz w trakcie

noszenia soczewek kontaktowych. W przypadku stożka rogówki (ang. *keratoconus*), zaobserwowano zmiany metabolizmu niektórych fosforanów oraz obecność niezidentyfikowanych wcześniej metabolitów, co umożliwiło odróżnienie rogówek zmienionych chorobowo od rogówek pochodzących od zdrowych dawców, a przechowywanych w banku tkanek. Za pomocą ^{13}C spektroskopii NMR badano m.in. metabolizm glukozy i tworzenie mleczanu w rogówkach królików i ludzi [15-26].

Na przełomie wieków (XX/XXI) wysokiej rozdzielczości spektroskopia ^1H NMR była z powodzeniem stosowana do badań procesów metabolicznych zachodzących w przedniej części oka. Pomiaru profilu metabolicznego rogówek wykonane w połowie lat 90-tych przez m.in. zespół Prof. Midelfart, były częścią badań dotyczących m.in.: (i) penetracji i metabolizmu leków steroidowych po ich miejscowym podaniu, (ii) wpływu promieniowania UV na przednią część oka, oraz (iii) skojarzonego wpływu steroidów i UV na przednią część oka [27-31].

Większość powyższych badań było realizowanych na materiale zwierzęcym; nielicznymi wyjątkami są analizy przeprowadzone na tkankach ludzkich, które jednak ze względu na metodykę badań dotyczyły wyłącznie wybranych metabolitów lub związków chemicznych występujących w rogówce. Opracowanie techniki spektroskopowej MAS NMR, a zwłaszcza połączenie jej z analizą widma protonowego typu *High-Resolution* (HR), otworzyło nowe perspektywy dla zastosowania tej techniki analitycznej w badaniach podstawowych i klinicznych. Niniejsze prace ujęte w cykl habilitacyjny wskazują na możliwość zastosowania spektroskopii NMR w okulistyce klinicznej i badaniach okulistycznych [12].

Artykuły stanowiące cykl habilitacyjny zostały podzielone na 4 główne zagadnienia tematyczne, które wzajemnie się uzupełniają, a wspólnym elementem dla wszystkich tych publikacji jest użycie w badaniach ludzkich rogówek (z jednym wyjątkiem) i spektroskopii HR MAS ^1H NMR jako głównego narzędzia analitycznego. W omawianych pracach przedstawiony został (i) wpływ hodowli tkankowej, (ii) wpływ wieku dawcy, stanu zdrowia dawcy i czasu od śmierci dawcy do pobrania rogówki, oraz (iii) wpływ przechowywania zimnego $+4\text{ }^\circ\text{C}$, na profil metaboliczny ludzkich rogówek. Jako uzupełnienie powyższych zagadnień, na przykładzie stożka rogówki dokonano (iv) analizę profilu metabolicznego rogówek zmienionych chorobowo oraz poddanych wybranej procedurze terapeutycznej.

(i) Wpływ hodowli tkankowej na charakterystykę biochemiczną i metaboliczną rogówki.

PRACA I: Kryczka T., Ehlers N., Nielsen K., Midelfart A. Impact of organ culturing on metabolic profile of human corneas – MAS ¹H NMR study. **Acta Ophthalmol. 90: 761-767, 2012.**

Kwalifikacja rogówek do przeszczepu opiera się o wytyczne, opracowane przez European Eye Bank Association (EEBA) oraz Eye Bank Association of America (EBAA). Wśród nich największe znaczenie mają gęstość komórek endotelium (ang. *endothelial cell density, ECD*) rogówki, brak znaczącego uszkodzenia mechanicznego tkanki oraz ujemne wyniki testów mikrobiologicznych i serologicznych. Rogówki od dawców przeznaczone do transplantacji mogą być przechowywane w tzw. hodowlach tkankowych (ang. *organ culture*, synonim *warm storage*) w temperaturze 28-37 °C, w medium zawierającym podstawowe składniki odżywcze dla komórek i tkanki jako całości, z dodatkiem rozpuszczalnych antybiotyków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. W założeniach, stosunkowo wysoka temperatura przechowywania tkanki oraz bogactwo składników odżywczych obecnych w medium powinny przypominać warunki *in vivo*, co z kolei powinno zapobiec utracie integralności tkanki lub śmierci komórek w rogówce [32-34].

Rezultaty dotychczasowych badań nad wpływem hodowli tkankowej na właściwości fizyczne i biochemiczne rogówek potwierdziły przyjęte założenie. Jednak przy okazji zaobserwowano dodatnią korelację gorszych parametrów wyjściowych rogówek – przedhodowlanych – (według kryterii EEBA/EBAA) oraz biochemicznych tych tkanek z niektórymi chorobami przewlekłymi na które cierpiał dawca tkanki przed śmiercią (ale niedotyczącymi gałek ocznych). Co więcej, po kilkutygodniowym przechowywaniu w hodowli tkankowej – rogówki swoimi podstawowymi parametrami morfologicznymi i energetycznymi (np. poziom ATP w tkance) zaczynały przypominać rogówki od dawców nieobciążonych przed śmiercią chorobami przewlekłymi. Warto tu nadmienić, że termin ‘zdrowy dawca’ w piśmiennictwie okulistycznym oznacza osobę, którego rogówka spełnia parametry określone przez EEBA lub EBAA. W związku z powyższym dawcą rogówki może być również pacjent, który zmarł z przyczyn np. sercowo-naczyniowych lub neurologicznych, lub jeszcze innych, po wielomiesięcznej chorobie – pod warunkiem, oczywiście, że tkanka przeznaczona do przeszczepu spełnia kryteria ustalone przez EEBA i/lub EBAA [32,33,35-39].

Hodowla tkankowa wpływa więc w sposób znaczący na właściwości fizykochemiczne i anatomiczne rogówki. Problemem jest jednak szczątkowa wiedza na temat zmian

biochemicznych i metabolicznych, które zachodzą w przechowywanej w ten sposób tkance, a których efektem mogą być np. zmiany gęstości komórek endotelialnych w rogówce (ang. *endothelial cell density, ECD*), co jest również czynnikiem decydującym o przyjęciu przeszczepu przez biorcę. Celem **Pracy I** włączonej do cyklu habilitacyjnego było więc ustalenie zmian biochemicznych i metabolicznych zachodzących w rogówce podczas jej przechowywania w hodowli tkankowej przez okres do 3 tygodni.

Praca I jest efektem współpracy między ośrodkami w Trondheim (Norwegian University of Science and Technology, Department of Neuroscience oraz University Hospital in Trondheim, Department of Ophthalmology; zespół Prof. Anny Midelfart) i Aarhus University Hospital, Department of Ophthalmology w Aarhus, w Danii, którym kierował Prof. Niels Ehlers. Część wyników analiz została opracowana statystycznie w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Wyniki badań zawarte w tej pracy były wcześniej prezentowane na międzynarodowej konferencji okulistycznej przez autora tego autoreferatu (*Kryczka T., Ehlers N., Midelfart A.: Impact of culturing on metabolic profile of human corneas. EVER 2008 Annual Meeting, 1-4 października 2008, Portoroz, Słowenia*).

Dla realizacji tych badań rogówki zostały pozyskane w ośrodku w Danii: 12 od zmarłych zdrowych dawców, a 4 od pacjentów ze złośliwą zmianą nowotworową (czerniak) zlokalizowaną w naczyniówce oka. Rogówki od pacjentów onkologicznych zostały natychmiast po pobraniu zamrożone w -80 °C, a pozostałe – przeznaczone do transplantacji – zostały wcześniej wprowadzone do hodowli tkankowej (+30 °C) opartej o medium Gibco (Carlsbad, CA, USA) zawierającej antybiotyki i płodową surowicę cielęcą. Dzień przed zabiegiem przeszczepiania – rogówki były poddane standardowej procedurze dehydratacji mającej zmniejszyć obrzęk tkanki, zwłaszcza zrębu rogówki (mieszanka 5% w/v dextranu w świeżym medium hodowlanym). W dniu zabiegu rogówka była przeszczepiana biorcy, a pozostały po przeszczepieniu brzeg tkanki rogówkowej był zamrażany w -80 °C. Zamrożone tkanki były następnie przekazane do ośrodka w Trondheim, w Norwegii, gdzie poddane zostały pomiarom za pomocą spektroskopii HR MAS ¹HNMR.

Uzyskane widma spektroskopowe NMR rogówek poddano następnie analizie głównych składowych (ang. *principal component analysis, PCA*). PCA jest jedną ze statystycznych metod analizy wieloczynnikowej; umożliwia redukcję liczby zmiennych w zbiorze danych oraz wykrywanie struktury/wzoru w relacjach między zmiennymi lub klasyfikację zmiennych. W dużym uproszczeniu i od strony praktycznej – PCA zastosowana w kolejnych pracach

składających się na cykl habilitacyjny miała na celu ustalenie i wizualizację podobieństw oraz różnic między zmiennymi (w tym przypadku rogówki od poszczególnych dawców) poprzez graficzne przedstawienie ich grupowania się. Jednocześnie PCA identyfikowała główne czynniki (w tym przypadku biochemiczne składniki rogówek oznaczone w widmach NMR) odpowiedzialne za powyższe różnicowanie się lub grupowanie zmiennych.

W przypadku wyników doświadczenia opisanego w **Pracy I**, PCA ujawniło różnice między rogówkami pobranymi i przechowywanymi w hodowli tkankowej, a rogówkami pobranymi i natychmiast zamrożonymi w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. W PCA wykazano również istnienie znaczących różnic biochemicznych między rogówkami przechowywanymi w hodowli tkankowej przez różny okres czasu. Rogówki w prezentacji graficznej PCA rozdzieliły się na 3 grupy: a) przechowywane w hodowli tkankowej do 8 dni, b) przechowywane przez 9-14 dni oraz c) przechowywane przez 15-20 dni. Mimo rozdziału próbek na 3 główne grupy – w analizie PCA nie zidentyfikowano metabolitów, które mogłyby w największym stopniu odpowiadać za powyższe różnice między próbkami. Metabolity, w liczbie 20, które zostały zidentyfikowane w widmie NMR były substancjami o niskiej masie cząsteczkowej. Zmiany ich stężeń pojawiające się w przebiegu hodowli tkankowej wskazują na aktywne procesy metaboliczne, których efektem mogła być np. – stwierdzona w innych badaniach – ‘rewitalizacja’ lub regeneracja tkanki (np. praca Nejepinskiej i wsp. [39]). Tym niemniej pojawiły się nowe pytania, np. dotyczące wpływu samego medium – jego składu i stężeń poszczególnych składników - na procesy metaboliczne w rogówce? Komercyjnie dostępnych jest duża liczba różnorodnych płynów przeznaczonych do hodowli tkankowych, różniących się składem biochemicznym. Natomiast do chwili obecnej nie jest znana odpowiedź na pytanie jaki skład biochemiczny medium – jakościowy i ilościowy – jest optymalny do przechowywania rogówek przed przeszczepem?

Wyniki opisane w **Pracy I** dotyczą wpływu „ciepłego” przechowywania rogówek na ich skład biochemiczny. Biorąc pod uwagę fakt, że główną alternatywną metodą dla hodowli tkankowej w banku tkanek oka jest tzw. ‘przechowywanie zimne ($+2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$)’ rogówek (ang.: *cold storage*, synonim: *hypothermic storage*, skrót używany dalej w tekście: ‘PZ’), pojawia się kolejne pytanie o wpływ tej formy przechowywania rogówek przed przeszczepem na procesy metaboliczne i zmiany biochemiczne zachodzące w tkance? Powyższe pytanie było przesłanką do wykonania serii eksperymentów, których przedmiotem badań stały się rogówki umieszczone w warunkach przechowywania zimnego ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Wcześniej jednak należało odpowiedzieć na pytanie: jak bardzo rogówki różnią się między sobą jeszcze przed umieszczeniem ich w medium?

(ii) Wpływ wieku dawcy, stanu zdrowia dawcy i czasu od śmierci dawcy do pobrania rogówki na właściwości biochemiczne rogówki.

