

## **AUTOREFERAT**

**z wykazem opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych  
oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych,  
współpracy naukowej i popularyzacji nauki**

**I. Imię i nazwisko:** Mariusz Flisiński

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

**5.07.2000** – dyplom lekarza, Wydział Lekarski Akademii Medycznej im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

**27.06.2007** – **stopień doktora nauk medycznych w zakresie medycyny** na podstawie rozprawy pt. ” Ocena liczby kapilar oraz średnicy i udziału procentowego włókien mięśniowych w wybranych mięśniach szkieletowych u szczurów w różnych stadiach eksperymentalnej przewlekłej choroby nerek”.

**Promotor Prof. dr hab. Jacek Manitius.**

**8.11.2007** - dyplom specjalisty w dziedzinie chorób wewnętrznych, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie.

**18.04.2011** – dyplom specjalisty w dziedzinie nefrologii, Centrum Egzaminów Medycznych w Łodzi.

**III. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

**1.10.2000-30.09.2001** - staż podyplomowy w Szpitalu Klinicznym nr 4 w Lublinie.

**1.01.2002-15.11.2007** - asystent w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej Akademii Medycznej w Bydgoszczy, od 24.11.2004 roku: Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

**15.11.2007 – 30.04.2011** – asystent w Katedrze i Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

**Od 1.05.2011** - adiunkt w Katedrze i Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

**IV. Wykaz prac stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 16 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

## **A. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Monotematyczny cykl publikacji pod tytułem „Udział czynników metabolicznych i czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF) w etiopatogenezie zaburzeń mikrostruktury mięśni szkieletowych w eksperymentalnym modelu przewlekłej niewydolności nerek”.

## **B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**

1. Flisiński M, Brymora A, Elminowska-Wenda G, Bogucka J, Walasik K, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Influence of different stages of experimental chronic kidney disease on rats locomotor and postural skeletal muscles microcirculation. *Ren Fail.* 2008;30(4):443-51.

IF: 0,657

Punktacja KBN/MNiSzW: 10,00

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu operacji nefrektomii w celu wyindukowania modelu eksperymentalnego przewlekłej choroby nerek u szczurów, pobraniu materiału do badań analitycznych, wyizolowaniu próbek mięśni szkieletowych, przeprowadzeniu oceny morfometrycznej mikrokrażenia, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

2. Flisiński M, Brymora A, Elminowska-Wenda G, Bogucka J, Walasik K, Stefańska A, Stróżecki P, Manitius J. Morphometric analysis of muscle fibre types in rat locomotor and postural skeletal muscles in different stages of chronic kidney disease. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(4):567-76.

IF: 2,386

Punktacja KBN/MNiSzW: 25,00

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu operacji nefrektomii w celu wyindukowania modelu eksperymentalnego przewlekłej choroby nerek u szczurów, wyizolowaniu próbek mięśni szkieletowych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

3. Flisiński M, Brymora A, Bartłomiejczyk I, Wiśniewska E, Gołda R, Stefańska A, Pączek L, Manitius J. Decreased hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastrocnemius muscle in rats with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2012;35(6):608-18.

IF: 1,596

Punktacja KBN/MNiSzW: 20,00

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu operacji nefrektomii w celu wyindukowania modelu eksperymentalnego przewlekłej choroby nerek u szczurów, wyizolowaniu próbek mięśni szkieletowych, udziale w procedurze izolacji DNA z mięśni i badaniu ekspresji genów metodą PCR, opracowaniu wyników poziomu ekspresji genów metodą delta-delta Ct, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

4. Flisiński M, Wiśniewska-Chudy E, Brymora A, Stefańska A, Stróżecki P, Manitius J. Chronic kidney disease leads to HIF-1 alfa to HIF-2 alfa switch in the gastrocnemius muscle. J Physiol Pharmacol. 2017;68(3): 419-425.

IF: 2,883

Punktacja KBN/MNiSzW: 25.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu operacji nefrektomii w celu indukowania modelu eksperymentalnego przewlekłej choroby nerek u szczurów, wyizolowaniu próbek mięśni szkieletowych, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

**Sumaryczna wartość punktacji prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:**

**IF: 7,522**

Punktacja KBN/MNiSzW: 80

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

Tematem badań, które uznałem za moje osiągnięcie naukowe przedstawione w punkcie IV, była ocena udziału zaburzeń metabolicznych i czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF) w etiopatogenezie zaburzeń mikrostruktury mięśni szkieletowych w eksperymentalnym modelu przewlekłej niewydolności nerek”.

Prace składające się na przedstawiony cykl publikacji charakteryzuje to, że zostały przeprowadzone w dwóch różniących się funkcją mięśniach szkieletowych oraz jednocześnie oceniano wpływ różnych stadiów przewlekłej choroby nerek w modelu eksperymentalnym u szczurów. Omawiane badania zostały przeprowadzone w Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, we współpracy z Katedrą Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy, Kliniką Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Instytutem Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy oraz Katedrą i Zakładem Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedrą i Zakładem Genetyki Molekularnej Komórki, Katedrą i Zakładem Patomorfologii Klinicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Mięśnie szkieletowe są największą tkanką organizmu, stanowią 40% masy ciała i odpowiadają za 20-30% podstawowej przemiany materii (Rolfe 1997). Ponadto są miejscem wychwytu glukozy i jej magazynowania w formie glikogenu. Stanowią ważny magazyn białka oraz źródło aminokwasów (alaniny i glutaminy), które uwalniane są w przypadku zwiększonego zapotrzebowania energetycznego ustroju i wykorzystywane w procesie glukoneogenezy (Argilés 2016). Mięśnie szkieletowe są heterogenną tkanką zbudowaną z włókien, które różnią się przemianami metabolicznymi oraz kurczliwością. Włókna typu I (wolne, oksydatywne) charakteryzują się dużą liczbą mitochondriów, wysoką zawartością

mioglobiny i gęstą siecią naczyń włosowatych. Włókna typu IIX i IIB (szybkie, glikolityczne) mają na ogół większą powierzchnię przekroju, wysoką zawartość układów glikolitycznych i mniej rozwinięte unaczynienie. Natomiast włókna typu IIA (szybkie, oksydatywne) wykazują pośrednie właściwości (Favier 2015).

Mięśnie różnią się również funkcją, jaką pełnią w ustroju. Wyróżniamy mięśnie posturalne, antygrawitacyjne, które specjalizują się w utrzymaniu prawidłowej postawy ciała. Do tej grupy zalicza się mięśnie tułowia i wybrane mięśnie kończyn, głównie prostowniki. Charakteryzują się one większą zawartością włókien oksydacyjnych, które mogą wytrzymywać obciążenia przez dłuższy okres czasu. Natomiast mięśnie lokomocyjne, to pozostałe mięśnie kończyn, przede wszystkim zginacze, które zbudowane są głównie z włókien glikolitycznych (Gramsbergen 1998). Różnice dotyczą również sposobu pobudzania mięśni, wykazano bowiem, że jednostki motoryczne włókien wolnych charakteryzują się ciągłą aktywnością o niskiej częstotliwości, związaną z utrzymywaniem postawy ciała. Natomiast jednostki motoryczne włókien szybkich cechuje seria pobudzeń wysokiej częstotliwości, związanych z aktywnością ruchową, z następczymi długimi przerwami w okresie spoczynku. Dlatego w warunkach podstawowych mięśnie wolne, oksydatywne są bardziej aktywne niż mięśnie szybkie. (Hennig 1985). Ponad 90% energii wytwarzanej przez komórki mięśni pochodzi z przemian tlenowych. W spoczynku, w warunkach normoksji, śródmięśniowe ciśnienie parcjalne tlenu ( $PO_2$ ) wynosi około 27 mmHg i może spadać do 2-3 mmHg w czasie wysiłku fizycznego o intensywności  $>50\%$  maksymalnego wychwyty tlenu (Richardson 1995). Mitochondria są ostatecznym celem  $O_2$  w komórkach mięśniowych. Wykazano, że  $PO_2$  przy którym dochodzi do zahamowania metabolizmu mitochondriów, wynosi około 1,25 mmHg (Richmond 1997). Funkcją mikrokrażenia mięśni szkieletowych, w których znajduje się około 6% krwi, jest wymiana odżywcza i gazowa pomiędzy krwią a płynem tkankowym. Jest ono również podstawowym miejscem powstawania oporu obwodowego i regulacji ciśnienia tętniczego (Korthuis 2011). Mikrokrażenie w mięśniach szkieletowych jest przystosowane do ich metabolizmu. Przepływ krwi w mięśniach wynosi od 5 do 10 ml/min/100 g w warunkach spoczynku i może osiągać 80-100 ml/min/100 g podczas maksymalnego wysiłku w niektórych regionach mięśni. Tak duży wzrost przepływu krwi w mięśniach szkieletowych podczas wysiłku jest konieczny, aby zaspokoić 20–50 krotny wzrost zapotrzebowania na tlen i substancje odżywcze oraz usuwanie produktów przemiany materii i utrzymać wysokie tempo przemian metabolicznych (Korthuis 2011). Perfuzja mięśni posturalnych w warunkach spoczynku jest bardziej jednorodna, a czas przepływu erytrocytów dłuższy, co zapewnia lepszą dostawę tlenu w porównaniu z mięśniami szybkimi. Natomiast w czasie wysiłku fizycznego prędkość przepływu krwi jest szybsza w mięśniach szybkich, w celu zapewnienia lepszego usuwania metabolitów. Ponadto naczynia krwionośne w mięśniach posturalnych są mniej wrażliwe na noradrenalinę i stymulację współczulną, co pomaga utrzymać w nich przepływ nawet wtedy, gdy zostanie on przekierowany od mięśni do innych narządów (Hudlicka 2011). Zmniejszenie dostępności tlenu zaburza homeostazę mięśni szkieletowych i jest częstym zjawiskiem zarówno w warunkach fizjologicznych – wysiłek fizyczny, pobyt na dużej wysokości nad poziomem morza, jak i patologicznych – niedokrwistość, miażdżyca tętnic, niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc (Favier 2015).