PRACA II: Kryczka T., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Influence of donor age, post-mortem time and cold storage on metabolic profile of human cornea. **Acta Ophthalmol.** **91:83-7, 2013.**

PRACA III: Kryczka T., Chrapusta S.J., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Impact of donor health on corneal biochemistry - an unexpected caveat from a pilot study. **Ann Transplant.** **19:129-37, 2014.**

Prace II-III są efektem współpracy między ośrodkami w Trondheim (Norwegian University of Science and Technology, Department of Neuroscience oraz University Hospital in Trondheim, Department of Ophthalmology) i ośrodkami w Polsce: Warszawski Uniwersytet Medyczny (Bank Tkank Oka, Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego, Zakład Biologii Medycznej) oraz Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Jednym z bardziej dyskusyjnych zagadnień w transplantologii okulistycznej jest kwestia wpływu wieku dawcy na jakość rogówki oraz wpływ czasu od stwierdzonego zgonu do czasu pobrania tkanki ze zwłok i umieszczenia w medium (ang. *death-to-preservation interval, DPI*). Większość badaczy i klinicystów przychyliła się do tezy, że im młodszy dawca, tym korzystniejszy stan fizjologiczny rogówki, aczkolwiek brak jest zdecydowanych argumentów na poparcie tezy, że wiek rzeczywiście ma znaczenie dla jakości rogówki. Natomiast ogólnie przyjmuje się, że DPI powinien być jak najkrótszy. Stąd, istnieją ośrodki, w których potencjalni dawcy muszą spełniać specyficzne kryteria wiekowe (np. wiek < 60 lat) i w których maksymalny dopuszczalny czas DPI również jest ściśle określony. Jednak część klinicystów podważa zasadność powyższych norm twierdząc, że wobec olbrzymiego zapotrzebowania na rogówki do przeszczepiania, tkanka od każdego dawcy (w dowolnym wieku) może być akceptowalna, nawet z wydłużonym DPI, ale pod warunkiem, że spełnia kryteria dopuszczenia do przeszczepu ustalone przez EEBA i/lub EBAA. Swoje wnioski, często przeciwstawne, naukowcy opierają głównie na rezultatach badań korelacji pomiędzy powyższymi parametrami (wiek lub DPI), a zmianami morfologicznymi zachodzącymi w rogówce, zwłaszcza jej warstwie tylnej, endotelialnej. Inne podejście metodyczne polega na

poszukiwaniu korelacji między powyższymi parametrami (np. wiek dawcy, wiek biorcy, DPI), a przeżywalnością przeszczepów. Dotychczas, poza nielicznymi wyjątkami ograniczonymi do pojedynczych metabolitów, nie podejmowano prób kompleksowej analizy korelacji podstawowych danych biomedycznych dawcy z właściwościami biochemicznymi i metabolicznymi rogówki przed i po umieszczeniu jej w medium w banku tkanek oka [18,19,32,33,35,40-46].

Praca II opiera się na wynikach badań rogówek uzyskanych od zdrowych dawców w wieku 41-78 lat (15 dawców), u których DPI wynosił od 1 do 16 godzin. Rogówki dzielono na dwie części, z których jedna była natychmiast zamrażana w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a druga była umieszczana w zimnej hodowli ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) na okres 8 dni. Analizę składu biochemicznego rogówek przeprowadzono za pomocą spektroskopii HR MAS ^1H NMR według metodyki opisanej wcześniej. Dla potrzeb analizy, dawców podzielono na (a) grupy wiekowe, gdzie kryterium podziału był wiek 60 lat oraz (b) grupy ze względu na czas DPI, gdzie kryterium dzielącym grupy był okres 10 godzin od śmierci dawcy.

W badaniu oznaczono w widmie NMR 22 składniki biochemiczne w rogówce, z których zaledwie kilka miało różne poziomy/stężenia we wspomnianych powyżej grupach wiekowych (60+ vs. 60-). Należały do nich izoleucyna, glutamina, glukoza i maślan (ten ostatni był poniżej progu detekcji dla grupy 60-). Różnice zaobserwowano również przy porównaniu próbek różniących się DPI: różnice były znamienne statystycznie dla leucyny i glutaminy, a w próbkach o DPI poniżej 10 godzin – poziom maślanu był poniżej progu detekcji.

Z jednej strony mogłoby się wydawać, że wykazanie raptem kilku różnic w składzie metabolomu rogówki nie jest w żaden sposób istotne dla funkcjonowania komórek. Trzeba jednak zauważyć, że w widmie NMR oznaczono 22 składniki biochemiczne i jest wysoce prawdopodobne, że różnice występują również wśród metabolitów niewidocznych w tej metodzie analitycznej. To sugeruje, że rogówki różnią się między sobą w zależności od wieku i DPI, a obydwie te zmienne przypuszczalnie stanowią istotne czynniki zaburzające funkcjonowanie np. układów enzymatycznych i szlaków metabolicznych w komórkach rogówki.

Zgodnie z wytycznymi EEBA i EBAA rogówki muszą spełniać określone kryteria, aby zostać zakwalifikowane do procedury przeszczepiania. Stąd np. wiele chorób, zwłaszcza infekcyjnych, wyklucza dawców z procedur transplantacyjnych. Warto jednak zauważyć, że głównymi dawcami tkanek i narządów, w tym rogówek, są osoby starsze, często obciążone

chorobami przewlekłymi i często umierające z powodu powikłań wywołanych przez powyższe choroby. Statystycznie rzecz ujmując, największą grupę dawców rogówek stanowią osoby z chorobami neurologicznymi lub chorobami układu krążenia. Obecnie więc informacja o obciążeniu powyższymi chorobami potencjalnych dawców nie stanowi żadnej wartości dla klinicystów planujących przeszczep rogówki, dopóki spełnione są parametry kwalifikujące tkankę do przeszczepu [32,33,46-50].

Praca III zawiera wyniki porównania rogówek od czterech grup dawców, którzy zmarli z powodu: (i) zaostrzenia choroby układu krążenia, (ii) idiopatycznej marskości wątroby, (iii) zmarli w sposób nagły z nieznanymi przyczynami, lub (iv) mieli wypadek komunikacyjny, ewentualnie popełnili samobójstwo. Między grupami dawców nie było znamienych różnic co do wieku lub czasu DPI, żaden z dawców nie był też obciążony jakąkolwiek inną chorobą przewlekłą, nie nadużywał alkoholu i nie przyjmował używek. Rogówki zostały poddane analizie metodą spektroskopii HR MAS ^1H NMR, a wyniki tych pomiarów były poddane analizie statystycznej PCA. Okazało się, że próbki od dawców obciążonych chorobami krążenia oraz marskością wątroby zdecydowanie różniły się od pozostałych próbek, a głównymi składnikami biochemicznymi tkanki odpowiedzialnymi za graficznie wykazane różnice między próbkami metodą PCA były przede wszystkim różnice w stężeniach ATP, cholicy, mleczanu i octanu w rogówkach poszczególnych grup dawców. Standardowe testy statystyczne (one-way ANOVA lub two-way ANOVA) wykazały dalsze różnice między poszczególnymi grupami rogówek, ale nie o tak dużej wadze jak wymienione powyżej 4 związki chemiczne.

Rezultaty eksperymentów zawartych w **Pracy III** podważają tezę o podobieństwie właściwości fizyko-chemicznych rogówek od dawców, nawet jeżeli pobrane rogówki spełniają kryteria ustalone przez EEBA i/lub EBAA, a parametry morfologiczne (np. ECD) są identyczne. Powyższe rezultaty badań otwierają dużą przestrzeń do dalszej dyskusji i badań, ponieważ rogówka w stanie fizjologicznym (niezmienionym chorobowo) nie posiada rozbudowanych naczyń krwionośnych lub chłonnych, którymi metabolity penetrowałyby z krążenia centralnego. W związku z powyższym rogówka – marginalnie związana z procesami biochemicznymi i metabolicznymi zachodzącymi w odległych strukturach tkankowych, narządach lub układach wielonarządowych – powinna utrzymywać stabilny, niezmienny skład biochemiczny i aktywność metaboliczną. Z drugiej strony trzeba pamiętać, że ciecz wodnista będąca ‘przesączem’ surowicy krwi, stanowi główne źródło substancji odżywczych dla rogówki, podobnie jak płyn łożowy zawierający substancje wydzielane przez gruczoły zewnętrzne, zlokalizowane wokół oczodołów (w obrębie aparatu ochronnego gałki

ocznej i w oczodole). Można więc uznać, że istnieje pośredni mechanizm oddziaływania składu biochemicznego krwi na rogówkę [32,33,51-53].

Wyniki tego badania wskazują w sposób pośredni, że choroby układowe o charakterze przewlekłym mogą determinować istotne zmiany w składzie surowicy krwi, które nie są obojętne dla żadnej tkanki organizmu, w tym rogówki. Powyższe implikuje pytania o możliwy wpływ tego rodzaju zmian biochemicznych na przeżywalność przeszczepów rogówki i czy przechowywanie zimne (+4 °C, PZ) może w jakimś stopniu zniwelować wyjściowe odchylenia od normy w składzie biochemicznym rogówek?

(iii) Wpływ przechowywania zimnego (+4 °C) na właściwości biochemiczne i metaboliczne rogówki.

PRACA II: Kryczka T., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Influence of donor age, post-mortem time and cold storage on metabolic profile of human cornea. **Acta Ophthalmol.** **91:83-7, 2013.**

PRACA III: Kryczka T., Chrapusta S.J., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Impact of donor health on corneal biochemistry - an unexpected caveat from a pilot study. **Ann Transplant.** **19:129-37, 2014.**

PRACA IV: Kryczka T. Cellular stress after transferring human cornea from *in vivo* to *in vitro* milieu – a metabolomic approach. **Integr Mol Med.** **2: 227-233, 2015.**

PRACA V: Kryczka T., Szaflik J.P., Szaflik J., Midelfart A. Metabolic changes in donor corneas during cold storage – challenging stereotypes. **Integr Mol Med.** **2:2 34-238, 2015.**

Prace IV-V są podobnie jak **Prace II i III** są efektem współpracy między ośrodkami w Trondheim (Norwegian University of Science and Technology, Department of Neuroscience oraz University Hospital in Trondheim, Department of Ophthalmology) i ośrodkami w Polsce: Warszawski Uniwersytet Medyczny (Bank Tkanek Oka, Klinika Okulistyki II Wydziału Lekarskiego, Zakład Biologii Medycznej) oraz Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Alternatywą dla „cieplej” hodowli tkankowej w przechowywaniu rogówek przed procedurą przeszczepiania jest przechowywanie „zimne” w temperaturze +2-8 °C. W teorii, niska

temperatura powinna powodować obniżenie metabolizmu komórek rogówki do minimum – w związku z czym parametry fizyko-chemiczne i morfologiczne rogówki w trakcie przechowywania zimnego (PZ) powinny przypominać wartości wyjściowe sprzed ekstrakcji tkanki z gałki ocznej i powinny być zachowane do momentu przeszczepiania rogówki do biorcy. Metoda PZ jest zdecydowanie prostsza od hodowli tkankowej; wymaga oczywiście zastosowania odpowiednich płynów do przechowywania rogówek, ale są to płyny znacznie prostsze w składzie od stosowanych w hodowli tkankowej. Ze względu na samą procedurę przechowywania, nie jest konieczne używanie wyspecjalizowanego i drogiego sprzętu jak w hodowli tkankowej, co zdecydowanie redukuje koszty takiego przechowywania tkanek do przeszczepu. Minusem tej metody jest znaczne ograniczenie czasu przechowywania rogówek w porównaniu do hodowli tkankowej – do 2 tygodni (a nawet według niektórych do 5-ciu dni) podczas gdy hodowla tkankowa umożliwia bezpieczne przechowywanie rogówek do 4 tygodni, a według niektórych autorów – nawet kilku miesięcy [32-34,37,42,54-56].

W **Pracy II** rogówki pochodzące od dawców podzielonych na grupy wiekowe poniżej- i powyżej 60 lat, po 8 dniach przechowywania w PZ opartym o Eusol-C wykazały tendencję do minimalizacji różnic w poziomach metabolitów, które wykazano wcześniej przed umieszczeniem rogówek w PZ. Z drugiej strony, pojawiły się nowe, znamienne statystycznie różnice biochemiczne pomiędzy rogówkami od dawców 60+ i 60-. Na dodatek, poziomy dwóch metabolitów – glutaminy i kreatyny – spadły poniżej progu detekcji w obu grupach dawców po ośmiodniowej inkubacji w PZ.

W kolejnym eksperymencie, opisanym w **Pracy III**, porównano rogówki zamrożone w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ natychmiast po ekstrakcji z gałki ocznej oraz rogówki umieszczone w PZ przez 8 dni z tym, że czynnikiem różnicującym dawców było ich obciążenie chorobami przewlekłymi przed śmiercią – wspomniane wcześniej choroby układu krążenia, idiopatyczna marskość wątroby. Okazało się, że w wyniku 8-dniowego przechowywania tkanek w PZ, zatarły się różnice biochemiczne między próbkami od dawców z chorobami krążenia, a próbkami od dawców, którzy zmarli nagle bez wyjaśnionych przyczyn lub zginęli w wypadku komunikacyjnym czy popełnili samobójstwo. Jediną grupą próbek, różniących się znacznie od pozostałych były, według analizy PCA, rogówki pochodzące od dawców z idiopatyczną marskością wątroby. Rezultaty analiz opisane w **Pracy III** w sposób dobitny wskazują na ‘pozytywny’ wpływ PZ na rogówki – ta procedura przywraca skład biochemiczny (a więc i metabolizm) rogówek ‘dotkniętych’ przez chorobę przewlekłą do poziomu porównywalnego do metabolizmu w rogówkach od dawców nieobciążonych chorobami przewlekłymi – a do takich możemy zaliczyć rogówki od osób, które zginęły śmiercią nagłą. Oczywiście, przy bardziej

zaawansowanych i długotrwałych zmianach chorobowych – skład biochemiczny rogówki jest prawdopodobnie bardziej utrwalony, a więc redukcja zmian też będzie prawdopodobnie bardziej utrudniona.