W przebiegu przewlekłej choroby nerek (PChN) dochodzi do osłabienia siły mięśniowej, zmniejszenia masy mięśni oraz zmniejszenia wydolności fizycznej (Campistol 2002). Te nieprawidłowości wraz z zaburzeniami mikrostruktury mięśni określa się terminem miopatii mocznicowej (Serratrice 1967). Występują dwie formy uszkodzenia mięśni w PChN – pierwsza dotyczy mięśni dystalnych i jest związana najczęściej z neuropatią, a druga dotyczy głównie mięśni proksymalnych (Fahal 2014). Najczęściej opisywanym zaburzeniem

struktury mięśni w PChN jest selektywna atrofia włókien szybkich (typu II) z ich formowaniem się w grupy (grouping), występująca zwłaszcza u pacjentów hemodializowanych z współistniejącymi objawami niedożywienia białkowo-kalorycznego (Fahal 1997). W patogenezie uszkodzenia mięśni w przebiegu PChN bierze się pod uwagę zmniejszoną aktywność fizyczną (unieruchomienie), niedobór aminokwasów wynikający z diety niskobiałkowej (Teplan 2000), niedobory witaminy D (Wanic-Kossowska 1996), wtórną nadczynność przytarczyc (Smogorzewski 1988), nieprawidłową funkcję mitochondriów (Utaka 2005) oraz stan zapalny (Stenvinkel 2005). Pomimo intensywnych badań wiele aspektów uszkodzenia mięśni w przebiegu PChN nie zostało do końca poznanych. Wraz z obniżającą się filtracją kłębuszkową (GFR) dochodzi do nagromadzenia się w ustroju związków o działaniu prozapalnym, takich jak zaawansowane produkty glikacji (AGE) oraz nasilenia stresu oksydacyjnego w wyniku obniżenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. dysmutazy nadtlenkowej (Kaysen 2001). AGE zaczynają gromadzić się w organizmie, gdy wartości GFR obniża się poniżej 40-80 ml/min (Hou 2004). Przewlekły stan zapalny jest powszechnym zaburzeniem stwierdzanym już we wczesnych stadiach PChN i charakteryzuje się zwiększonym stężeniem białka ostrej fazy (CRP), interleukiny 6 (Il-6) oraz czynnika martwicy nowotworów – alfa (TNF- $\alpha$ ) (Stenvinkel 2005). Stan zapalny i kwasica metaboliczna odgrywają główną rolę w eskalacji procesów katabolicznych, powodując wzrost degradacji białek w mięśniach szkieletowych przez układ proteazy ubikwitynowej zależnej od ATP i prowadzą do ubytku masy mięśniowej (sarkopenii) (Mitch 1996). Ponadto stan zapalny, a także zwiększone stężenie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) i N-metyl-L-argininy, AGE oraz homocysteiny w przebiegu PChN odpowiadają za przedwczesne starzenie się komórek śródbłonka naczyniowego i jego dysfunkcję (Goligorsky 2015). W warunkach fizjologicznych śródbłonek odpowiada za regulację przepływu krwi, przebudowę naczyń i właściwości przeciwzapalne. Komórki śródbłonka posiadają zdolność do proliferacji, migracji i tworzenia nowych naczyń pod wpływem czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF). Śródbłonek jest źródłem czynników wzrostu, takich jak płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF) i transformujący czynnik wzrostu (TGF), które rekrutują perycyty do nowo utworzonych kapilar (Prior 2004). Wykazano, że komórki progenitorowe śródbłonka pochodzące ze szpiku kostnego (EPC), biorą udział w przebudowie i naprawie naczyń (Asahara 1999). Uszkodzenie śródbłonka, pod wpływem toksyn mocznicowych, prowadzi do zahamowania syntezy NO. Odpowiada to za nieprawidłową wazorelaksację oraz zwiększone przyleganie i migrację monocytów, zwiększoną agregację płytek krwi, akumulację lipidów, wzrost ekspresji inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) w śródbłonku i wiąże się z nieprawidłowym tworzeniem kapilar i rozrzedzeniem struktury mikrokrażenia (Goligorsky 2005). Przewlekłe zmniejszenie dostępności NO, w wyniku zwiększonej generacji wolnych rodników (ROS), prowadzi do zmniejszenia liczby kapilar w mięśniach i zwiększenia sztywności naczyń (Frisbee 2005). Dysfunkcja śródbłonka w dużych tętnicach odpowiada za rozwój miażdżycy, podczas gdy w naczyniach oporowych i mikrokrażeniu prowadzi ona do rozwoju nadciśnienia tętniczego i oporności na insulinę (Stehouwer 2004).

Obserwacja, że chorzy z PChN mają zmniejszoną wydolność fizyczną, pomimo wyrównania niedokrwistości leczeniem erytropoetyną (Marrades 1996), zasugerowała istnienie defektu w transporcie tlenu. Badania oceniające strukturę mikrokrażenia w mięśniach szkieletowych w PChN wykazały do tej pory przeciwstawne wyniki. Wykazano bowiem redukcję o 25% liczby kapilar w mięśniu prostym brzucha w PChN w okresie przeddializacyjnym (Sakkas 2003), jak i w mięśniu obszernym bocznym u chorych leczonych hemodializami (Wagner 2001). Natomiast w badaniu przeprowadzonym u szczurów po zabiegu nefrektomii 5/6, nie stwierdzono ubytku kapilar w mięśniu lędźwiowym, podczas gdy

obecny był selektywny ubytek w mięśniu sercowym (Amann 1997). Obserwowane zaburzenia struktury mikrokrążenia w mięśniu sercowym były niezależne od wartości ciśnienia tętniczego, co sugerowało inny patomechanizm ich rozwoju (Amann 1995). Stwierdzono również większą gęstość kapilar w mięśniu brzuchatym łydki w grupie chorych hemodializowanych w porównaniu z grupą leczoną dializą otrzewnową (Sakkas 2004). Zatem istotne rozbieżności w wynikach oceniających mikrokrążenie w mięśniach w PChN, mogą wynikać z różnic w budowie i funkcji badanych mięśni, różnego stadium zaawansowania PChN, interakcji ze stosowanym leczeniem farmakologicznym lub formą leczenia nerkozastępczego. Z tego powodu podjąłem się przeprowadzenia dalszych badań eksperymentalnych w tym zakresie.

### **Praca 1.**

W pracy tej kompleksowo analizowano wpływ różnych stadiów PChN na strukturę mikrokrążenia w funkcjonalnie różnych mięśniach szkieletowych – lokomocyjnym, mięśniu brzuchatym łydki (MG), pełniącym funkcję zginacza kończyny oraz posturalnym, mięśniu najdłuższym piersiowym (ML), pełniącym funkcję prostownika grzbietu. Badaną populację stanowiły samce szczurów Wistar, które losowo przydzielono do trzech badanych grup. W grupie kontrolnej (CON) przeprowadzano operację pozorowaną, w czasie której z dostępu lędźwiowego, chirurgicznie docierano do nerek w przestrzeni zaotrzewnowej. W grupie CKD1/2 przeprowadzono zabieg jednostronnej nefrektomii, natomiast w grupie CKD5/6 zabieg jednostronnej nefrektomii z jednoczasową resekcją kory drugiej nerki w celu wytworzenia modelu nefrektomii 5/6 miąższu nerek. Po 4 tygodniach od zabiegu dokonano pomiaru ciśnienia tętniczego metodą krwawą w tętnicy szyjnej, oceniono przyrost masy ciała, pobrano krew na badania laboratoryjne oraz próbki mięśni szkieletowych do badań histologicznych. W celu wyróżnienia kapilar, próbki mięśni barwiono na obecność fosfatazy alkalicznej. Liczba naczyń włosowatych została oszacowana przez jednego obserwatora na preparatach o grubości 10  $\mu\text{m}$ , przy powiększeniu 125x, przy użyciu systemu Image Analysis System Q 500 MC firmy Leica. Ocenę morfometryczną mikrokrążenia przeprowadzono analizując następujące wskaźniki: gęstość kapilar (CD), tj. liczbę naczyń włosowatych na 1mm<sup>2</sup> tkanki mięśniowej, współczynnik C: F (liczba kapilar przypadających na 100 włókien mięśniowych), współczynnik CC/F (liczba kapilar pozostających w kontakcie z jednym włóknem mięśniowym) oraz pomiar średniej odległości pomiędzy najbliższymi kapilarami (ICD).

**Istotną, nową obserwacją tej pracy było stwierdzenie, że do rozrzedzenia struktury mikrokrążenia mięśni szkieletowych dochodzi już we wczesnych stadiach PChN, oraz że zaburzenia te są bardziej nasilone w mięśniach związanych z funkcją lokomocyjną (MG) niż posturalną (ML).**

W mięśniu MG analizowane wskaźniki mikrokrążenia były istotnie zredukowane w grupach CKD1/2 i CKD5/6 w porównaniu z kontrolną, odpowiednio o 53% i 46% dla C:F, o 56% i 47% dla CD, o 44% i 48% dla CC/F. Natomiast ICD wzrosła odpowiednio o 41% w CKD1/2 i o 48% w CKD5/6 w porównaniu z CON. Podczas, gdy w mięśniu ML analizowane wskaźniki mikrokrążenia były istotnie niższe w grupie CKD1/2 i CKD5/6, w porównaniu z kontrolną, odpowiednio o 33% i 20% dla C:F, o 33% i 11% dla CD, o 20% i 25% dla CC/F. ICD wzrosła o 14% w CKD5/6 i nie różniła się istotnie w grupie CKD1/2 w porównaniu z CON.

Pomimo istotnie wyższych wartości ciśnienia tętniczego w grupie CKD5/6 w porównaniu z grupą CKD1/2 i CON (145/95 vs. 107/87 i 119/77 mmHg,  $p<0,05$ ) wykazano podobny deficyt kapilar w grupach CKD1/2 i CKD5/6. Stwierdzono odmienne wartości współczynników korelacji pomiędzy stężeniem kreatyniny i ciśnieniem tętniczym, a

wskaźnikami oceniającymi mikrokrazenie w obu analizowanych mięśniach w grupie CKD5/6. **Korelacje te sugerują, że pierwotne zmiany zachodzące w mikrokrazeniu mięśni szkieletowych mogą być niezależne od nadciśnienia tętniczego.** Ocena stanu zapalnego wykazała istotnie wyższe stężenie haptoglobiny w obu grupach CKD w porównaniu z kontrolną. Nie stwierdzono istotnych różnic w jego nasileniu wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek. Natomiast stężenie białka MCP-1, będącego wykładnikiem stanu zapalnego toczącego się w ścianie naczynia i dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, narastało istotnie wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek w porównaniu z kontrolą. Analiza stężenia VEGF i PDGF w surowicy krwi nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami, co wskazuje, że wykazane zaburzenia mikrokrazenia nie są zależne od systemowego stężenia czynników wzrostu.

**Prawdopodobnie stan zapalny obecny w obu grupach CKD, poprzez indukowanie dysfunkcji śródbłonna, której wyrazem było istotnie wyższe stężenie MCP-1, może odpowiadać za zmniejszenie liczby kapilar w badanych mięśniach w PChN.** MCP-1 jest chemokiną wytwarzaną przez śródbłonek, komórki mięśni gładkich naczyń i makrofagi pod wpływem CRP i TNF- $\alpha$ . Jej zwiększona sekrecja powoduje infiltrację ściany naczyniowej przez monocyty/makrofagi, co indukuje stan zapalny w ścianie naczynia i wiąże się zahamowaniem syntezy NO przez śródbłonkową syntazę tlenku azotu (eNOS) oraz zmianę fenotypu mięśni gładkich z kurczliwych na syntetyzujący (Chen 2004). Ponadto inhibitory eNOS, jak N-nitro-L-arginina, której stężenie wzrasta w PChN, poprzez zmniejszenie dostępności NO odpowiadają za wzrost ciśnienia tętniczego, zmniejszenie średnicy tętniczek, obniżenie ekspresji VEGF i jego receptora VEGFR-2 oraz zmniejszenie proliferacji kapilar w mięśniach stymulowanych prądem (Milkiewicz 2005).

Prace innych autorów sugerują, że na wartość wskaźników C:F i CD może mieć wpływ tempo wzrostu zwierząt, hipoksja i immobilizacja (Hepple 2000; Tymł 1999; Deveci 2001), natomiast wskaźniki CC/F i ICD bardziej korelują z rzeczywistą odległością dla dyfuzji tlenu pomiędzy kapilarami a komórką. Dlatego obecny istotnie mniejszy przyrost masy ciała stwierdzany wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek w grupach CKD5/6 i CKD1/2 w porównaniu z CON (33 i 63 vs. 115 gram,  $p < 0,05$ ) mógł zafałszować uzyskane wyniki wskaźników C:F i CD, sugerując tendencję do ich większej redukcji w grupie CKD1/2 niż CKD5/6. Podczas, gdy wartości wskaźników CC/F i ICD przemawiają za większym rozrzedzeniem mikrokrazenia w grupie CKD5/6 w porównaniu z CKD1/2. **Większy ubytek kapilar w mięśniu MG niż ML wskazuje na odmienną odpowiedź badanych mięśni na zaburzenia metaboliczne w przebiegu PChN, zależną od różnic w budowie i metabolizmie włókien lub lokalnej regulacji przepływu krwi. Może również wynikać z różnic w aktywności fizycznej pomiędzy badanymi mięśniami.** Szczury z grup CKD wydawały się być mniej aktywne (obserwacja subiektywna), co mogło przełożyć się na większy wpływ immobilizacji na mięśnie lokomocyjne niż posturalne. Wykazano (Tymł 1999), że immobilizacja mięśni odpowiadała za szybsze (2 w stosunku do 8 tygodni) i bardziej nasilone rozrzedzenie struktury mikrokrazenia w mięśniu brzuchatym łydki (MG) niż w mięśniu prostowniku długim palców (EDL). Większy przepływ krwi w mikrokrazeniu EDL niż MG, wywierał modulujący wpływ i zwalniał tempo ubytku kapilar. Z tego powodu immobilizacja mogła również przełożyć się na uzyskane w mojej pracy wyniki.

## Praca 2

W kolejnej pracy omawianego cyklu, analizowałem wpływ PChN na średnicę oraz rozkład procentowy włókien mięśniowych, w tym samym modelu eksperymentalnym, jak w pracy 1. W celu zróżnicowania typów włókien mięśniowych przeprowadzono jednocześnie reakcję na aktywność reduktazy NADH (dwunkleotydu nikotynamido-adeninowego) i miofibrilarnej

ATP-azy (adenozynotrifosfatazy) z dostosowaniem pH płynu preinkubacyjnego do 4,10 (Ziegan 1979). Dokonano pomiaru średnicy poszczególnych typów włókien mięśniowych, przy zastosowaniu metody pomiaru „najmniejszej średnicy” według Brooke’a (Brooke 1970). Na podstawie przeprowadzonej reakcji barwnej wyróżniono cztery typy włókien mięśniowych: typ I – włókna czerwone, wolne o metabolizmie tlenowym; typ IIA – włókna białe, szybkie o przewodzie metabolizmu tlenowego; typ IIX – włókna białe, szybkie o przewodzie metabolizmu beztlenowego; typ IIB – włókna białe, szybkie o metabolizmie beztlenowym.

Wraz z progresją PChN, szczury otrzymujące dietę zawierającą 17% białka, charakteryzowały się istotnie mniejszym przyrostem masy ciała, ocenianym w 4 tygodniu eksperymentu. Analiza ilości spożytej karmy i jej kaloryczności wykazała spadek o około 10% w grupie CKD5/6 w porównaniu z CON. W obu grupach CKD wykazano tendencję do niższego stężenia albumin w porównaniu z CON. Stwierdzono tendencję do mniejszej średnicy wszystkich typów włókien mięśniowych, w obu badanych mięśniach, w grupie CKD5/6 w porównaniu z CON. Zmiany te były bliskie osiągnięcia istotności statystycznej w odniesieniu do włókien typu IIB w mięśniu ML w grupie CDK5/6 w porównaniu z CON.

Zmniejszenie masy ciała, atrofia włókien mięśni szkieletowych w przebiegu PChN, odzwierciedla systemowe niedobory białka i jest składnikiem zespołu wyniszczenia białkowo-energetycznego (PEW) (Fouque 2008). Regulacja równowagi białek mięśniowych w PChN jest zaburzona w wyniku zmniejszonego apetytu oraz zwiększonego katabolizmu mięśni przez układ ubikwityna-proteasomy pod wpływem cytokin zapalnych. (Mitch 1996). Potwierdzono, że zwiększone stężenie cytokin prozapalnych i TNF- $\alpha$  poprzez aktywację szlaku czynnika jądrowego kappa –beta (NF- $\kappa$ B), może prowadzić do selektywnej atrofii włókien glikolitycznych, w odróżnieniu od włókien tlenowych (Ciciliot 2013).

**W prezentowanej pracy wykazałem, że PChN wtórnie do zaburzeń metabolicznych i stanu zapalnego, prowadzi do nasilenia procesów katabolicznych i ubytku masy ciała. Zaburzenia te stwierdza się już we wczesnych stadiach PChN i nasilają się one wraz z postępem niewydolności nerek. Interesującym faktem stwierdzonym w tej pracy jest wyższa skłonność do ulegania atrofii w pierwszej kolejności włókien glikolitycznych o dużej średnicy.** Ponieważ średnica włókien typu II w mięśniu ML w grupie CON była większa niż średnica tych włókien w mięśniu MG, to atrofia była najbardziej widoczna w mięśniu ML w grupie CKD5/6.