W **Pracy III** statystyczna analiza PCA wykazała, że grupowanie próbek po 8-dniowym ich przechowywaniu w PZ jest także oparte o różnice w zawartości ATP, mleczanu i octanu w badanych tkankach, ale szczegółowa analiza statystyczna wykazała, że pozostałe składniki oznaczonego metabolomu również mniej lub bardziej, różnią się od stanu wyjściowego. Trzeba jednak podkreślić, że obserwowane zmiany na poziomie biochemii i metabolizmu nie miały swojego przełożenia na zmiany morfologiczne w rogówkach. Być może hipotermia (+4 °C) hamująca metabolizm komórek, jak również relatywnie krótki czas inkubacji (8 dni) spowodowały, że zmiany morfologiczne wynikające ze zmian biochemicznych, enzymatycznych i metabolicznych w rogówkach – jeszcze nie zdążyły się ujawnić.

Wyniki opublikowane w obu **Pracach (II i III)** podważają tezę o braku lub minimalnym wpływie PZ na właściwości fizyko-chemiczne przechowywanych rogówek. Pojawia się jednak pytanie, czy zmiana medium (w tym przypadku był to Eusol-C) na inny płyn przechowujący może ograniczyć pojawianie się powyższych zmian biochemicznych w rogówkach, czy ewentualnie je pogłębić? Czy powyższe zmiany są odwracalne, a jeżeli tak, to po jakim okresie czasu? Czy wykonywanie przeszczepów rogówek rzeczywiście powinno odbywać się w ciągu kilku pierwszych dni ich przechowywania w zimnej hodowli?

Ostatnie pytanie stanowiło przesłankę do wykonania kolejnego eksperymentu, opisanego w **Pracy IV**, w którym pozyskane od zdrowych dawców (wiek 58-67 lat, n=8) rogówki były przechowywane w PZ opartej o Eusol C, przez okres 3 dni. W dniu '0', ¼ każdej rogówki (tzw. 'kawalek pizzy') była umieszczana w -80 °C, a w kolejnych dniach kolejne ćwiartki tkanki były separowane i również mrożone w -80 °C.

Wśród substancji chemicznych – drobnocząsteczkowych metabolitów oznaczonych w widmie spektroskopowym NMR, uwagę zwróciło sześć związków: glutamina, fenyloalanina, metionina, maślan oraz ATP i mrówczan, których stężenia różniły się znamienne w poszczególnych dniach obserwacji. W przypadku glutaminy i fenyloalaniny – stężenie tych substancji spadło poniżej progu detekcji spektroskopu NMR w próbkach przechowywanych w PZ. ATP i mrówczan – stężenia tych substancji w pierwszym dniu inkubacji były porównywalne z kontrolą, natomiast w drugim i trzecim dniu PZ – stężenia tych metabolitów wykazały spektakularny spadek. Podobną tendencję zmian stężeń, choć nie tak gwałtowną,

zaobserwowano w przypadku metioniny, gdzie wartości stężeń tego aminokwasu w sposób znamieny statystycznie różniły się od wartości wyjściowej – kontrolnej z dnia '0'. Maślan różnił się od pozostałych metabolitów brakiem mierzalnego stężenia tej substancji w próbkach kontrolnych.

Próba wyjaśnienia obserwowanych zmian biochemicznych w opisanych powyżej próbkach nie jest jednoznaczna. Prawdopodobnie, sama procedura separacji rogówki z tkanek otaczających i przeniesienia tej tkanki z warunków *in vivo* do warunków *ex vivo* nie jest obojętna dla metabolizmu komórek rogówki. Co więcej, samo medium ze względu na skład biochemiczny znacznie odbiegający od warunków *in vivo* jest środowiskiem niefizjologicznym (sztucznym) dla tkanki. Jeżeli dodać do tego spadek temperatury o ok. 30 °C w bardzo krótkim odstępie czasowym, to można uznać, że sama procedura umieszczania rogówki w PZ jest działaniem uszkadzającym, zaburzającym równowagę metaboliczną żywej tkanki. Według opinii przyjętych przez ogół klinicystów – niska temperatura powinna zahamować metabolizm w komórkach i zmniejszyć ich zapotrzebowanie na składniki odżywcze i energetyczne. Najprawdopodobniej jest to słuszna teza, ale być może właściwa dla kolejnych dni hodowli, ponieważ prace badawcze nad hodowlami komórkowymi i tkankowymi już dawno wykazały, że w ciągu pierwszych 24-48 godzin od wprowadzenia komórek do hodowli (cieplej czy zimnej), metabolizm komórek 'przełącza się' na działania mające zapewnić ich przeżywalność w zmiennym/obcym środowisku. Gwałtowny spadek poziomu ATP w pierwszych dniach PZ można więc wiązać z olbrzymim wydatkiem energetycznym wspomagającym funkcjonowanie komórek w rogówce, przeważającym nad procesami resyntezy tego związku. Ubytek pozostałych składników metabolicznych w kolejnych dniach zdaje się potwierdzać powyższą tezę, zwłaszcza, jeżeli uwzględnimy pojawienie się wolnego maślanu – związku chemicznego, którego stężenie rośnie np. w wyniku degradacji błon komórkowych. Rozpad błon komórkowych może być pierwszą oznaką rozpadu komórek, np. w drodze apoptozy [52,54,57-60].

Uważa się, że między pojawieniem się zaburzeń metabolicznych w komórkach (które nie są zbyt dramatyczne aby aktywować apoptozę), a detekcją zmian w morfologii komórek lub tkanek – musi być pewien odstęp czasowy. To sprawia, że pomimo iż metabolizm tkanki jest poważnie zaburzony, zjawisko to nie przekłada się natychmiast na wizualizację zmian technikami mikroskopowymi. Nie oznacza to wcale, że taka rogówka nie może być przeszczepiana; jest wysoce prawdopodobne, że przeszczepienie rogówki do biorcy, czyli przywrócenie jej naturalnego środowiska pozwoli na odwrócenie zaburzeń metabolicznych i energetycznych jakie pojawiły się w trakcie jej przechowywania w 'obcym' (sztucznym)

środowisku (PZ). Nie można jednak wykluczyć, że zaburzenia metaboliczne w takich rogówkach mogą być jedną z przyczyn odrzucania przeszczepów rogówki, pojawiających się sporadycznie i z niewyjaśnionych powodów.

Praca V, stanowi rozwinięcie badań omówionych powyżej: sam fakt, że rogówka już w pierwszych dniach przechowywania w PZ wykazuje zaburzenia metaboliczne determinuje następane pytanie, jak zmienia się metabolizm tkanki w kolejnych dniach takiego przechowywania? Należy przy tym uwzględnić fakt, że większość badaczy i klinicystów uważa 2 tygodnie PZ za górną granicę czasową dla wykonania procedury przeszczepiania rogówki.

W badaniu użyto 20 rogówek od 10 zdrowych dawców (wiek 60-71 lat) nieobciążonych chorobami przewlekłymi. Z rogówek wycięto 1/8 ich części, tzw. 'pizza slice', które zamrożono w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ natychmiast po pobraniu, a pozostałe części tkanki umieszczono w PZ. Rogówki uzyskane od tego samego dawcy zostały podzielone na 2 grupy: w pierwszej grupie 1/8 rogówki była codziennie separowana od pozostałej tkanki i mrożona w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, w drugiej grupie – rogówka była przechowywana w zimnej hodowli do 14 dnia, a następnie zamrażana w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Próbkę były następnie poddane analizie metodą spektroskopii HR MAS ^1H NMR.

Analiza PCA danych uzyskanych ze spektroskopii NMR wykazała brak znaczących różnic biochemicznych pomiędzy próbkami przechowywanymi w PZ przez okres od 1 do 7 dni. PCA również wykazała, że próbki kolekcjonowane w pierwszym tygodniu hodowli różniły się znacząco pod względem biochemicznym od próbek, które były zamrożone natychmiast po pobraniu ich od dawców (te rogówki stanowiły kontrolę w doświadczeniu). Natomiast całkowicie zaskakującą okazała się obserwacja, że rogówki przechowywane przez 2 tygodnie w PZ miały skład biochemiczny zbliżony, według analizy PCA, do próbek kontrolnych, czyli do próbek, których skład biochemiczny powinien oddawać wartości *in vivo*, występujące w rogówce żywego człowieka. W analizie PCA zidentyfikowano 5 głównych metabolitów odpowiedzialnych za powyższe grupowanie się próbek (ATP, glutamina mrówczan, maślan oraz mleczan), ale analiza wariancji (one-way ANOVA) wszystkich próbek wykazała więcej znamienych statystycznie różnic między stężeniami poszczególnych metabolitów, w kolejnych dniach obserwacji.

Rezultaty badań opisane w **Pracach IV i V**, podważają tezę (przynajmniej częściowo) o neutralnym wpływie przechowywania rogówek w PZ na metabolizm i właściwości

biochemiczne tych tkanek. Wzbudzają również wątpliwości co do opinii głoszonej przez niektórych okulistów (transplantologów) o korzystniejszym z ich punktu widzenia dokonywaniu przeszczepu rogówek w pierwszym tygodniu przechowywania rogówek w PZ. Wyniki tych badań są na tyle zaskakujące, że powinny być zweryfikowane w większym, wielośrodkowym badaniu, ponieważ mogą stanowić podstawę do przededefiniowania procedur transplantacyjnych w okulistyce.

(iv) Stożek rogówki w analizie metabolomicznej

PRACA VI: Kryczka T., Ehlers N., Nielsen K., Wylegala E., Dobrowolski D, Midelfart A. Metabolic Profile of Keratoconic Cornea. **Curr Eye Res.** **38:305-9, 2013.**

PRACA VII: Kryczka T., Sel S., Wollensak G., Midelfart A. Metabolic profile of porcine corneas after photodynamic cross-linking treatment. **Acta Ophthalmol.** **90:e658-9, 2012.**

Praca VI jest efektem współpracy między ośrodkami w Danii (Aarhus University Hospital, Department of Ophthalmology), Norwegii (Norwegian University of Science and Technology, Department of Neuroscience oraz University Hospital in Trondheim, Department of Ophthalmology) oraz ośrodkami w Polsce: Śląski Uniwersytet Medyczny (Klinika Okulistyki Szpitala Kolejowego w Katowicach), Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Praca VII jest efektem współpracy między ośrodkami w Niemczech (University Hospital Erlangen w Erlangen i Augen MVZ Lausitz w Kamenz), w Norwegii (Norwegian University of Science and Technology, Department of Neuroscience oraz University Hospital in Trondheim, Department of Ophthalmology) i w Polsce (Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Biologii Medycznej).

A) Profil biochemiczny rogówki w przebiegu przewlekłej choroby oka.

W **Pracy III** opisano wyniki analiz składu biochemicznego rogówek pozyskanych od dawców obciążonych przed śmiercią przewlekłymi chorobami. Choroby te nie miały żadnego bezpośredniego związku z funkcjonowaniem organu wzroku, tymczasem analiza biochemiczna wykazała znaczne różnice pomiędzy rogówkami otrzymanymi od różnych dawców. Było to o tyle zaskakujące, że rogówka właściwie nie posiada fizjologicznie występujących, rozbudowanych naczyń krwionośnych lub limfatycznych, którymi toksyczne

związki chemiczne lub nadmiar metabolitów z uszkodzonych lub zmienionych chorobowo narządów penetrowałyby do rogówki wpływając w ten sposób na metabolizm jej komórek. Jak wiadomo, substancje odżywcze dostarczane są do komórek rogówki poprzez ciecz wodnistą, będąca przesączem osocza w gałce ocznej oraz płyn łzowy zawierający substancje wydzielane przez gruczoły zewnętrzne, zlokalizowane wokół oczodołów (w obrębie aparatu ochronnego gałki ocznej i w oczodole). Tym niemniej, okazało się (m.in w **Pracy III**), że tkanki nieukrwione również są podatne (choć być może w mniejszym stopniu) na zaburzenia biochemiczne zachodzące w innych, nawet odległych narządach. Fakt ten jednak nie stanowił większego problemu przy przeszczepianiu rogówek, jeżeli tylko tkanki te spełniały kryteria określone przez EEBA i/lub EBAA. Uzyskanie danych biochemicznych o wpływie odległych chorób przewlekłych na rogówkę (**Praca III**) było przesłanką do postawienia pytania o zmiany biochemiczne zachodzące w rogówce w przebiegu choroby przewlekłej, bezpośrednio dotyczącej tej tkanki? Powyższe pytanie było punktem wyjścia dla eksperymentu, w którym do badań użyto rogówek od pacjentów, u których rozpoznano stożek rogówki (ang. *keratoconus*).

Stożek rogówki jest chorobą przewlekłą, niezapalną, degeneracyjną; dziedziczną ektazją rogówki prowadzącą do jej znacznego ścięczenia, uwypuklenia, a w konsekwencji do osłabienia ostrości wzroku. Choroba dotyczy tylko i wyłącznie narządu wzroku (rogówka) i jest rozpoznawana zwykle w wieku kilkunastu-, dwudziestu kilku lat. W jej przebiegu u pacjentów rozwija się krótkowzroczność i/lub astygmatyzm, które mogą być korygowane szklami korekcyjnymi lub soczewkami kontaktowymi. W zaawansowanych stadiach choroby opcjami terapeutycznymi zapobiegającymi ślepotcie są terapia fotodynamiczna (zabieg cross-linking stosowany osobno lub łączony z fotokeratektomią refrakcyjną) lub – przy znacznym zaawansowaniu uszkodzenia rogówki – jej przeszczep (warstwowy lub drażący) od dawcy [61-66].