Analiza dystrybucji włókien mięśniowych w grupie kontrolnej wykazała większy o 5% odsetek włókien typu I w mięśniu ML w porównaniu z MG. **Interesującym odkryciem tego badania było stwierdzenie podwyższonego odsetka włókien typu IIX w grupach CKD w stosunku do CON.** Statystycznie istotny wzrost liczby włókien typu IIX i tendencja do wyższego odsetka typu I, przy jednoczesnym zmniejszeniu się odsetka włókien IIB były obecne w mięśniu ML w grupie CKD1/2. Podobne, choć statystycznie nieistotne przesunięcia zostały stwierdzone w mięśniu MG w grupie CKD1/2. **We wczesnych stadiach PChN może zatem dochodzić do procesu transformacji włókien mięśniowych, przebiegającego od włókien szybkich do wolnych, co może świadczyć o aktywacji mechanizmów kompensacyjnych.** Brak podobnych zmian w grupie CKD5/6 przemawia z kolei za zahamowaniem tych mechanizmów, w wyniku nasilenia zaburzeń metabolicznych, w bardziej zaawansowanych stadiach PChN.

Wykazano, że produkowany endogennie w mięśniach NO, odgrywa ważną rolę w procesie hipertrofii i transformacji włókien mięśniowych oraz biogenezy mitochondriów. Stwierdzono obecność wszystkich trzech izoform syntazy tlenu azotu (NOS): śródbłonkowej (eNOS), neuronalnej (nNOS) i indukowalnej (iNOS) w mięśniach szkieletowych (Stamler 2001). Ekspresja nNOS i eNOS wykazuje preferencje i jest odpowiednio wyrażona we



włóknach szybkich i wolnych (Punkt 2006). NOS pełni rolę przetwornika mechanicznego obciążenia cytoszkieletu mięśni w sygnał chemiczny, który wpływa na ekspresję genów izoform łańcuchów ciężkich miozyny (MHC). Zablokowanie aktywności NOS przez L-NAME wiązało się z zahamowaniem transformacji MHC oraz hipertrofii włókien typu I i IIB(X) pod wpływem obciążenia (Smith 2002). Transformacja włókien mięśniowych szybkich w wolne, ze współistniejącą atrofią włókien mięśniowych typu IIB została stwierdzona w mięśniach szczurów w wyniku starzenia się (Larsson 1993). Stres oksydacyjny, zapalenie i nagromadzenie się AGE, związane z wiekiem w populacji ogólnej, są również silnie zaangażowane w patogenezę przyspieszonego starzenia się komórek mięśni szkieletowych w PChN (Kooman 2013). Zmniejszona synteza białek mięśni, zwiększony stres oksydacyjny i stężenie cytokin o działaniu katabolicznym (IL-6, IL1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) są charakterystycznymi cechami ubytku masy mięśniowej związanej z wiekiem. Podobne zaburzenia metaboliczne oraz mikrostruktury mięśni szkieletowych zostały potwierdzone w mojej pracy w mięśniach szczurów z grupy CKD, co dostarcza dowodu, aby uznać PChN za proces przyspieszonego starzenia się komórek mięśni szkieletowych. Atrofia włókien mięśniowych w PChN wynika nie tylko ze stanu zapalnego i upośledzenia łąknienia. Większa średnica włókien typu II oraz mniejsza sieć mikrokrażenia w porównaniu z włóknami typu I predysponują je do ulegania przyspieszonemu rozwojowi miopatii. Ze względu na większą odległość, na jaką musi dyfundować tlen, szybciej dochodzi w nich do hipoksji, która ogranicza tempo przemiany materii (De Theije 2015). Potwierdzono, że hipoksja prowadzi do atrofii włókien mięśniowych poprzez zależne od mTOR hamowanie syntezy białek i przejściową aktywację proteolizy (Preedy 1985). Zmniejszenie pola powierzchni włókien mięśniowych, w odpowiedzi na przewlekłą hipoksję, zwiększa dyfuzję tlenu do komórek mięśniowych, a zahamowanie syntezy białek, zmniejsza zapotrzebowanie na energię (Favier 2015). **Współistnienie stanu zapalnego i hipoksji w przebiegu PChN wywiera zatem addycyjny wpływ i nasila procesy kataboliczne w mięśniach.**

W warunkach fizjologicznych w sytuacji niedotlenienia tkanek, w tym również mięśni szkieletowych, dochodzi do zwiększonej ekspresji czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF), który wykazuje wielokierunkowe działanie w celu zapewnienia homeostazy tlenu w tkankach. HIF jest heterodimerem zbudowanym z indukowalnej podjednostki  $\alpha$  i konstytutywnie obecnej w komórkach podjednostki  $\beta$  (Semenza 2001). HIF występuje w postaci trzech izoform, z których najlepiej scharakteryzowane są HIF-1 i HIF-2. Obie izoformy posiadają 48% zgodność sekwencji aminokwasów i podobną strukturę białka oraz wykazują zarówno wspólne, jak i unikalne geny, które indukują. Stwierdzono już ponad 300 genów, które mogą być indukowane przez HIF w odpowiedzi homeostatycznej na hipoksję. Geny te posiadają w swoim promotorze jedną lub kilka, ułożonych tandemowo, sekwencji 5'-CGTG-3', zwanych elementami odpowiedzi na hipoksję – HRE (ang. hypoxia respond element) (Chowdhury 2008; Semenza 2009). Kodują one białka związane z przeżyciem komórki, angiogenezą, regulacją metabolizmu, a także paradoksalnie indukujące apoptozę i autofagię (Sowter 2001). Wykazano, że izoformy HIF różnią się w powinowactwie do różnych genów. HIF-1 preferencyjnie indukuje geny dla enzymów glikolitycznych (Kim 2006), VEGFR-1 (Gerber 1997), natomiast HIF-2 preferencyjnie pobudza geny regulujące erytropoezę (Kapitsinou 2010), metabolizm żelaza (Mastrogiannaki 2012), metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP) (Petrella 2005), VEGFR-2 (Elvert 2003). Jednocześnie HIF-1 i HIF-2 posiadają wspólne geny docelowe, takie jak VEGF-A i transporter glukozy 1 (GLUT1) (Keith 2012). Uważa się, że HIF-1 jest najbardziej powszechnie występującą w komórkach izoformą, podczas gdy HIF-2 ulega ekspresji głównie w komórkach śródbłonna (EC), odgrywając ważną rolę w angiogenezie i w homeostazie (Chowdhury 2008). HIF-1 i w większym stopniu HIF-2 zwiększają parakrynną aktywność komórek progenitorowych szpiku

kostnego (BMSC) powodując zwiększoną ekspresję receptorów i cytokin czynników angiogennych, które ułatwiają migrację BMSC do miejsc angiogenezy, ich wbudowywanie oraz indukowanie tworzenia naczyń (Ben-Shoshan 2008).

Poziom HIF w komórce jest regulowany na poziomie potranslacyjnym przez dwa układy zależnych od tlenu hydroksylaz prolinowych i asparaginylowych, które rozkładają podjednostkę alfa. Hydroksylacja prolina jest katalizowana przez trzy blisko spokrewnione enzymy – hydroksylazy prolinowe 1, 2, 3 (PHD1, PHD2, PHD3) (Epstein 2001), natomiast hydroksylację reszty asparaginianowej katalizuje hydroksylaza asparaginianowa (FIH) (Lando 2002). PHD należą do dioksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu (2-OG) i wymagają tlenu do hydroksylacji, a także  $\text{Fe}^{2+}$  i askorbinianu, jako kofaktorów. PHD mogą hydroksylować HIF $\alpha$  in vitro, a także hamować aktywność sekwencji HRE w przypadku nadekspresji w komórkach (Epstein 2001). Wszystkie trzy PHD regulują poziom HIF-1 $\alpha$ , jak i HIF-2 $\alpha$ , ale istnieją między nimi preferencje. PHD1 i PHD3 są bardziej aktywne wobec HIF-2 $\alpha$  niż HIF-1 $\alpha$ , podczas gdy PHD2 jest aktywne przede wszystkim w stosunku do HIF-1 $\alpha$  (Appelhoff 2004). W warunkach dostatecznej ilości tlenu w komórce (normoksji) podjednostka  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ ) ulega hydroksylacji i tworzy kompleks z białkiem VHL, będącym częścią kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej, co prowadzi do jego proteasomalnej degradacji (Maxwell 1999). W sytuacji hipoksji aktywność katalityczna hydroksylaz jest hamowana, co prowadzi do stabilizacji podjednostki  $\alpha$  białka HIF i jej translokacji do jądra komórkowego, gdzie łączy się z podjednostką  $\beta$ . Następnie przy udziale czynników transkrypcyjnych CBP i p300 aktywuje ekspresję genów indukowanych hipoksją (Chowdhury 2008). W celu ustalenia, czy zaburzona struktura mikrokrążenia zależy od nieprawidłowej regulacji angiogenezy w PChN, przeprowadziłem kolejny eksperyment.

### **Praca 3.**

W badaniu przeprowadzonym w tym samym modelu eksperymentalnym, jak w poprzednich pracach, oceniono ekspresję czynnika HIF-1 $\alpha$  na poziomie genu metodą reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) oraz na poziomie białka metodą Western blot (WB) w mięśniach. Analizowano również ekspresję genów zaangażowanych w proces angiogenezy, których ekspresja wzrasta pod wpływem niedotlenienia, w mechanizmie zależnym od HIF-1 $\alpha$ , jak VEGF-A, VEGFR-1 oraz iNOS, a także regulowanych niezależnie od HIF-1 $\alpha$ , jak VEGFR-2 i eNOS.