W **Pracy VI** opisano eksperyment, w którym u pacjentów w zaawansowanym stadium stożka rogówki dokonano przeszczepienia rogówki od dawcy, a rogówkę zmienioną chorobowo natychmiast po pobraniu zamrażano w -80 °C. Kontrolą dla tego badania były rogówki od zdrowych dawców, których nie dopuszczono do procedury przeszczepiania z powodu niespełnienia któregoś z kryteriów EEBA. Obie grupy badane – pacjenci ze stożkiem rogówki i dawcy – nie byli obciążeni innymi chorobami przewlekłymi układowymi lub chorobami oczu. Różnili się natomiast wiekiem: pacjenci ze stożkiem rogówki byli w wieku 19-27 lat (n=8), a dawcy rogówek – 61-75 lat (DPI: 1-8 godzin, n=11). Rogówki poddano analizie za pomocą wysokosprawnej/wysokościśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC, w metodyce

ustawionej na aminokwasy) i spektroskopii NMR (według metodyki stosowanej w pozostałych pracach tworzących cykl habilitacyjny).

W badaniu, mimo zastosowania różnych metod analitycznych, nie stwierdzono jakichkolwiek różnic biochemicznych pomiędzy grupami próbek, które byłyby znamienne statystycznie. Powyższa obserwacja wydaje się stosunkowo zaskakująca wobec zmian morfologicznych zachodzących w rogówce w przebiegu choroby. Z drugiej strony rezultaty tego eksperymentu nie podważyły żadnej z istniejących teorii dotyczących rozwoju tej jednostki chorobowej; jest ich wiele - część z nich nawet nawzajem się wyklucza. Być może każdy z opisanych i proponowanych mechanizmów rozwoju tej choroby stanowi jakiś element składowy prowadzący do zmian anatomicznych w rogówce będących obrazem stożka rogówki - do chwili obecnej nie ustalono jednego, głównego patomechanizmu tej choroby. Wyniki tego doświadczenia wskazały jednak na jeszcze jeden szczególny aspekt rozwoju tej choroby. We wcześniej opisanej **Pracy II** jedną z głównych obserwacji było stwierdzenie, że rogówki od dawców różniących się wiekiem – jako wartość graniczną ustalono wiek 60 lat – różnią się między sobą pod względem biochemicznym. Teoretycznie, im młodszy dawca, tym większa powinna być różnica w składzie biochemicznym rogówek w porównaniu do dawcy 60+. Tymczasem rogówki od pacjentów w wieku 19-27 lat wykazały prawie identyczny profil biochemiczny jak rogówki od starszych dawców (co zostało opisane w **Pracy VI**). Na podstawie powyższych wyników można postawić hipotezę, że stożek rogówki jest chorobą w jakiś sposób skorelowaną z przyspieszonym starzeniem się tej tkanki. Być może występuje jakiś nieznaną czynnik genetyczny (genetyczne uwarunkowanie choroby było i jest od wielu lat dyskutowane na forach naukowych) lub środowiskowy, który w określonych warunkach ulega aktywacji i powoduje zmiany biochemiczne i morfologiczne tkanki w kierunku chorobowym, o właściwościach opisanych powyżej. Z drugiej strony, zmiany biochemiczne i metaboliczne, jakie oznaczono w zmienionych chorobowo rogówkach, mogą być efektem długoletniego przebiegu choroby, podczas którego struktury rogówki stopniowo tracą swoją integralność lub homeostazę wewnątrzkomórkową. W morfologicznym ujęciu jest to widoczne jako ścięczenie rogówki i zmiana jej kształtu. W ujęciu biochemicznym – utrata cech właściwych dla rogówek pochodzących od osób (dawców) młodych i zdrowych. Trzeba jednak podkreślić, że wyniki eksperymentu opisane w **Pracy VI**, jak również stawiane tezy są oparte o pomiar zaledwie kilkunastu rogówek dwoma różnymi metodami analitycznymi i wymagają weryfikacji na większej liczbie próbek.

Wyniki badań zawarte w **Pracy VI** były przed publikacją zaprezentowane na konferencji naukowej w Portoroz, Słowenia (**Kryczka T., Ehlers N., Midelfart A.: Comparison of**

metabolic profile of normal and keratoconus corneas using HR MAS 1HNMR spectroscopy and HPLC. EVER 2008 Annual Meeting, 1-4 października 2008, Portoroz, Słowenia).

B) Wpływ terapii fotodynamicznej na profil metaboliczny rogówek

Zaawansowana postać stożka rogówki jest wskazaniem do wykonania przeszczepienia rogówki, ale skuteczną alternatywą może być zastosowanie tzw. terapii fotodynamicznej. W tej metodzie wykorzystuje się nietoksyczny związek światłoczuły (np. riboflawinę), który po ekspozycji na promieniowanie UV ulega aktywacji oddziałując na inne związki chemiczne i struktury otaczające. W okulistyce riboflawina naniesiona jest na powierzchnię rogówki, a w wyniku ekspozycji tkanki na określoną dawkę promieniowania ultrafioletowego UV-A, dochodzi do wytworzenia dodatkowych włókien interfibrylarnych, tworzących wiązania kowalencyjne w istocie właściwej rogówki i tym samym zmniejszających prawdopodobieństwo progresji stożka. Dodatkowe połączenia międzykolagenowe w zrębie rogówki mogą również powodować pogrubienie i częściowe odtworzenie właściwego kształtu tkanki. Metoda została szczegółowo opracowana m.in. przez Prof. Wollensaka kilkanaście lat wstecz i jest w niektórych krajach uznaną i standardową opcją terapeutyczną w leczeniu tego schorzenia. Trzeba jednak dodać, że naukowcy i lekarze klinicyści nie ustają w staraniach, aby metodę rozwijać i dopracowywać; wciąż prowadzone są badania dotyczące zmian, jakie zachodzą w rogówce pod wpływem tak zastosowanego leczenia [67,68].

Większość badań dotyczących efektywności i bezpieczeństwa tej metody terapeutycznej jest obecnie prowadzona na pacjentach z użyciem procedur nieinwazyjnych, obrazowych. Stąd wiadomo w jaki sposób terapia fotodynamiczna zmienia właściwości fizyczne i anatomiczne rogówki. Natomiast brak jest danych (lub są one ograniczone) na temat zmian biochemicznych i metabolicznych jakie zachodzą w tkance, w wyniku zastosowania tej techniki terapeutycznej. Powyższe jest uwarunkowane specyfiką budowy gałki ocznej – naruszenie jakiegokolwiek struktury oka w mniejszym lub większym stopniu upośledza funkcjonowanie tego narządu. A to z kolei wyklucza ze względów etycznych jakiegokolwiek procedury diagnostyczne i analityczne oparte o inwazyjne pozyskanie tkanki oka do badań biochemicznych od żyjącego pacjenta [23,61,65,66,69,70].

Rozwiązaniem dla wielu problemów okulistycznych w badaniach medycznych i diagnostycznych, jest przeprowadzanie eksperymentów na zwierzętach. Jednak modele zwierzęce nie zawsze odzwierciedlają w pełni naturalny przebieg chorób u ludzi. Jest to związane z różną fizjologią i budową narządu wzroku u człowieka i zwierząt. W związku z

powyższym, każdy wynik takiego eksperymentu jest jedynie aproksymacją zmian, jakie wystąpiłyby *in vivo* u człowieka. Jest to na pewno ograniczenie dla dyskusowania wyników takich badań, ale w niektórych przypadkach są one podstawą do wprowadzania danej procedury diagnostycznej lub terapeutycznej do praktyki medycznej.

Nawiązując do **Pracy VI**, w której analizowano zmiany biochemiczne w tkance ludzkiej w przebiegu stożka rogówki, w **Pracy VII** prezentowany jest opis doświadczenia, którego celem było ustalenie zmian biochemicznych zachodzących w rogówce pod wpływem w/w metody terapeutycznej. W doświadczeniu tym terapii fotodynamicznej poddano świeże rogówki pozyskane od zdrowych świń. Sposób, w jaki przeprowadzono procedurę terapeutyczną był identyczny do warunków w jakich przeprowadza się taki zabieg u ludzi. Rogówki poddane procedurze leczniczej były natychmiast zamrażane po jej zakończeniu w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; identycznie postąpiono z rogówkami kontrolnymi, czyli niepoddawany procedurze terapeutycznej – rogówki były zamrażane w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ natychmiast po ich odseparowaniu od gałki ocznej. W tej postaci obie grupy próbek zostały przekazane do dalszych analiz, które wykonano za pomocą spektroskopii NMR, według metodyki opisanej w pozostałych pracach.

W analizie metabolomu za pomocą spektroskopii HR MAS ^1H NMR okazało się, że jedynie poziomy glutationu, mrówczanu oraz leucyny były obniżone znacząco statystycznie w rogówkach poddanych procedurze fotodynamicznej. Nie było to zaskoczeniem, ponieważ wiadomo od lat, że efektem ubocznym terapii fotodynamicznej są wolne rodniki generowane w eksponowanej tkance. Stąd i poziomy dwóch substancji będących wymiataczami wolnych rodników – glutation i mrówczan – uległy nieznacznemu, ale znaczącemu statystycznie obniżeniu, prawdopodobnie w mechanizmie zużycia podczas wymiatania wolnych rodników. I mimo, że można polemizować, iż rogówka zwierzęca nie jest całkowicie identyczna z rogówką ludzką (aczkolwiek jakiegokolwiek różnice anatomiczne i histologiczne są minimalne), a liczba metabolitów oznaczonych za pomocą spektroskopii NMR też była ograniczona – brak znaczących zmian w dość szerokim spektrum metabolitów sugeruje, że metoda jest stosunkowo bezpieczna do stosowania u ludzi [68,71-73].

Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że w tym badaniu obserwowano nieodległe, bezpośrednie skutki zastosowania terapii fotodynamicznej na rogówkę. Dlatego można postawić pytanie, jakie są odległe biochemiczne skutki zastosowania terapii fotodynamicznej na tę tkankę, oraz jaka jest dynamika zmian metabolicznych zachodzących w tkance w ciągu pierwszych godzin od zastosowania procedury? Dalsze badania dotyczące tych zagadnień powinny dać odpowiedź na wyżej postawione pytania.

Rezultaty powyższego eksperymentu zostały wcześniej przedstawione na konferencji okulistycznej w USA (**Kryczka T.**, Wollensak G., Sel S., Midelfart A.: *Metabolic profile of porcine corneas after photodynamic cross-linking treatment. ARVO 2009 Annual Meeting, 2009, Fort Lauderdale, USA*).

Perspektywy badawcze i wnioski

Perspektywy badawcze zastosowania spektroskopii NMR w okulistyce

Uważa się, że przyszłość spektroskopii NMR leży w aplikacjach *in vivo*, które jako metody nieinwazyjne mogą również stanowić alternatywę dla metod inwazyjnych i uzupełnienie dla innych metod nieinwazyjnych w diagnostyce człowieka. Jednak w metodach *in vivo* spektroskopii NMR stosuje się znacznie niższe moce pola magnetycznego, aby zapobiec ewentualnym efektom ubocznym (np. wpływ promieniowania elektromagnetycznego na zdrowie człowieka), co odbija się na czułości pomiarów. W okulistyce dodatkowym ograniczeniem jest wielkość tkanki badanej w gałce ocznej oraz – wobec nawet ‘solidnego’ ustabilizowania pacjenta w trakcie badania, trudno jest zapobiec mimowolnym ruchom gałki ocznej, które sprawiają, że wynik analizy nie zawsze odzwierciedla profil metaboliczny właściwy dla tkanki badanej.

Na podstawie prezentowanych powyżej wyników badań zawartych w pracach wchodzących w cykl habilitacyjny, można wnioskować, że spektroskopia NMR zastosowana *in vitro* lub *ex vivo*, a w szczególności jej odmiana – HR MAS ¹HNMR – jest obiecującą metodą do obrazowania zmian biochemicznych zachodzących w rogówce. Technika ta znana od prawie trzech dekad dopiero w ostatnich latach przeżywa swój rozkwit w związku z pojawieniem się nowych rozwiązań technicznych, stałej poprawy jakości oprogramowania i pojawiania się nowych możliwości kojarzenia tej metodyki z innymi narzędziami analitycznymi. Uważa się, że w niedalekiej przyszłości metabolomika jako metoda fenotypowego obrazowania stanów patologicznych człowieka zdominuje diagnostykę kliniczną, pozwalając na indywidualne dopasowanie procedur leczniczych do pacjenta.

W przypadku okulistyki klinicznej względy etyczne, estetyczne i zdrowotne pacjentów (bo nie można usunąć części tkanki oka w celach diagnostycznych bez szkody dla funkcjonowania całego organu) jak również niewielkie rozmiary i złożoność budowy oka stanowią główne

czynniki ograniczające zastosowanie tej metody analizy *in vitro/ex vivo* w badaniach i diagnostyce chorób oka. Tym niemniej, są dziedziny okulistyki, w których spektroskopia NMR, a zwłaszcza jej odmiana HR MAS ¹HNMR, może stać się jednym z kluczowych narzędzi diagnostycznych i analitycznych.