W mięśniu MG wraz z postępowaniem niewydolności nerek ekspresja mRNA HIF-1, VEGF-A, VEGFR-1 i VEGFR-2 obniżała się, osiągając istotność statystyczną w grupie CKD5/6, w porównaniu z kontrolną. Natomiast w mięśniu ML, nie wykazano istotnych różnic w ekspresji mRNA powyższych genów pomiędzy badanymi grupami. Ponadto ekspresja mRNA dla eNOS obniżała się, podczas gdy ekspresja iNOS wzrastała wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek w obu badanych mięśniach, osiągając istotność statystyczną tylko w mięśniu ML w grupie CKD5/6.

Metodą Western Blot potwierdzono obecność białka HIF-1 $\alpha$  w obu badanych mięśniach w grupie kontrolnej, co wskazuje na istotną rolę tego układu dla prawidłowej funkcji mięśni. Natomiast zawartość białka HIF-1 $\alpha$  była około 10 razy większa w mięśniu MG niż ML, co sugeruje większe znaczenie tego czynnika dla mięśni o przewadze włókien glikolitycznych. Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję białka HIF-1 $\alpha$  w obu badanych mięśniach (MG i ML) w grupie CKD1/2 w porównaniu z kontrolną. W grupie CKD5/6 ekspresja białka HIF-1 $\alpha$  była istotnie niższa w MG, podczas gdy w ML istotnie wyższa, w porównaniu z grupą kontrolną i CKD1/2. Podobnie jak w grupie kontrolnej, zawartość białka HIF-1 $\alpha$  w mięśniu MG była wyższa niż w ML, w grupach CKD. Wraz z zaawansowaniem

niewydolności nerek stwierdzono wyższe stężenie homocysteiny i AGEs oraz narastanie niedokrwistości.

Współistnienie niedokrwistości oraz wykazane w poprzedniej pracy rozrzedzenie struktury mikrokrążenia, zasugerowało istnienie przewlekłego niedotlenienia mięśni szkieletowych w przebiegu PChN. Przypuszczałem zatem, że hipoksja doprowadzi do indukcji HIF-1 $\alpha$  i zależnych od niego genów, w celu pobudzenia angiogenezy i utrzymania homeostazy mięśni szkieletowych. Obniżona ekspresja eNOS w obu mięśniach wynikała zapewne z uszkodzeniem śródbłonna przez stan zapalny i hiperhomocysteinemię.

Interesującym wynikiem pracy była istotnie wyższa ekspresja mRNA iNOS w mięśniu ML, która wzrosła o 2,8 i 7,7-krotnie, odpowiednio w grupie CKD1/2 i CKD5/6, w porównaniu z kontrolną. Wykazano bowiem, że pobudzenie ekspresji iNOS w makrofagach, prowadzi za pośrednictwem NO do akumulacji HIF-1 $\alpha$  w hodowli komórek (Sandau 2001). Wskazuje to na modulujący wpływ NO na funkcję HIF-1 $\alpha$ . Ponieważ zwiększona ilość białka HIF-1 $\alpha$  w mięśniu ML wiązała się ze zwiększoną ekspresją iNOS, ale jednocześnie nie przełożyła się zwiększoną ekspresję VEGF-A i VEGFR-1, może to wskazywać na różnice w indukowaniu docelowych genów, zależne od osiągniętego stężenia HIF-1 $\alpha$  lub różny czas trwania odpowiedzi mediowanej za pośrednictwem HIF-1 $\alpha$  (Qutub 2008).

**Wyniki prezentowanej przeze mnie pracy, potwierdziły po raz pierwszy, zaburzoną regulację czynnika transkrypcyjnego HIF-1 $\alpha$  w mięśniach, w zaawansowanych stadiach PChN. Jednocześnie wykazałem istotne różnice w ekspresji HIF-1 $\alpha$  i czynników angiogennych pomiędzy mięśniami o różnej funkcji, które wskazują na nieprawidłową odpowiedź angiogenną przede wszystkim w mięśniach lokomocyjnych, o przewodze włókien glikolitycznych.**

Uzyskane wyniki potwierdzone zostały przez późniejsze badania innych autorów. W pracy Acevedo i wsp. (Acevedo 2015) przeprowadzonej na szczurach, w 12 tygodni, od zabiegu chirurgicznej nefrektomii 5/6, potwierdzono obniżony poziom białka HIF-1 $\alpha$  o 42% i zredukowaną o ~12% liczbę kapilar w kontakcie z włóknem w mięśniu piszczelowym przednim (lokomocyjnym, o przewodze włókien glikolitycznych). Nie wykazano istotnych różnic w zakresie tych parametrów w mięśniu płaszczkowatym (posturalnym, o przewodze włókien oksydatywnych). W kolejnych badaniach, potwierdzona została również nieprawidłowa odpowiedź angiogenna, na indukowane niedokrwienie kończyny dolnej u szczurów, po zabiegu nefrektomii 5/6 (Schellinger 2017; Heiss 2017). Schellinger i wsp. w odpowiedzi na niedokrwienie wykazali mniejszą gęstość kapilar oraz obniżoną ekspresję HIF-1 $\alpha$ , VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 w mięśniu brzuchatym łydki (MG) w porównaniu z grupą kontrolną. Zastosowanie czynnika hamującego hydroksylazy prolinowe, w celu stabilizacji HIF, spowodowało istotne pobudzenie angiogenezy i wzrost liczby kapilar.

Za przyczynę nieprawidłowej ekspresji genów w PChN uważa się nagromadzenie toksyn mocznicowych (Lim 2000). Hiperhomocysteinemia, którą stwierdziliśmy w grupie CKD5/6, może być przyczyną metylacji DNA i prowadzić do zablokowania transkrypcji i obniżenia ekspresji określonego genu (Ingrosso 2003). Ponadto metylacja sekwencji HRE uniemożliwia jej wiązanie się z HIF- $\alpha$  (Wenger 1998). Brak istotnych różnic w ekspresji tych genów w mięśniu ML pomiędzy grupami, sugeruje że mięśnie posturalne mogą być mniej podatne na zaburzenia metaboliczne obecne w CKD. Wydaje się, że różnice we wzorze aktywacji jednostek motorycznych w mięśniach posturalnych i lokomocyjnych mogły wpłynąć na uzyskane wyniki ekspresji genów. Wykazano bowiem, że wysiłek fizyczny prowadzony w warunkach hipoksji, stymuluje zwiększoną ekspresję HIF-1 $\alpha$  w mięśniach (Vogt 2001). Wykazano również różnice w ekspresji HIF-1 $\alpha$  w czasie w mięśniach różniących się budową i funkcją. W badaniu Caccani i wsp. porównano ekspresję HIF-1 w mięśniu płaszczkowatym (SO), o przewodze włókien tlenowych, z mięśniem prostownikiem

długim palców (EDL), który zbudowany jest z głównie z włókien glikolitycznych. Stwierdzono zwiększoną ekspresję mRNA HIF-1 w obu mięśniach po 8 godzinach hipoksji, natomiast po 24 godzinach ekspresja HIF-1 wzrastała już tylko w mięśniu SO, podczas gdy w EDL zaczęła się obniżać (Cacciani 2007). Brak liniowej zależności pomiędzy ekspresją genu a poziomem białka HIF-1 $\alpha$  w mięśniach, w różnych stadiach CKD, wskazuje na dominujące znaczenie regulacji HIF-1 $\alpha$  w komórce na poziomie białka (Ameln 2005).

#### **Praca 4.**

W celu poszukiwania przyczyn różnej ekspresji białka HIF-1 $\alpha$  w badanych mięśniach w przebiegu PChN, jak również w obliczu braku danych w literaturze na temat ekspresji HIF-2 $\alpha$  i hydroksylaz prolinowych (PHD) w mięśniach w przebiegu PChN, przeprowadzono kolejną pracę eksperymentalną.

W pracy tej, jednocześnie analizowano zawartość białka HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  oraz hydroksylaz prolinowych – PHD1, PHD2, PHD3 przy użyciu metody Western Blot, w tym samym modelu eksperymentalnym. Wyniki dotyczące zawartości białka HIF-1 $\alpha$  zostały zaczerpnięte z poprzedniej pracy (Flisiński 2012) i omówione powyżej.

Potwierdzono obecność białka HIF-2 $\alpha$  w mięśniu MG we wszystkich badanych grupach, przy czym jego poziom był około dwukrotnie wyższy w grupie CKD5/6 w porównaniu z CON. Jednocześnie w mięśniu ML nie wykazano jego ekspresji w żadnej z badanych grup. Ogólnie stwierdzono wyższą zawartość PHD1, PHD2, PHD3 w mięśniu ML w porównaniu z MG, podobnie jak w grupie CON. Fakt ten może pośrednio potwierdzać różnice w nasileniu hipoksji pomiędzy badanymi mięśniami, wynikające z większego ubytku kapilar w mięśniu MG w porównaniu z ML.

**Wykazano różną zawartość białka głównej hydroksylazy prolinowej – PHD2, w analizowanych mięśniach wraz z pogarszającą się funkcją nerek. Jej zawartość bowiem obniżała się w mięśniu MG i istotnie wzrastała w ML, naśladując tym samym zachowanie się HIF-1 $\alpha$ .** Fakt ten wydaje się być zaskakujący, ponieważ na podstawie ilości białka HIF-1 $\alpha$  w komórce, przewidywalibyśmy odwrotną zależność.

Nie stwierdzono obecności białka PHD1 w mięśniu MG w żadnej z badanych grup. Podczas gdy w mięśniu ML, PHD1 była obecna tylko w grupach CKD, osiągając najwyższą ekspresję w CKD5/6. Poziom białka PHD3 nie różnił się istotnie między badanymi grupami w MG, podczas gdy w mięśniu ML, ilość PHD3 wzrosła w CKD1/2 i obniżyła się w CKD5/6, w porównaniu z CON.

**Interesującym, nowym odkryciem tej pracy, było wykazanie w mięśniu MG wzrastającej zawartości białka HIF-2 $\alpha$  wraz z obniżającą się filtracją kłębuszkową. Podczas gdy poziom HIF-1 $\alpha$  w mięśniu MG wzrastał w CKD1/2, a następnie obniżał się w grupie CKD5/6, w porównaniu z kontrolną.** W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że w przewlekłej hipoksji białko HIF-1 $\alpha$  ulega z czasem degradacji, podczas gdy HIF-2 $\alpha$  może się kumulować. Z tego powodu uważa się, że HIF-1 $\alpha$  inicjuje początkową odpowiedź na niedotlenienie, podczas gdy HIF-2 $\alpha$  bierze udział w podtrzymywaniu odpowiedzi na hipoksję (Holmquist-Mengelbier 2006). Podobny mechanizm został również potwierdzony na poziomie genu. W odpowiedzi na hipoksję obserwowano wzrost ekspresji mRNA HIF-1 $\alpha$  po 3 dniach, podczas gdy ekspresja mRNA HIF-2 $\alpha$  wzrastała dopiero po 8 dniach i narastała dalej w okresie 1-3 tygodni (Rahman 2007).

Przypuszczam, że wzrost ekspresji białka HIF-2 $\alpha$  w mięśniu MG może wynikać ze stymulującego wpływu przewlekłej hipoksji, która doprowadziła do jednoczesnego obniżenia ekspresji HIF-1 $\alpha$ . W pracach innych autorów ustalono, że regulacja ekspresji białka HIF-1 $\alpha$ , pod wpływem przewlekłej hipoksji, jest regulowana za pośrednictwem dwóch mechanizmów, które prowadzą do zwiększenia zawartości tego białka na drodze zwiększonej ekspresji genu

HIF-1 $\alpha$  lub za pośrednictwem bursztynianu, który powstaje w czasie reakcji hydroksylacji HIF-1 $\alpha$  przez PHD2 i zwrotnie hamuje aktywność PHD2. Natomiast negatywna regulacja HIF-1 $\alpha$  zależy od zwiększonego poziomu PHD2 w komórce (Qutub 2007).

Wyniki poprzedniej pracy wykazały, że na ilość białka HIF-1 $\alpha$  nie miała wpływu zwiększona ekspresja genu HIF-1 $\alpha$  w żadnej z badanych grup, co sugerowało, że regulacja odbywa się głównie na poziomie białka. **W mięśniu MG w grupie CKD1/2 obecna była opisywana w literaturze odwrotna zależność pomiędzy białkiem HIF-1 $\alpha$  a PHD2. Natomiast w grupie CKD5/6 stwierdziliśmy obniżenie ekspresji zarówno białka HIF-1 $\alpha$ , jak i PHD2, przy jednoczesnym braku PHD1 i stabilnym poziomie PHD3 (jak w grupie kontrolnej). Niski poziom białka HIF-1 $\alpha$  oraz jednocześnie niska zawartość wszystkich PHD, wskazuje na nieprawidłową regulację tego mechanizmu w przebiegu PChN.**

PHD2 jest główną hydroksylazą odpowiedzialną za kontrolę czasu aktywności HIF-1 $\alpha$  w komórkach w odpowiedzi na hipoksję. W komórkach narażonych na przewlekłe niedotlenienie ekspresja HIF-1 $\alpha$  jest hamowana przez PHD2, ponieważ przedłużone działanie prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego p53, który indukuje apoptozę komórki. Zatem długo utrzymujące się wysokie poziomy HIF-1 $\alpha$ , w odpowiedzi na przewlekłą hipoksję, mogą doprowadzić do śmierci komórki (Bagnall 2014). Niedotlenione komórki paradoksalnie zwiększają produkcję ROS w mitochondriach, co jest przyczyną stresu oksydacyjnego. Nadmierne wytwarzanie wolnych rodników w warunkach in vivo powoduje szereg szkodliwych efektów, w wyniku peroksydacji lipidów błon komórkowych, utleniania białek i degradacji DNA (Pialoux 2009). Potwierdzono dwufazowy wpływ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ilość białka HIF-1 $\alpha$  w komórkach. W początkowej fazie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prowadziło do wzrostu ilości białka HIF-1 $\alpha$ , poprzez utlenianie żelaza, i wtórne zahamowanie funkcji PHD2. Natomiast efektem przedłużonego działania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> było jednoczesne obniżenie ilości białka HIF-1 $\alpha$  i PHD2, wtórnie do zahamowania ekspresji genu HIF-1 pod wpływem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Niecknig 2012). Ponadto uwalniane przez mitochondria metabolity cyklu kwasów trójkarboksylowych, takie jak fumaran, bursztynian czy izocytrynian również hamują PHD, przyłączając się do ich centrum aktywnego (Meneses 2016). **Prawdopodobną przyczyną wykazanej w moich pracach obniżonej ekspresji genu i białka HIF-1 $\alpha$ , przy jednocześnie niskiej aktywności PHD2 w mięśniu MG w grupie CKD5/6, jest nasilony stres oksydacyjny. Wykazane, po raz pierwszy w mojej pracy, przełączenie HIF-1 $\alpha$  na HIF-2 $\alpha$  w mięśniu MG w grupie CKD5/6 może wskazywać na potencjalny mechanizm adaptacyjny, w odpowiedzi na przewlekłą hipoksję i nasilony stres oksydacyjny w przebiegu PChN.** W sytuacji przedłużającej się hipoksji HIF-2 $\alpha$ , chroni komórkę przed uszkadzającym wpływem wolnych rodników oraz bierze udział w utrzymaniu homeostazy mitochondriów (Scortegagna 2003). Zwiększonej ekspresji HIF-2 $\alpha$  w mięśniu MG, sprzyjał jednoczesny brak ekspresji PHD1, jak i stabilny poziom PHD3. Potwierdzono bowiem, że PHD3 odpowiada za hydroksylację HIF-2 $\alpha$  pod wpływem hipoksji (Appelhoff 2004). Natomiast myszy z zablokowaną ekspresją genu PHD1 charakteryzowały się zwiększoną ekspresją HIF-2 $\alpha$  (Aragones 2008), co wiązało się ze zmniejszonym zużyciem tlenu, w związku z redystrybucją metabolizmu glukozy z oksydacyjnego na beztlenowy. Ta zmiana metabolizmu upośledzała oksydacyjną wydolność mięśni, ale zapewniała ochronę komórkom przeciwko śmiertelnemu niedokrwieniu. Tolerancja na niedotlenienie mediowana przez HIF-2 $\alpha$  zależała od zmniejszenia stresu oksydacyjnego, a nie miała wpływu na angiogenezę czy erytropoezę.

**W mięśniu ML wykazano zupełnie inny wzór zależności pomiędzy HIF-1 $\alpha$  a PHD, w porównaniu z mięśniem MG. Wraz z niewydolnością nerek narastała bowiem zawartość HIF-1 $\alpha$ , jak i wszystkich hydroksylaz, za wyjątkiem PHD3 w grupie CKD5/6. Potwierdzono, że PHD2 i PHD3 pozostają pod wpływem dodatniego sprzężenia zwrotnego z odpowiednio HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$ , ponieważ ich geny posiadają sekwencję HRE rozpoznawane**

przez czynnik HIF- $\alpha$  (Metzen 2005). Mechanizm ten mógł być odpowiedzialny za jednoczesowy wzrost HIF-1 $\alpha$  oraz PHD2 w mięśniu ML. Wynikiem tego procesu jest przywrócenie właściwego stosunku pomiędzy stabilizacją i degradacją białka HIF- $\alpha$ , chroniąc tym samym komórki przed wejściem w stan apoptozy. Faktyczna aktywność HIF-1 $\alpha$  jest więc ograniczana w komórkach i regulowana według aktualnego poziomu hipoksji (Marxsen 2004). Ponadto wzrost PHD3 pod wpływem HIF-1 $\alpha$ , w warunkach hipoksji, odpowiada za ujemną regulację HIF-2 $\alpha$  (Rabinowitz 2013). Tę obserwację potwierdza nasze badanie, ponieważ nie wykazano obecności HIF-2 $\alpha$  w mięśniu ML.