Zdecydowanie należy do nich transplantologia; wyniki badań zawarte w omówionych powyżej publikacjach wskazują na znaczące różnice biochemiczne między rogówkami pobranymi od dawców, a rogówkami pobranymi od dawców i przechowywanych w medium w bankach tkanek oka. Co więcej, z biochemicznego punktu widzenia duże znaczenie mają również stan zdrowia dawców przed śmiercią i czas pobrania tkanek od zmarłych, oraz rodzaj systemu przechowywania tkanki (ciepły czy zimny), w którym umieszczone zostały rogówki. Te dane mogą być głównym argumentem przemawiającym za wprowadzeniem spektroskopii HR MAS ¹HNMR do standardów postępowania przy przeszczepianiu rogówek – z zastrzeżeniem, że powyższa metoda służyłaby wyłącznie do analizy biochemicznej/metabolomicznej pozostałości tkankowych po przeszczepie (np. rąbek rogówki).

Należy jednak podkreślić, że na chwilę obecną zaproponowanie analizy metabolomicznej z użyciem spektroskopii HR MAS ¹HNMR miałoby na celu tylko i wyłącznie ustalenie profilu biochemicznego/metabolicznego rogówki, przy którym występuje zwiększone ryzyko odrzucenia przeszczepu. Takie badanie (na dużej liczbie próbek) byłoby więc powiązane z obserwacją biorców (pod kątem epizodów odrzucania przeszczepów) i analizą danych biomedycznych dawców. Dopiero po ustaleniu takiego ‘negatywnego’ (lub ‘podejrzanego’) wzorca/profilu biochemicznego tkanki (skorelowanego ze zwiększonym odsetkiem odrzucania przeszczepów), spektroskopia NMR mogłaby się stać standardowym elementem diagnostyki klinicznej w okulistyce. W tym kolejnym etapie, metoda ta służyłaby weryfikacji ryzyka wystąpienia zjawiska odrzucenia przeszczepu rogówki u biorcy, ponieważ ze względów proceduralnych analiza tkanki miałaby miejsce dopiero po wykonaniu zabiegu przeszczepienia rogówki. Po transplantacji – ponieważ do wykonania analizy NMR powinny być używane pozostałości po przeszczepie, aby wcześniej nie naruszać integralności tkanki przeznaczonej do zabiegu. Stąd, analiza metodą spektroskopii NMR nie może być włączona do procedur weryfikacji tkanki (być dodatkowym kryterium EEBA lub EBAA) stosowanych przed przeszczepianiem. Natomiast jej wykonanie po przeszczepieniu i uzyskanie ‘niepokojących’ wyników analizy profilu biochemicznego tkanki (wskazujących na podwyższone ryzyko wystąpienia odrzucenia przeszczepu) może być wskazaniem do dokładniejszego nadzoru medycznego i farmakologicznego nad pacjentem-biorcą. To z kolei

mogłoby zapewnić bardziej skuteczne działania prewencyjne/profilaktyczne ograniczające liczbę epizodów odrzucania przeszczepu rogówki.

Spektroskopia HR MAS ^1H NMR może być również z powodzeniem wykorzystana w badaniach podstawowych w okulistyce. Część z obiecujących kierunków badań została zasygnalizowana w pracach prezentowanych powyżej; należą do nich m.in. takie zagadnienia jak opracowanie optymalnych warunków przechowywania rogówek w banku tkanek oka, weryfikacja czasów przechowywania rogówek przed przeszczepianiem – czyli ustalenie tzw. optymalnych okienek czasowych dla wykonania zabiegu dla rogówek pobranych z systemów przechowywania ciepłego lub zimnego.

Spektroskopia HR MAS ^1H NMR może też być z powodzeniem wykorzystana w badaniach nad chorobami powiązаныmi ze zmianami w rogówce lub innych tkankach oka. Jednak analizy byłyby tutaj ograniczone do tkanek uzyskanych od pacjentów – biorców, dla których choroba rogówki była wskazaniem do przeszczepu. Opcjonalne jest wykorzystanie techniki spektroskopii NMR do analizy wpływu procedur medycznych na profil metaboliczny tkanek oka, choć to ostatnie byłoby najbardziej właściwe do zastosowania na modelach zwierzęcych chorób oka.

Podsumowując, spektroskopia HR MAS ^1H NMR prezentowana w tym cyklu prac stanowi narzędzie analityczne o ogromnym potencjale diagnostycznym i badawczym do wykorzystania w okulistyce. I choć wykonanie samej analizy wymaga umiejętności związanych z obsługą zaawansowanego technologicznie urządzenia, to technika ta ma olbrzymią przewagę nad innymi – klinicysta lub badacz musi jedynie zamrozić próbkę natychmiast po pobraniu (przed przekazaniem do laboratorium NMR), a do wykonania analizy nie są konieczne żadne dodatkowe procedury ekstrakcyjne lub oczyszczające próbkę.

Wnioski

1. Hodowla tkankowa/ciepły system przechowywania rogówek, znacząco wpływa na skład biochemiczny i metabolizm rogówek, przy czym profil tych zmian zależy od czasu przechowywania tkanki w medium hodowlanym.

2. Wiek dawcy, czas jaki upłynął od śmierci dawcy do pobrania rogówki oraz obciążenie dawcy niektórymi nie-okulistycznymi chorobami przewlekłymi przed śmiercią – są czynnikami różnicującymi rogówki pod względem biochemicznym.
3. Transfer rogówek ze środowiska naturalnego (gałka oczna) do warunków *in vitro* przechowywania zimnego (np. medium: Eusol-C, +4 °C) znacząco zmienia profil biochemiczny rogówek, co oznacza, że ogólnie przyjęte założenie o wolnym tempie komórkowego metabolizmu w rogówkach w tych warunkach przechowywania, wymaga weryfikacji.
4. Przechowywanie zimne (medium: Eusol-C, +4 °C) przez okres 8 dni znacząco zmniejsza różnice biochemiczne pomiędzy rogówkami pobranymi w różnych odstępach czasowych od śmierci dawcy.
5. Przechowywanie zimne (medium: Eusol-C, +4 °C) przez okres 8 dni znacząco minimalizuje różnice biochemiczne pomiędzy rogówkami, których dawcy byli obciążeni przed śmiercią niektórymi nie-okulistycznymi chorobami przewlekłymi.
6. Rogówki przechowywane przez okres 2 tygodni w medium Eusol-C (+4 °C) mają skład biochemiczny najbardziej zbliżony do wartości wyjściowych sprzed pobrania od zdrowych dawców.
7. Stożek rogówki jest chorobą, w której profil biochemiczny rogówek młodych pacjentów przypomina profil biochemiczny rogówek od dawców 60+, co sugeruje, że w przebiegu tej choroby dochodzi do przyspieszonego starzenia się rogówki.
8. Terapia fotodynamiczna stosowana w leczeniu stożka rogówki jest procedurą stosunkowo bezpieczną, na co wskazuje brak znaczących zmian biochemicznych w tkankach pobranych bezpośrednio po zabiegu.
9. Spektroskopia NMR *in vitro/ex vivo*, a w szczególności jej odmiana – HR MAS ¹HNMR – jest obiecującą metodą do obrazowania zmian biochemicznych zachodzących w rogówkach, która może mieć zastosowanie w badaniach podstawowych dotyczących biochemii/zmian metabolicznych zachodzących w rogówce lub innych tkankach oka w warunkach fizjologicznych lub w stanach patologicznych oraz w przynajmniej w pewnym zakresie w

praktyce klinicznej.

Piśmiennictwo (wybrane pozycje na potrzeby autoreferatu):

1. Thakuria JV, Zaranek AW, Church GM, Berry GT. Back to the future: from genome to metabolome. *Hum Mutat.* 2012; 33: 809-12.
2. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 113: 108-20. doi: 10.1016/j.jpba.2014.12.017
3. McQueen BR, Martinez CE, Klyce SD. Corneal topography in cataract surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 1997; 8: 22-28.
4. Panjwani N. *Cornea and sclera.* 1997; London: Chapman & Hall.
5. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91: 326-335.
6. Qazi Y, Wong G, Monson B, Stringham J, Ambati BK. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull.* 2010; 81: 198-210.
7. Zagórski Z., Naumann GOH, Watson P. Choroby rogówki, twardówki i powierzchni oka. Wyd. Czelej, 2008
8. Robinson AB, Robinson NE. Origins of metabolic profiling. *Methods Mol Biol.* 2011; 708: 1-23.
9. Sévin DC, Kuehne A, Zamboni N, Sauer U. Biological insights through nontargeted metabolomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2014; 34C: 1-8. doi: 10.1016/j.copbio.2014.10.001.
10. Foltz WD, Jaffray DA. Principles of magnetic resonance imaging. *Radiat Res.* 2012; 177: 331-348.
11. Brown SP. Applications of high-resolution ¹H solid-state NMR. *Solid State Nucl Magn Reson.* 2012; 41: 1-27.
12. Midelfart A. Metabonomics-a new approach in ophthalmology. *Acta Ophthalmol.* 2009; 87: 697-703.
13. Ellinger JJ, Chylla RA, Ulrich EL, Markley JL. Databases and Software for NMR-Based Metabolomics. *Curr Metabolomics.* 2013; 1: doi: 10.2174/2213235X11301010028.
14. Brennan L. NMR-based metabolomics: from sample preparation to applications in nutrition research. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2014; 83: 42-9.
15. Greiner JV, Kopp SJ, Sanders DR, Glonek T. Organophosphates of the crystalline lens: a nuclear magnetic resonance spectroscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 198; 21: 700-713.
16. Greiner JV, Kopp SJ, Glonek T. Dynamic changes in the organophosphate profile upon treatment of the crystalline lens with dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982; 23: 14-22.
17. Greiner JV, Braude LS, Glonek T. Distribution of phosphatic metabolites in the porcine cornea using phosphorus-31 nuclearmagnetic resonance. *Exp Eye Res.* 1985; 40: 335-342.
18. Gottsch JD, Chen CH, Stark WJ, Maumenee AE. Corneal metabolism monitored with NMR spectroscopy. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1986; 84: 183-191.
19. Gottsch JD, Chen CH, Aguayo JB, Cousins JP, Strahlman ER, Stark WJ. Glycolytic activity in the human cornea monitored with nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Arch Ophthalmol.* 1986; 104: 886-889.
20. Lass JH, Greiner JV, Medcalf SK, Kralik MR, Meneses P, Glonek T. Effects of moist-chamber and McCarey-Kaufman medium storage on the metabolic status of the cornea: A ³¹Pmagnetic resonance analysis. *Ophthalmic Res.* 1988; 20: 368-375.
21. Cheng HM. Cornea-soft contact lens interaction: A nuclear magnetic resonance study. *Optom Vis Sci.* 1989; 66: 515-517.
22. Tsubota K, Kenyon KR, Cheng HM. Hard contact lens-induced metabolic changes in rabbit corneas. *Exp Eye Res.* 1989; 49: 769-775.

23. Greiner JV, Lass JH, Reinhart WJ, Medcalf SK, Glonek T. Phosphatic metabolites in keratoconus. *Exp Eye Res.* 1989; 49: 799-806.
24. Greiner JV, Lass JH, Glonek T. Noninvasive metabolic analysis of eye bank corneas: a magnetic resonance spectroscopic study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1989; 227: 295-299.
25. McCartney MD, Thomas DM, Mahendroo PP. An electron-microscopic and nuclear-magnetic-resonance spectroscopic evaluation of rabbit corneal epithelial wound-healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 2917-2925.
26. Greiner JV, Kopp SJ, Lass JH, Gold JB, Glonek T. Metabolic compatibility of abattoir and human corneas: An ex vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic study of intact tissues. *Cornea.* 1993; 12: 461-465.
27. Midelfart A, Dybdahl A, Muller N, Sitter B, Gribbestad IS, Krane J. Dexamethasone and dexamethasone phosphate detected by ¹H and ¹⁹F NMR spectroscopy in the aqueous humour. *Exp Eye Res.* 1998; 66: 327-337.
28. Midelfart A, Dybdahl A, Krane J. Detection of dexamethasone in the cornea and lens by NMR spectroscopy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1999; 237: 415-423.
29. Saether O, Risa O, Cejkova J, Krane J, Midelfart A. High resolution magic angle spinning ¹H NMR spectroscopy of metabolic changes in rabbit lens after treatment with dexamethasone combined with UVB exposure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004; 242: 1000-1007.
30. Saether O, Midelfart A, Risa O, Haraldseth O, Krane J. Proton decoupled ¹⁹F NMR spectroscopy of drugs used in eye treatment. *Spectroscopy Letters.* 2006; 39: 135-144.
31. Fris M, Cejkova J, Midelfart A. Changes in aqueous humour following single or repeated UVB irradiation of rabbit cornea. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245: 1705-1711.
32. EEBA Technical Guidelines Special Interest Group. Technical guidelines for ocular tissue. http://www.europeaneyebanks.org/files/Technical_Guidelines_Rev7_Jan2015Final.pdf; accessed 28-08-2015.
33. The Eye Bank Association of America. Medical Standards – November 2013 <http://www.restoreight.org/wp-content/uploads/2014/01/Medical-Standards-November-2013.pdf>; accessed 28-08-2015.
34. Ehlers N, Hjortdal J, Nielsen K. Corneal grafting and banking. *Dev Ophthalmol.* 2009; 43: 1-14. doi: 10.1159/000223833.
35. Redbrake C, Becker J, Salla S, Stollenwerk R, Reim M. The influence of the cause of death and age on human corneal metabolism. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 3553-56.
36. Redbrake C, Salla S, Vonderhecken M, Sieben P, Reim M. Tissue condition of human corneas before and after organ culture. Effect of donor cause of death. *Ophthalmologe.* 1997; 94: 573-577.
37. Redbrake C, Salla S, Frantz A. Changes in human donor corneas preserved for longer than 4 weeks. *Cornea.* 1998; 17: 62-65.
38. Redbrake C, Salla S, Frantz A, Reim M. Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmol Scand.* 1999; 77: 266-272.
39. Nejepinska J, Juklova K, Jirsova K. Organ culture, but not hypothermic storage, facilitates the repair of the corneal endothelium following mechanical damage. *Acta Ophthalmol.* 2010; 88: 413-419.
40. Thoft RA, Friend J. Corneal epithelial changes during midterm storage. *Invest Ophthalmol.* 1976; 15: 82-88.
41. Andersen J, Ehlers N. The influence of donor age and post mortem time on corneal graft survival and thickness when employing banked donor material (a five-year follow-up). *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1988; 66: 313-317.
42. Ehlers N. Corneal banking and grafting: the background to the Danish Eye Bank System, where corneas await their patients. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002; 80: 572-578.

43. Bohringer D, Reinhard T, Spelsberg H, Sundmacher R. Influencing factors on chronic endothelial cell loss characterized in a homogeneous group of patients. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86: 35–38.
44. Patel HY, Brookes NH, Moffatt L, Sherwin T, Ormonde S, Clover GM, McGhee CN. The New Zealand National Eye Bank study 1991-2003: a review of the source and management of corneal tissue. *Cornea.* 2005; 24: 576–582.
45. Cornea Donor Study Investigator Group, Gal RL, Dontchev M, Beck RW, Mannis MJ, Holland EJ, Kollman C, Dunn SP, Heck EL, Lass JH, Montoya MM, Schultze RL, Stulting RD, Sugar A, Sugar J, Tennant B, Verdier DD. The effect of donor age on corneal transplantation outcome results of the cornea donor study. *Ophthalmology.* 2008; 115: 620-626.
46. Al Swailem SA. Graft failure: II. Ocular surface complications. *Int Ophthalmol.* 2008; 28: 175–189.
47. Armitage WJ, Easty DL. Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 16–24.
48. Krohn J, Hovding G. The influence of donor age and cause of death on corneal endothelial cell density. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005; 83: 746–50.
49. Frontera JA, Kalb T. How I manage the adult potential organ donor: donation after neurological death (part 1). *Neurocrit Care.* 2010; 12: 103–10.
50. Stulting RD, Sugar A, Beck R, Belin M, Dontchev M, Feder RS, Gal RL, Holland EJ, Kollman C, Mannis MJ, Price F Jr, Stark W, Verdier DD; Cornea Donor Study Investigator Group. Effect of donor and recipient factors on corneal graft rejection. *Cornea.* 2012; 31: 1141–47.
51. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG et al. *The eye: basic sciences in practice.* 2002; Elsevier limited.
52. Mantelli F, Argueso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8: 477-483.
53. Goel M, Picciani RG, Lee RK, Bhattacharya SK. Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmol J.* 2010; 4: 52-59.
54. Armitage WJ. Preservation of human cornea. *Transfus Med Hemother.* 2011; 38: 143-147.
55. Camposampiero D, Tiso R, Zanetti E, Ruzza A, Bruni A, Ponzin D. Improvement of human corneal endothelium in culture after prolonged hypothermic storage. *Eur J Ophthalmol.* 2003; 13: 745-51.
56. Haug K, Azqueta A, Johnsen-Soriano S, Shahdadfar A, Drolsum LK, Moe MC, Røger MT, Romero FJ, Collins AR, Nicolaisen B. Donor cornea transfer from Optisol GS to organ culture storage: a two-step procedure to increase donor tissue lifespan. *Acta Ophthalmol.* 2013; 91: 219-25.
57. Panda A, Vanathi M, Kumar A, Dash Y, Priya S. Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol.* 2007; 52: 375-96.
58. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 1047–1055.
59. Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *Int Ophthalmol.* 2008; 28: 155-63.
60. Cher I. Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012; 40: 634-643.
61. Romero-Jimenez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye.* 2010; 33: 157-166.
62. Nemet AY, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The association of keratoconus with immune disorders. *Cornea.* 2010; 29: 1261-1264.
63. Nowak DM, Gajicka M. The genetics of keratoconus. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011; 18: 2-6.
64. Sugar J, Macsai MS. What causes keratoconus? *Cornea.* 2012; 31: 716-719.

65. Cristina KM, Brown DJ. The cascade hypothesis of keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*. 2003; 26: 139-146.
66. Ambekar R, Toussaint KC Jr., Wagoner JA. The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011; 4: 223-236.
67. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003; 135: 620-627.
68. Wollensak G. Corneal collagen crosslinking: new horizons. *Expert Review of Ophthalmology*. 2010; 5: 201-215.
69. Critchfield JW, Calandra AJ, Nesburn AB, Kenney MC. Keratoconus: I. Biochemical studies. *Exp Eye Res*. 1988; 46: 953-963.
70. Joseph R, Srivastava OP, Pfister RR. Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res*. 2011; 92: 282-298.
71. Shiraishi T, Fukusaki E, Miyake C, Yokota A, Kobayashi A. Formate protects photosynthetic machinery from photoinhibition. *J Biosci Bioeng*. 2000; 89:5 64-568.
72. Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19: 100-112.
73. Franco R, Cidłowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 1303-1314.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych oraz dydaktyczno-popularyzatorskich

5.1. Działalność naukowo-badawcza.

Ukończenie studiów medycznych i uzyskanie tytułu lekarza medycyny w sposób naturalny wiązało się z mojej strony z rozpoczęciem stażu podyplomowego w Szpitalu Bródnowskim w Warszawie i podjęcie przeze mnie działalności leczniczej w ośrodkach państwowych i prywatnych (Telekardiomed SA, Biorenix SA, NZOZ CMB w Warszawie). Przełomem dla mojej aktywności zawodowej było nawiązanie w 1999 roku współpracy naukowej z panem Prof. Pawłem Griebem z *Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN (CMDiK PAN)* w Warszawie (obecnie: *Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, IMDiK PAN*), a następnie podjęcie pracy rok później na stanowisku asystenta w Pracowni Farmakologii Doświadczalnej w wyżej wymienionym centrum badawczym. Zakres moich zainteresowań naukowych ulegał zmianom i poszerzał się w miarę pojawiania się nowych celów badawczych realizowanych w zespole, w którym pracowałem.

Poniżej, w chronologicznym ujęciu moje zainteresowania i realizowane tematy badawcze sprzed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk medycznych.

a) Realizacja projektu w ramach grantu KBN Nr 405F02412, którego głównym celem było opracowanie nośnika polimerowego zawierającego lek cytotoksyczny lub cytostatyczny. W

założeniu lek powinien być uwalniany w sposób ciągły w stężeniach terapeutycznych z w/w biodegradowalnego polimeru. Pośrednim celem projektu było uzyskanie takiej kompozycji biodegradowalnego polimeru z lekiem przeciwnowotworowym, aby uzyskać produkt o największym potencjale terapeutycznym dla leczenia pacjentów ze złośliwymi glejakami mózgu. Prace były prowadzone we współpracy między macierzystą jednostką (CMDiK PAN, Prof. Grieb), a zespołem Prof. Bero z Centrum Chemii Polimerów Polskiej Akademii Nauk w Zabrze oraz Prof. Marciniak z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. W trakcie realizacji tego projektu opracowano szereg biodegradowalnych polimerów o różnym składzie chemicznym zawierających pochodne nukleozydowe będące uznanymi lekami przeciwnowotworowymi (np. 5-fluorouracyl, 5FU; kladrybina, 2CdA).

Pierwsze moje naukowe doniesienia konferencyjne były związane z wynikami badań, w których prezentowane były biodegradowalność i uwalnianie substancji aktywnych z badanych konstruktywów polimerowych (**Kryczka T., Grieb P., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzyński P.**: *Kinetics of a nucleoside release from lactide- caprolactone and lactide-glycolide polymers in vitro. VII International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, 1999, Gdańsk, Polska*); prezentowany był wpływ różnych metod sterylizacji na (i) właściwości fizyko-chemiczne badanych materiałów polimerowych oraz (ii) farmakokinetykę uwalniania substancji aktywnych z konstruktywów polimerowych (**Kryczka T., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Marciniak B., Popielarz-Brzezinska M., Grieb P.**: *In vitro release of cytotoxic nucleoside analogs from lactide-caprolactone and lactide-glycolide polymers after sterilization with different methods. VIII International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, 2001, Gdańsk, Polska*).

Doskonałe efekty uwalniania kladrybiny z biodegradowalnych polimerów stały się przesłanką do zawężenia badań do analizy efektów sterylizacji radiacyjnej powyższych konstruktywów, co zostało zaprezentowane na kolejnej konferencji (**Kryczka T., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Marciniak B., Popielarz-Brzezinska M., Kazimierczuk Z., Grieb P.**: *Effect of sterilization of cladribine and cladribine-containing biodegradable copolymers with different doses of gamma radiation. Third Multidisciplinary Conference on Drug Research, MKNOL 2002, Piła, Polska*).

Efektom badań zrealizowanych w ramach tego projektu są prace oryginalne:

- **Kryczka T.**, Grieb P., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzyński P. Kinetics of a nucleoside release from lactide-caprolactone and lactide-glycolide polymers in vitro. *Acta Biochim Pol* 47:59-64, 2000;

IF-0,779; KBN/MNiSW-8; cytowania-4

- Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grieb P., **Kryczka T.**, Ryba M., Walski M. Copolymers based on lactide, glycolide and ε-caprolactone without heavy metals. Synthesis, properties and application in processes of nucleoside analogs' controlled release.

Engineering Biomater 5:21-2, 2002;

KBN/MNiSW-2

- **Kryczka T.**, Bero M., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Marciniak B., Popielarz-Brzezińska M., Grieb P. In vitro release of cytotoxic nucleoside analogs from lactide-caprolactone and lactide-glycolide polymers after sterilization with different methods. *Acta Biochim Pol* 49:205-10, 2002;

IF-0,600; KBN/MNiSW-8; cytowania-9

- **Kryczka T.**, Marciniak B., Popielarz-Brzezinska M., Bero M., Kasperczyk J., Dobrzynski P., Kazimierzczuk Z., Grieb P. Effect of gamma-irradiation on cladribine and cladribine-containing biodegradable copolymers. *J Control Release* 89:447-56, 2003;

IF-3,298; KBN/MNiSW-13; cytowania-7

- Bero M., Kasperczyk J., Dobrzynski P., Grieb P., **Kryczka T.**, Ryba M., Buntner B., Nowak M. Synthesis of biocompatible copolymers and their application in processes of steroid and nucleoside analogs' controlled release *Chemik* 57:49-54, 2004;

oraz jedna praca przeglądowa traktująca o perspektywach wykorzystania biodegradowalnych polimerów i pochodnych nukleozydowych w leczeniu złośliwych nowotworów mózgu:

- **Kryczka T.**, Grieb P. Nucleoside analogs in the treatment of primary malignant brain tumors *Neurol Neurochir Pol* 37:687-701, 2003).

KBN/MNiSW-5

b) Prawie równocześnie z badaniami nad polimerowymi nośnikami dla leków przeciwnowotworowych zaangażowany byłem w realizację projektu wspieranego przez Fundację Rozwoju Diagnostyki i Terapii w Warszawie, którego celem było opracowanie nowego związku chemicznego o potencjale leku przeciwnowotworowego.

Koncepcyjnie nowy związek chemiczny miał opierać się na idei tzw. 'proleku', w którym jedną ze składowych (lub obie składowe) miałyby być uznanymi i stosowanymi w chemioterapii lekami przeciwnowotworowymi połączonymi ze sobą wiązaniem estrowym. Zastosowanie powyższego wiązania estrowego miało unieczynić obie składowe proleku, ograniczając w ten sposób działania niepożądane związków na komórki i tkanki zdrowe, ale także umożliwić poprzez odpowiednie dobranie składowych chemicznych preparatu wybiórczą penetrację konstruktów do docelowych komórek nowotworowych. Następnie enzymatyczna hydroliza wiązania estrowego w komórkach nowotworowych miała aktywować jedną lub obie składowe komponenty proleku doprowadzając do cytotoksycznego oddziaływania składników proleku na komórki docelowe.