**Istotną obserwacją mojej pracy było wykazanie obecności białka PHD1 tylko w grupach CKD w mięśniu ML, podczas gdy nie wykazano PHD1 w tych grupach w mięśniu MG i w obu mięśniach grup kontrolnych.** W przeciwieństwie do innych hydroksylaz, PHD1 jest zlokalizowana w jądrze komórkowym i wykazuje najmniejszą skuteczność w destabilizacji endogennego HIF- $\alpha$  w porównaniu z PHD2 i PHD3 (Marxsen 2004). Uważa się również, że PHD1 może nie być regulowana przez hipoksję, ale za pośrednictwem kinaz zależnych od cyklin (CDK) kontrolujących cykl komórkowy. W odpowiedzi na hipoksję dochodzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 lub S, w celu ograniczenia najbardziej energochłonnych procesów. W wyniku zależnej od CDK fosforylacji PHD1 zmniejsza się interakcja między PHD1 i HIF-1 $\alpha$ , co prowadzi do zwiększenia ilości białka HIF-1 $\alpha$  w komórce (Ortmann 2016). Wzrost ilości białka HIF-1 $\alpha$  w mięśniu ML, pomimo wysokiej aktywności PHD, może również świadczyć o stabilizującym HIF-1 $\alpha$  wpływie czynników innych niż hipoksja, takich jak TNF- $\alpha$ , angiotensyna 2 czy NO (Pouyssegur 2006). W poprzedniej pracy wykazaliśmy istotnie wyższą ekspresję iNOS obecna tylko w mięśniu ML. NO może indukować, w sposób zależny od HIF-1 $\alpha$ , ekspresję genu i białka PHD2 i PHD3, zarówno w normoksji jak i w hipoksji (Berra 2003). Zatem obserwowana indukcja HIF-1 $\alpha$ , pomimo wysokiej ekspresji PHD w mięśniu ML, mogła zależeć od ochronnego wpływu NO. Indukcja PHD, pod wpływem hipoksji może świadczyć o tym, że ich wyższe stężenie ma za zadanie kompensować ich niską aktywność do hydroksylacji HIF- $\alpha$  (Demidenko 2011).

Różnice w budowie i funkcji pomiędzy analizowanymi mięśniami, wydają się mieć decydujące znaczenie w odpowiedzi na zaburzenia metaboliczne w PChN, a tym samym na uzyskane wyniki. Wykazano, że mięśnie o przewadze włókien tlenowych charakteryzują się większą ekspresją i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych oraz mniejszą ilością generowanych ROS w porównaniu do mięśni zbudowanych głównie z włókien glikolitycznych (Anderson 2006). Również w odpowiedzi na stan zapalny wykazano istotnie wyższą produkcję NO, ekspresję genu iNOS i dysmutazy ponadtlenkowej w mięśniach o przewadze włókien tlenowych (Yu 2008). Większa dostępność NO zależna od zwiększonej ekspresji iNOS w mięśniach posturalnych niż lokomocyjnych, jak również inny wzór aktywności jednostek ruchowych w badanych mięśniach, mogą mieć wpływ na wykazane różnice we wzajemnej interakcji pomiędzy HIF i PHD.

**Na zakończenie warto podkreślić, że omawiana praca jest pierwszą przeprowadzoną do tej pory, w której analizowano wpływ PChN na ekspresję białka HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  oraz regulujących ją hydroksylaz w mięśniach.**

## **Wnioski:**

1. Zaburzenia metaboliczne do jakich dochodzi w PChN, takie jak stan zapalny, obecność inhibitorów tlenu azotu, kumulacja AGE i hiperhomocysteinemia, prowadzą do przedwczesnego starzenia się komórek śródbłoka naczyniowego, jak i mięśni szkieletowych.
2. Dysfunkcja śródbłoka naczyniowego i wtórny niedobór NO wydają się być główną

przyczyną utraty kapilar w mikrokrażeniu mięśni szkieletowych, obecnej już we wczesnych stadiach PChN.

3. Zaburzenia struktury mikrokrażenia są bardziej nasilone w mięśniach zginaczach pełniących funkcję lokomocyjną niż w mięśniach prostownikach pełniących funkcję podporową szkieletu, prawdopodobnie w związku z różnicami w aktywności jednostek motorycznych w tych mięśniach i większą ilością dostępnego tlenu azotu w mięśniach posturalnych, co wpływa na lokalne różnice w przepływie krwi.

4. Zaburzenia metaboliczne oraz rozrzedzenie mikrokrażenia w PChN odpowiadają za nasilenie katabolizmu i prowadzą do atrofii włókien mięśniowych przede wszystkim we włóknach glikolitycznych o dużej średnicy, które są najbardziej wrażliwe na hipoksję.

5. We wczesnych stadiach PChN obserwuje się zmianę dystrybucji włókien mięśniowych, sugerujących proces transformacji włókien szybkich w wolne. Podobny proces obserwuje się w mięśniach zwierząt w czasie fizjologicznego starzenia się.

6. Nieprawidłowa struktura mikrokrażenia w PChN wynikać może z nieprawidłowej ekspresji czynnika indukowanego niedotlenieniem – 1 (HIF-1) i zależnych od niego genów o działaniu angiogennym, przede wszystkim w lokomocyjnych mięśniach o przewodze włókien glikolitycznych.

7. Regulacja ekspresji białka HIF- $\alpha$  zależna od PHD wydaje się być nieprawidłowa w PChN, wtórnie do zaburzeń metabolicznych (stres oksydacyjny, lokalne różnice w ilości NO). Z drugiej strony może stanowić mechanizm obronny, aktywowany w komórkach w wyniku niedotlenienia i stresu oksydacyjnego, który chroni przed wejściem komórki w apoptozę. Przykładem takiego mechanizmu adaptacyjnego może być wykazane przełączenie HIF-1 $\alpha$  w HIF-2 $\alpha$  w mięśniu lokomocyjnym (MG).

### **Omówienie możliwości praktycznego wykorzystania wyników prac autora:**

PChN często towarzyszą systemowe zmiany naczyniowe, które odpowiadają za zwiększoną zachorowalność i śmiertelność w tej grupie pacjentów (Wanner 2016). Rozrzedzenie struktury mikrokrażenia w mięśniach może odpowiadać za zwiększenie oporu obwodowego i rozwój nadciśnienia tętniczego, insulinooporność, zaburzenia lipidowe w wyniku zmniejszonego wychwytu VLDL i triglicerydów, a także za osłabienie siły mięśniowej i małą wydolność fizyczną. Zaburzenia te odpowiadają za wysokie ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych (Sarnak 2003). Wykazane przeze mnie zaburzenia metaboliczne i mikrostruktury mięśni, obecne już we wczesnych stadiach PChN sugerują, że działania lecznicze i profilaktyczne muszą być podjęte już na początkowym etapie choroby, zwracają również uwagę na konieczność większego nadzoru nad dawcami nerki. Interesującym wynikiem moich prac jest wykazanie, że nasilenie tych zaburzeń różni się w mięśniach w zależności od ich funkcji. Fakt ten wskazuje na istotną rolę zwiększonej aktywności fizycznej, jako metody wartej promocji w tej populacji pacjentów. Badania innych autorów potwierdzają te przypuszczenia, wykazując korzystny wpływ wysiłku fizycznego na poprawę ukrwienia, wzrost siły mięśniowej i obniżenie wykładników stanu zapalnego (Castaneda 2004). Poznanie patogenetycznych zaburzeń mikrostruktury mięśni i mechanizmów regulacyjnych stwarza możliwość potencjalnej interwencji terapeutycznej. Wyniki mojej pracy wskazujące na nieprawidłową ekspresję HIF-1, były cytowane jako przyczyna powikłań naczyniowych w PChN w renomowanym czasopiśmie (Wanner 2016). Prace innych autorów potwierdzają nieprawidłową ekspresję tego czynnika również w komórkach mesenchymalnych szpiku kostnego u zwierząt z niewydolnością nerek (Noh 2012), co wskazuje na globalny charakter tego zaburzenia i predysponuje do nieprawidłowej angiogenezy w PChN (Flisiński 2012). Nieprawidłowa odpowiedź angiogenna w PChN została potwierdzona w pracach innych

autorów (Schellinger 2017, Heiss 2017). Obserwuje się obecnie wzrost liczby prac w tym zakresie, jak również podejmowane są skuteczne próby zastosowania aktywatorów HIF, w celu pobudzenia angiogenezy w mięśniach u szczurów z niewydolnością nerek (Schellinger 2017). Prowadzone są również badania kliniczne z zastosowaniem inhibitorów hydroksylaz prolinowych w leczeniu niedokrwistości nerkopochodnej (Vachal 2012). Dotychczas nie analizowano ich wpływu na funkcję mięśni. Poznanie zatem mechanizmów nieprawidłowej regulacji HIF i PHD w przebiegu PChN, które były tematem moich badań, stwarza szansę na wynalezienie nowych terapii w leczeniu miopatii mocznicowej. Poprawa ukrwienia mięśni może przełożyć się na zmniejszenie zaburzeń lipidowych i insulinooporności, zahamowanie procesów katabolicznych i stanu zapalnego oraz poprawę wydolności fizycznej, co może przełożyć się na zmniejszenie wysokiego ryzyka sercowo-naczyniowego w tej grupie chorych.