Projekt był realizowany przez instytut macierzysty (CMDiK PAN) we współpracy z zespołami krajowymi: Prof. Kazimierczuka (Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie), Prof. Kawiaka (Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego i Instytut Leków w Warszawie), Prof. Jedlińskiego (Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu) oraz zagranicznymi kierowanymi przez Prof. Vilpo i Prof. Hovinen (odpowiednio: University of Tampere Medical School and Laboratory Center of Tampere University Hospital, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, wszystkie w/w zlokalizowane w Finlandii). Badaniami objęto kilka pochodnych nukleozydowych i kwasów organicznych będących uznanymi lekami przeciwnowotworowymi stosowanymi np. w leczeniu nowotworów krwiopochodnych (np. kładrybina lub chlorambucyl), ale również konstrukty powyższych związków z nieaktywnymi przeciwnowotworowo kwasami organicznymi lub nukleozydami (np. kwas β -hydroksymasłowy, α -kwas liponowy, 2'-dezoksyadenozyna).

Rezultatem tych badań są doniesienia konferencyjne, podczas których prezentowana była koncepcja pochodnej nukleozydowej jako proleku o właściwościach przeciwnowotworowych (Grieb P., Wojtowicz R., Kawiak J., **Kryczka T.**, Kazimierczuk Z.: *5'-Esters of 2'-deoxy- and 2-chloro-2'-deoxyadenosine as prodrugs for differentiating agents. MKNOL 2000, Cieplice, Polska, komunikat ustny*), przedstawiane były właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne zsyntetyzowanych związków (Grieb P., **Kryczka T.**, Wojtowicz R., Kawiak J., Kazimierczuk Z.: *5'-Esters of 2'-deoxyadenosine and 2-chloro-2'-deoxyadenosine with differentiating agents. VIII International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, 2001, Gdańsk, Polska*) oraz wskazywane możliwe warianty połączenia wiązaniem estrowym pochodnej nukleozydowej o właściwościach cytotoksycznych (kładrybina) z polimerowymi formami kwasu β -hydroksymasłowego (Jedlinski Z., Juzwa M., Kurek A., Zawidlak B., Kawiak J., **Kryczka T.**, Grieb P.: *Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) – a new carrier for controlled drug*

release: synthesis and in vitro properties of PHB esters of cytotoxic nucleoside cladribine (2-CdA). VIII International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy, 2001, Gdańsk, Polska). Podsumowaniem tych badań była prezentacja najbardziej obiecujących estrów o właściwościach przeciwnowotworowych na konferencji poświęconej nowym koncepcjom i konstruktom prolekowym w Berlinie (Grieb P., **Kryczka T.**, Andrzejewska M., Stachnik K., Kazimierczuk Z.: Are 2'-deoxyadenosine esters potential antileukemic drugs? World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday, 2004, Nurnberg, Niemcy).

Oprócz doniesień zjazdowych rezultatem powyższych badań są prace oryginalne:

- Grieb P., **Kryczka T.**, Wójtowicz R., Kawiak J., Kazimierczuk Z. 5'-Esters of 2'-deoxyadenosine and 2-chloro-2'-deoxyadenosine with differentiating agents. *Acta Biochim Pol* 49:129-37, 2002;

IF-0,600; KBN/MNiSW-8; cytowania-2

- **Kryczka T.**, Stachnik K., Kozłowska M., Kazimierczuk Z., Hovinen J., Chrapusta S.J., Grieb P. *Acta Pol Pharm* 62:411-415, 2005;

KBN/MNiSW-6; cytowania-1

- **Kryczka T.**, Kazimierczuk Z., Kozłowska M., Chrapusta S.J., Vilpo L., Vilpo J., Stachnik K., Janisz M., Grieb P. Two novel nucleoside ester derivatives of chlorambucil as potential antileukemic prodrugs - a preliminary study. *AntiCancer Drugs*, 18: 301-310, 2007;

IF-2,357; KBN/MNiSW-27, cytowania-3

oraz dwa zgłoszenia patentowe:

- Jedlinski Z., Grieb P., Kawiak J., **Kryczka T.**, Luczyk-Juzwa M., Matuszowicz A., Lenz R. Novel esters of 3-hydroxybutyric oligomers and method of obtaining them. *Patent application No. PL344778*, 2002;

- Grieb P., Vilpo J., Kazimierczuk Z., Andrzejewska M., **Kryczka T.** New esters of adenosine nucleosides and carboxylic acid. *Patent application No. PL368093*; 2004).

Część wyników uzyskanych w trakcie prac badawczych realizowanych w ramach tego projektu stanowiło przedmiot mojej dyzertacji doktorskiej w 2006 roku.

c) Realizacja projektu wspieranego grantem KBN Nr 4P05A04117 związana była z poszukiwaniem zmian biochemicznych i morfologicznych zachodzących w mózgu w wyniku jego glukodeprywacji po dokomorowym (domózgowym) podaniu substancji wywołujących

tego rodzaju efekt. Projekt był realizowany we współpracy między macierzystą jednostką (CMDiK PAN), a zespołem Prof. Jasińskiego z Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie. W realizowanych doświadczeniach wykazano istotne zaburzenia metaboliczne i energetyczne zachodzące w mózgu szczura po podaniu dokomorowym streptozotocyny lub 2-deoksyglukozy. Na dodatek, niektóre obserwowane zmiany histochemiczne i morfologiczne zachodzące w tkance mózgowej szczura okazały się podobne do zmian zachodzących w chorobie Alzheimera u ludzi, choć pozostałe z wykonanych analiz nie potwierdzały powyższej zależności. Dokonane obserwacje sugerują występowanie korelacji między zaburzeniami metabolicznymi w mózgu a rozwojem tej choroby u ludzi, aczkolwiek prawdopodobnie nie stanowią głównego czynnika wywołującego to schorzenie.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w kilku pracach oryginalnych:

- Grieb P., Frontczak-Baniewicz M., Walski M., **Kryczka T.**, Fiedorowicz M., Jasinski A. Administration of 2-deoxyglucose affects brain ultrastructure without concomitant changes in brain energetic. *J Neurochem* 87 (Suppl. 1): 89, 2003;

- Grieb P., **Kryczka T.**, Fiedorowicz M., Frontczak-Baniewicz M., Walski M. Expansion of the Golgi apparatus in rat cerebral cortex following intracerebroventricular injections of streptozotocin *Acta Neurobiol Exp* 64:481-9, 2004;

IF-1,075; KBN/MNiSW-9; cytowania-10

- Grieb P., Gordon-Krajcer W., Frontczak-Baniewicz M., Walski M., Ryba M.S., **Kryczka T.**, Fiedorowicz M., Kulinowski P., Sulek Z., Majcher K., Jasinski A. 2-deoxyglucose induces beta-APP overexpression, tau hyperphosphorylation and expansion of the trans-part of the Golgi complex in rat cerebral cortex. *Acta Neurobiol Exp* 64:491-502, 2004.

IF-1,075; KBN/MNiSW-9; cytowania-4

d) Moje zainteresowania chorobami nowotworowymi, a zwłaszcza nowotworami rzadkimi wieku dziecięcego było podstawą do nawiązania współpracy z zespołem pediatrów z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W szczególności współpraca dotyczyła analizy występowania rzadkich chorób naczyniowych i nowotworowych w Polsce. Jej efektem jest wspólna publikacja będąca opisem przypadku i przeglądem literatury światowej na temat występowania i leczenia naczyniaków oraz zespołów rozsianej naczyniakowości u dzieci: - **Kryczka T.**, Nowakowska J., Cynkier D., Ermusz K. Haemangiomas and diffuse neonatal haemangiomatosis *Med Wieku Rozwoj* 8:209-16, 2004.

KBN/MNiSW-5

e) Pobyt w Norwegii na uniwersytecie w Trondheim (Norwegian University of Science and Technology, NTNU), w latach 2007-2010 na stanowisku Post-Doc, był okazją do poznania technik spektroskopii rezonansu magnetycznego NMR oraz ich zastosowanie w badaniach metabolomicznych struktur tkankowych ludzkiego oka. Część z wyników uzyskanych w trakcie tych badań, a które były kontynuowane po powrocie do Polski stanowią podstawę wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego i są omówione w punkcie powyżej (punkt 4 autoreferatu). Dostęp do zaawansowanego zaplecza naukowo-badawczego umożliwił mi poszerzenie prowadzonych badań o elementy wykraczające również poza główny temat badawczy realizowany w ramach grantu Research Council of Norway No. 170768 oraz Inger Holms Minnefond, Aase Bye og Trygve J.B. Hoffs fond i Mobility Stipend 2009, uzyskanych przeze mnie w trakcie pobytu w Norwegii. We współpracy z zespołem Prof. Cejkovej z Institute of Experimental Medicine Academy of Sciences of the Czech Republic w Pradze, badany był wpływ promieniowania UV na zmiany stężenia kluczowych substancji w przedniej części oka będących antyoksydantami lub mającymi działanie cytoprotekcyjne. Wyniki tych badań zaprezentowano na konferencji w Pekinie (*Midelfart A., Cejkova J., Kryczka T., Fris M.: Effect of UV radiation on taurine and hypotaurine level in anterior segment of the eye. International Congress of Eye Research (ISER), 2008, Pekin, Chiny*).

f) W trakcie mojej pracy naukowej na NTNU uczestniczyłem w licznych kursach i szkoleniach przeznaczonych dla studentów medycyny lub doktorantów. W szczególności interesująca była tematyka dt. najnowszych trendów diagnostycznych i terapeutycznych chorób człowieka z pogranicza nanomedycyny i biologii molekularnej. Moje doświadczenie zawodowe, wiedza oraz zainteresowania skłoniły mnie do aplikowania na studia magisterskie na NTNU w ramach *International MSc Program in Molecular Medicine*. Przyjęcie mnie na powyższe studia traktuję jako olbrzymie wyróżnienie wobec faktu, że kierunek ten studiów należy do najbardziej wymagających na NTNU – uczelni będącej szczególnie wysoko w rankingu europejskich uczelni technicznych – i gdzie liczba studentów na tym kierunku jest ograniczona (15 osób z krajów skandynawskich + 15 osób z innych krajów), a każdy z kandydatów jest dokładnie weryfikowany w trakcie rekrutacji pod względem kompetencji i dotychczasowych osiągnięć naukowych, a wykładowcami są naukowcy należący do światowej czołówki (np. laureaci nagrody Nobla z 2014 roku - May-Britt i Edvard Mozerowie).

W programie studiów znalazły się m.in. takie przedmioty jak: Animal Cell Culturing, Biobanking, Course in laboratory animal science for researchers, Experts in Teamwork,

Functional Genomics, Immunology, Introduction to Molecular Medicine, Microarrays and data analysis without laboratory training, Microarray Technology and Data Analysis, Nanomedicine – Diagnostics, Nanomedicine II – Therapy, Receptor Signalling and Trafficking.

Ponieważ musiałem pogodzić pracę naukowo-badawczą w ramach zatrudnienia na NTNU z podjętymi studiami, większość przedmiotów (wykłady i ćwiczenia) została przeze mnie zaliczona w ciągu dwóch ostatnich lat pobytu w Trondheim; końcowy egzamin i obrona pracy magisterskiej kończące studia odbyły się we wrześniu 2013 roku. Przyznano mi tytuł/stopień *magistra medycyny molekularnej (MSc in molecular medicine)*. Część wyników przedstawionych w pracy magisterskiej została opublikowana w następnym roku:

- **Kryczka T.**, Wylegala E, Dobrowolski D, Midelfart A. NMR Spectroscopy of Human Eye Tissues: A New Insight into Ocular Biochemistry. *The Sci World J.* 2014, ID: 546192, doi: 10.1155/2014/546192.

KBN/MNiSW-30

g) Powrót do kraju z Norwegii związany był z podjęciem pracy naukowo-dydaktycznej na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w Zakładzie Biologii Medycznej. Ze względu na profil badawczy w/w jednostki uczelnianej moja działalność naukowa w dużej części związana była z badaniami nad chorobami przenoszonymi przez stawonogi lub wywoływanymi przez pasożyty. Efektem tych badań były komunikaty zjazdowe (Chomicz L., Starościak B., Chruścikowska A., **Kryczka T.**, Iwańczyk B., Olędzka G. *Microorganisms transmitted by pests from genus Plodia /Insecta: Lepidoptera, Pyralidae/ as a risk for human health. XIII Międzynarodowe Sympozjum “Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite – znaczenie medyczne i sanitarne”, 2011, Kazimierz Dolny*) i oryginalne prace, których jestem współautorem:

- Chomicz L., Starościak B., Chruścikowska A., **Kryczka T.**, Iwańczyk B., Olędzka G. *Arthropods - Human and animal parasites. Microorganisms transmitted by pests genus Plodia (Insecta: Lepidoptera, Pyralidae) as a risk for human health. Red.: A. Buczek, Cz. Błaszak. Akapit, Lublin 2011, 157-165;*

- Chomicz L., Chruścikowska A., **Kryczka T.**, Olędzka G. Drobnoustroje transmitowane przez mole spożywcze- zagrożenie dla ludzkiego zdrowia. *Roczniki Warszawskiej Szkoły Zdrowia XI, Warszawa 2011, 109-114;*

- Chomicz L., Padzik M., Szaflik J.P., Nahorski W.L., **Kryczka T.**, Szaflik J. Monitoring of in vitro dynamics of Acanthamoeba strains isolated from infected eyes as a useful tool in keratitis management. *Exp Parasitol.* 145 Suppl:S73-7, 2014.

IF-1,638

h) Ze względu na aktywność zawodową (praca w zawodzie lekarza), posiadając na bazie własnych doświadczeń aktualną wiedzę na temat różnic w podejściu do badań klinicznych na terenie Norwegii, Unii Europejskiej i Polski, w 2013 roku przygotowałem i opublikowałem pracę poglądową dotyczącą różnic w przepisach traktujących o wykonywaniu eksperymentu medycznego w stanach nagłych:

- **Kryczka T.** Eksperyment medyczny w stanach nagłych. *Med Rodz.* 3:112-5, 2013.

KBN/MNiSW-5

i) Zainteresowanie wykorzystaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego NMR w badaniach nad chorobami zakaźnymi, zwłaszcza chorobami wątroby, zaowocowało nawiązaniem przeze mnie bliższej współpracy z ośrodkami w Kielcach (Klinika Chorób Zakaźnych Wojewódzkiego Szpitala Zespalonego oraz Uniwersytet Jana Kochanowskiego) i Warszawie (Zakład Pielęgniarstwa Chirurgicznego i Transplantacyjnego WUM). Realizując wspólny projekt badawczy, do chwili obecnej przygotowano i opublikowano 2 prace poglądowe: pierwsza traktująca o zastosowaniu technik rezonansowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia pacjentów z wirusowymi chorobami wątroby; druga – będąca omówieniem dostępnych technik metabolomicznych mających zastosowanie w hepatologii:

- **Kryczka T.**, Małkowski P., Zarębska-Michaluk D., Kryczka W. The perspectives of the use of metabolomics measures in viral hepatitis. *New Medicine* 18:57-62, 2014;

KBN/MNiSW-6

- **Kryczka T.**, Zarębska-Michaluk D., Małkowski P., Kryczka W. Narzędzia metabolomiczne w hepatologii. *Hepatologia* 15:176-181, 2015 doi: 10.5114/hepatologia.2015.51799).

j) Jednym z istotnych aspektów mojej pracy badawczej zawsze było poszukiwanie prostych związków chemicznych, mających potencjał terapeutyczny w różnych stanach chorobowych. Jedną z takich modelowych substancji jest karnozyna, znana od dziesięcioleci, której działanie w wielu schorzeniach człowieka zostało bardzo dobrze opisane, a w innych – wciąż odkrywane. Praktyczne aspekty wykorzystania karnozyny jako suplementu diety w leczeniu pacjentów (np. z odleżynami) są przedmiotem aktualnie prowadzonych badań, których koordynatorem jest Prof. Grieb (IMDiK PAN), we współpracy z Hospicjum Onkologicznym

św. Krzysztofa w Warszawie. Dotychczasowym efektem tych badań jest praca pogładowa omawiająca wpływ suplementacji diety karnozyną na skuteczność leczenia odleżyn:

- **Kryczka T.**, Grieb P. Supportive treatment of pressure ulcers with dietary supplementation *Clin Pharmacol Biopharm* 4:1-3, 2015; doi: 10.4172/2167-065X.1000130).

k) Działalność organizacyjna.

- w latach 2006-2010 – członek Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN im. Mirosława Mossakowskiego w Warszawie;

- od roku 2012 – członek Rady Programowej dla kierunku Pielęgniarstwo Wydziału Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego;

l) Kursy, szkolenia i warsztaty **niebędące** częścią studiów magisterskich i dyplomowych wymienionych powyżej w podpunkcie f):

Szkolenie medyczne z zakresu pediatrii “Elective program in pediatrics” at the University of Glasgow; Dept. of Child Health, Royal Hospital for Sick Children, lipiec-sierpień, 1994, Yorkhill, Glasgow, Szkocja

‘IBRO course in neuroscience’, IBRO i Akademia Medyczna we Wrocławiu, 10-18 lipca 2002, Wrocław

‘Boosting Baltic Framework Programme 6. Getting funding for life science projects, part I’, Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN i Narodowy Punkt Kontaktowy, 19-20 maja 2005, Warszawa

‘Kurs biologii molekularnej – sekwencjonowanie DNA’, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, 26-28 września 2005, Warszawa

‘Intellectual property & innovation workshop’, zorganizowany przez EC Directorate General Joint Research Centre, 28-29 września 2005, Ispra, Włochy

‘Boosting Baltic Framework Programme 6. Getting funding for life science projects, part II’, Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN i Narodowy Punkt Kontaktowy, 3-4 października 2005, Warszawa

‘Mechanizmy finansowe dla nauki’, Uniwersytet Jagielloński, 19 października 2005, Kraków

‘Immunogenetyczne podstawy doboru dawców komórek i narządów’, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 3-4 listopada 2005, Warszawa

‘Charakteryzacja białek: elektroforeza i Western blotting’, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 7-9 listopada 2005, Warszawa

‘Requirements for boron neutron capture therapy at a nuclear research reactor’ zorganizowany przez EC Directorate General Joint Research Centre i Nuclear Research Institute Rez, 11-12 listopada 2005, Praga, Czechy

‘Marie Curie Actions. Human Resources and Mobility’, Narodowy Punkt Kontaktowy, 15 listopada 2005, Warszawa

- 'Podstawy onkologii klinicznej', Polska Unia Onkologii Klinicznej, 21-25 listopada 2005, Warszawa
- 'Synthesis and characterization of biological/non biological interfaces', zorganizowany przez EC Directorate General Joint Research Centre, 29-30 listopada 2005, Ispra, Włochy (komunikat ustny: "The importance of research on bio-interfaces for biological and medical sciences")
- 'Podstawy biologii molekularnej', Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 23 października – 20 listopada 2006, Warszawa
- 'BIO and HEALTH in FP7', Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN i Narodowy Punkt Kontaktowy, 28 listopada 2006, Warszawa
- 'Innovative treatment concepts for liver metastases', zorganizowany przez EC Directorate General Joint Research Centre w Petten (Holandia) i University Hospital w Essen (Niemcy), 7-9 grudnia 2006, Essen, Niemcy
- 'Przygotowanie wniosków do 7. Programu Ramowego', Narodowy Punkt Kontaktowy, 8-10 stycznia 2007, Warszawa
- 'Cell culture methods in Neurotoxicology', Norwegian University of Science and Technology, 24 września – 12 października 2007, Trondheim, Norwegia
- 'Course in laboratory animal science for researchers', Veterinary School in Oslo, 22-26 października 2007, Trondheim, Norwegia; *uzyskano dyplom FELASA C*
- 'Bio-interfaces', zorganizowany przez EC Directorate General Joint Research Centre, 5-7 grudnia 2007, Ispra, Włochy
- '10th National Norwegian NMR Meeting', 16-18 stycznia 2008, Oppdal, Norwegia
- 'Magnetic Resonance Spectroscopy in clinics', Norwegian University of Science and Technology, 1- 6 kwietnia 2008, Trondheim, Norwegia
- XIII Hepatology Workshop, 28-31 maja 2008, Biała Rawska/k. Rawy Mazowieckiej, (komunikat ustny: „Heat Shock Proteins in Hepatitis C”)
- 'Brain Metabolism Studied by ¹³C Nuclear Magnet Resonance Spectroscopy and Other Methods', Norwegian University of Science and Technology, jesień 2008, Trondheim, Norwegia
- 'Magnetic Resonance Imaging (MRI)', Norwegian University of Science and Technology, jesień 2008, Trondheim, Norwegia
- 'The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis', 21-22 kwietnia 2009, Sztokholm, Szwecja
- 'How to optimise your chances for success in EU Framework Programme FP7' szkolenie zorganizowane przez Norwegian University of Science and Technology i SINTEF, 24 kwietnia 2009, Trondheim, Norwegia

'46-th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver', European Accreditation Council for Continuing Medical Education, 30 marca-3 kwietnia 2011, Berlin, Niemcy

'Diagnostyka obrazowa nowotworów wątroby i kwalifikacji do leczenia chorych z nowotworami wątroby', 18-22 września 2011, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

'Niwelowanie różnic – od nauki do praktyki', 21 maja 2012, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

'Dni Kliniczne Buska-Zdroju', 17-18 maja 2013, Busko-Zdrój

'Postępy w diagnostyce i terapii schorzeń rogówki. VII Międzynarodowe Sympozjum Okulistyczne' 5-7 marca 2015, Wisła (komunikat ustny: „Perspektywy zastosowania narzędzi metabolomicznych w badaniach nad chorobami oka”)

5.2. Działalność dydaktyczno-popularyzatorska.

Od momentu zatrudnienia w Zakładzie Biologii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w 2010 roku moja aktywność zawodowa wzbogaciła się o działalność dydaktyczną.

a) Od 2010 roku prowadzę lub prowadziłem zajęcia (wykłady, ćwiczenia i seminaria) ze studentami 1-go i 2-go stopnia Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Należą do nich zajęcia dydaktyczne przeznaczone dla studentów pielęgniarstwa (*Genetyka, Parazytologia, Epidemiologia*), położnictwa (*Kształcenie w zakresie embriologii i genetyki, Parazytologia*), ratownictwa medycznego (*Kształcenie w zakresie biologii medycznej*), dietetyki (*Genetyka, Kliniczny zarys chorób, Podstawy dietetyki klinicznej*).

b) Dodatkowo prowadzę zajęcia dydaktyczne na wydziale anglojęzycznym (English Division) Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla studentów medycyny w ramach programu studiów cztero- i sześciolletnich. Przedmiotem nauczania jest *Medical Parasitology*.

c) Obecnie pełnię funkcję koordynatora trzech przedmiotów dydaktycznych: *Epidemiologia, Epidemiologia Społeczna* i *Zarys Epidemiologii Katastrof*; jestem autorem sylabusów do tych przedmiotów.

d) Moja działalność dydaktyczna była i jest stosunkowo wysoko oceniana przez studentów wszystkich kierunków wymienionych powyżej: średnie oceny z ankiet studenckich za lata 2012/2013: **4,48**; 2013/2014: **4,54**.

e) 29 października 2012 roku zostałem uhonorowany wraz z zespołem Zakładu Biologii Medycznej WNoZ Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego nagrodą JM Rektora dla nauczycieli akademickich za osiągnięcia naukowe i dydaktyczne pierwszego stopnia, a w szczególności 'za współautorstwo wyróżniających się kompendiów i opracowań, dotyczących patogenicznych, oportunistycznych, genetycznych i środowiskowych czynników - mechanizmów zagrożenia ludzkiego zdrowia, istotnie poprawiających efekty kształcenia oraz przygotowanie zawodowe studentów nauk o zdrowiu i medycyny'.

f) Obecnie nadzoruję prace badawcze realizowane w Zakładzie Biologii Medycznej przez studentów – jestem opiekunem 7 prac magisterskich studentów pielęgniarstwa (w ramach studiów stacjonarnych lub niestacjonarnych). Dotychczas dwoje studentów obroniło swoje prace magisterskie pod moim kierownictwem.

g) Równolegle, od kilku lat prowadzę wykłady i ćwiczenia na Uniwersytecie Warszawskim z przedmiotów *Podstawy medycyny molekularnej* oraz *Historia medycyny molekularnej* dla studentów biologii, biofizyki, biotechnologii oraz kierunków specjalistycznych Wydziału Fizyki UW ('Zastosowania fizyki w biologii i medycynie', 'Biofizyka molekularna', 'Projektowanie molekularne i bioinformatyka') i kierunku interdyscyplinarnego studiów międzywydziałowych (Wydział Biologii i Fizyki UW, 'Bioinformatyka i biologia systemów').

h) Jako wykładowca brałem udział w szkoleniach i programach edukacyjnych przeprowadzanych w latach 2011-2013 dla farmaceutów. Szkolenia dotyczyły zmian zachodzących w przepisach refundacyjnych leków oraz nowych preparatów medycznych pojawiających się na rynku krajowym i europejskim.

i) Jestem aktywnym członkiem towarzystw naukowych polskich i międzynarodowych.

- Polskie Towarzystwo Lekarskie,
- Polskie Towarzystwo Hepatologiczne,
- Polskie Towarzystwo Genetyki Człowieka,
- Polskie Towarzystwo Parazytologiczne,
- Metabolomics Association.

Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Wyniki badań, w których uczestniczyłem, zaprezentowano w postaci kilkunastu doniesień i streszczeń prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach i sympozjach naukowych. Ponadto zostały przedstawione w formie 22 publikacji oryginalnych, których łączny współczynnik oddziaływania (impact factor, IF) wynosi 21,518 (w tym 1,638 w suplemencie czasopisma) i 6 publikacji poglądowych.

Jestem pierwszym autorem w 19 z wymienionych pozycji.

Pozostałe parametry oceny bibliometrycznej przedstawiają się następująco:

liczba punktów KBN/MNiSW – 290; IC – 113,95;

liczba cytowań 44, bez autocytowań według bazy Web of Science z dn. 11.06.2015 – 36;

index Hirscha z bazy Web of Science $h=4$.

Podpis Wnioskodawcy

Handwritten signature in blue ink, reading "Tomasz Fugle".