#### **Piśmiennictwo cytowane w omówieniu publikacji wymienionych w pkt. IV:**

- Acevedo LM, Peralta-Ramirez A, Lopez I, Chamizo VE, Pineda C, Rodríguez-Ortiz ME, Rodríguez M, Aguilera-Tejero E, Rivero JL. Slow- and fast-twitch hindlimb skeletal muscle phenotypes 12 wk after 5/6 nephrectomy in Wistar rats of both sexes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015; 309: F638-F647.
- Amann K, Neimeier KA, Schwarz U, Törnig J, Matthias S, Orth SR, Mall G, Ritz E. Rats with moderate renal failure show capillary deficit in heart but not skeletal muscle. *Am J Kidney Dis.* 1997; 30(3):382-8.
- Amann K, Neusüss R, Ritz E, Irzyniec T, Wiest G, Mall G. Changes of vascular architecture independent of blood pressure in experimental uremia. *Am J Hypertens.* 1995; 8(4 Pt 1):409-17.
- Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290: C844– C851.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem.* 2004; 279: 38458-38465.
- Aragones J, Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Dresselaers T, Mazzone M, Dirx R, Zacchigna S, Lemieux H, Jeoung NH, Lambrechts D, Bishop T, Lafuste P, Diez-Juan A, Harten SK, Van Noten P, De Bock K, Willam C, Tjwa M, Grosfeld A, Navet R, Moons L, Vandendriessche T, Deroose C, Wijeyekoon B, Nuyts J, Jordan B, Silasi-Mansat R, Lupu F, Dewerchin M, Pugh C, Salmon P, Mortelmans L, Gallez B, Gorus F, Buyse J, Sluse F, Harris RA, Gnaiger E, Hespel P, Van Hecke P, Schuit F, Van Veldhoven P, Ratcliffe P, Baes M, Maxwell P, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet.* 2008; 40: 170-180.
- Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodriguez-Mañas L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *J Am Med Dir Assoc.* 2016; 17(9):789-96.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner KM, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221–228.



Bagnall J, Leedale J, Taylor SE, Spiller DG, White MR, Sharkey KJ, Bearon RN, Sée V. Tight control of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  transient dynamics is essential for cell survival in hypoxia. *J Biol Chem*. 2014; 289(9): 5549-64.

Ben-Shoshan J, Schwartz S, Luboshits G, Maysel-Auslender S, Barzelay A, Polak-Charcon S, Tzahor E, Barshack I, Barak A, Levkovitch-Verbin H, Keren G, George J. Constitutive expression of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem Cells*. 2008; 26(10):2634-43.

Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *EMBO J*. 2003; 22: 4082-4090.

Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol*. 1970; 23: 369-379.

Cacciani N, Sacchetto R, Murgia M, Reggiani C, Patrino M. Response to normobaric hypoxia in slow and fast muscles of the rat. *Basic Applied Myology*. 2007; 17(3&4): 161-165.

Campistol JM. Uremic myopathy. *Kidney Int*. 2002; 62: 1901-13.

Castaneda C, Gordon PL, Parker RC, Uhlin KL. Resistance Training to Reduce the Malnutrition-Inflammation Complex Syndrome of Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2004, 43, 4: 607-616.

Chen YM, Chiang WC, Lin SL, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS: Dual regulation of TNF- $\alpha$ -induced CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth muscle cells by NF- $\kappa$ B and AP-1: Modulation by type III phosphodiesterase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309: 978 – 986.

Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem Soc Rev*. 2008; 37(7):1308-19.

Ciciliot S, Rossia AC, Dyara KA Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45: 2191 – 2199.

de Theije CC, Langen RC, Lamers WH, Gosker HR, Schols AM, Köhler SE. Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985)*. 2015; 118(2):200-11.

Demidenko ZN, Blagosklonny MV. The purpose of the HIF-1/PHD feedback loop: To limit mTOR-induced HIF-1 $\alpha$ . *Cell Cycle*. 2011; 10 (10), 1557-1562.

Deveci D, Marshall JM, Egginton S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281(1): H241-52.

Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*. 2003; 278(9):7520-30.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001; 107: 43-54.

Fahal IH, Bell GM, Bone JM, Edwards RH. Physiological abnormalities of skeletal muscle in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 119-127.

Fahal IH. Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29(9):1655-65.

Favier FB, Britto FA, Freyssen DG, Bigard XA, Benoit H. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(24):4681-96.

Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, Cano N, Chauveau P, Cuppari L, Franch H, Guarnieri G, Ikizler TA, Kaysen G, Lindholm B, Massy Z, Mitch W, Pineda E, Stenvinkel P, Treviño-Becerra A, Wanner C. A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Protein-energy wasting in kidney disease*. *Kidney Int*. 2008; 73: 391-398.

Frisbee JC. Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289(2):R307-R316.

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*. 1997; 272(38):23659-67.

Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 288(5):F871-80.

Goligorsky MS. Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold. *Kidney Res Clin Pract*. 2015; 34(2):76-82.

Gramsbergen A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? *Neurosci BioBehav Rev*. 1998; 22: 547-554

Heiss RU, Fahlbusch FB, Jacobi J, Daniel C, Ekici AB, Cordasic N, Amann K, Hartner A, Hilgers KF. Blunted transcriptional response to skeletal muscle ischemia in rats with chronic kidney disease: potential role for impaired ischemia-induced angiogenesis. *Physiol Genomics*. 2017; 49(4):230-237.

Hennig R, Lomo T. Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature*. 1985; 14-20, 314: 164-6.

Hepple RT, Hogan MC, Stary C, Bebout DE, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Structural basis of muscle O<sub>2</sub> diffusing capacity: Evidence from muscle function in situ. *J Appl Physiol*. 2000; 88(2): 560–566.

Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L, Pahlman S. Recruitment of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 $\alpha$  promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell*. 2006; 10, 5: 413-423.

Hou FF, Ren H, Guo ZJ, Chen PY, Liang M, Zhang X. Activation of receptor for advanced glycation end products: mechanism for monocyte-mediated inflammation in chronic renal failure. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 1614-1619.

Hudlicka O. Microcirculation in skeletal muscle. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2011; 1(1):3-11.

Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'Esposito M, D'Urso M, Galletti P, Zappia V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*. 2003; 361: 1693– 1699.

Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B, Epstein JA, Moores SL, Erickson-Miller CL, Haase VH. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood*. 2010; 116: 3039–3048.

Kaysen GA. The microinflammatory state in uremia: causes and potential consequences. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12: 1549-1557.

Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011; 12(1):9-22.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006; 3: 177–185.

Kooman JP, Broers NJ, Usvyat L, Thijssen S, van der Sande FM, Cornelis T, Levin NW, Leunissen KM, Kotanko P. Out of control: accelerated aging in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(1): 48-54.

Korthuis RJ. *Skeletal Muscle Circulation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Chapter 3, Regulation of Vascular Tone in Skeletal Muscle.

Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*. 2002; 16: 1466-1471.

Larsson L, Biral D, Campione M, Schiaffino S. An age-related type Iib to Iix myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 1993; 147 (2): 227–234.

Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:454–463.

Marrades RM, Alonso J, Roca J, González de Suso JM, Campistol JM, Barberá JA, Diaz O, Torregrosa JV, Masclans JR, Rodríguez-Roisin R, Wagner PD. Cellular bioenergetics after erythropoietin therapy in chronic renal failure. *J Clin Invest*. 1996;97 (9): 2101-10.

Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P, Metzen E. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- $\alpha$ -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*. 2004; 381: 761-767.

Mastrogiannaki M, Matak P, Delga S, Deschemin JC, Vaulont S, Peyssonnaud C. Deletion of HIF-2 $\alpha$  in the enterocytes decreases the severity of tissue iron loading in hepcidin knockout mice. *Blood*. 2012; 119(2): 587-90.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999; 399:271–275.

Meneses AM, Wielockx B. PHD2: from hypoxia regulation to disease progression. *Hypoxia (Auckl)*. 2016; 4:53-67.

Metzen E, Stiehl DP, Doege K, Marxsen JH, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W. Regulation of the prolyl hydroxylase domain protein 2 (phd2/egln-1) gene: identification of a functional hypoxia-responsive element. *Biochem J.* 2005; 387: 711-717.

Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD, Silgram H: Nitric oxide, VEGF and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 289: 336-343.

Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med.* 1996; 335: 1897-1905.

Niecknig H, Tug S, Reyes BD, Kirsch M, Fandrey J, Berchner-Pfannschmidt U. Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Radic Res.* 2012; 46(6):705-17.

Ortmann B, Bensaddek D, Carvalhal S, Moser SC, Mudie S, Griffis ER, Swedlow JR, Lamond AI, Rocha S. CDK dependent phosphorylation of PHD1 on serine 130 alters its substrate preference in cells. *J Cell Sci.* 2016; 129: 191-205.

Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 2005; 24:1043–52.

Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1 $\alpha$  mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46: 321–326.

Pouyssegur J, Mechta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* 2006; 387:1337-1346.

Preedy VR, Smith DM, Sugden PH. The effects of 6 hours of hypoxia on protein synthesis in rat tissues in vivo and in vitro. *Biochem J.* 1985; 228(1):179-85.

Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol.* 2004;97: 1119–1128.

Punkt K, Fritzsche M, Stockmar C, Hepp P, Josten C, Wellner M, Schering S, Buchwalow IB. Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types. *Histochem Cell Biol.* 2006;125(5):567-73.

Qutub AA, Popel AS. Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1alpha differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(16):5106-19.

Qutub AA, Popel AS. Three autocrine feedback loops determine HIF1 alpha expression in chronic hypoxia. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(10):1511-25.

Rabinowitz MH. Inhibition of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain oxygen sensors: tricking the body into mounting orchestrated survival and repair responses. *J Med Chem.* 2013; 56(23):9369–9402.

Rahman MS, Thomas P. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ , in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gene.* 2007; 396: 273-282.

Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD. Myoglobin O<sub>2</sub> desaturation during exercise. Evidence of limited O<sub>2</sub> transport. *J Clin Invest.* 1995; 96:1916–1926.

Richmond KN, Burnite S, Lynch RM. Oxygen sensitivity of mitochondrial metabolic state in isolated skeletal and cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1997; 273:C1613–C1622.

Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 1997; 77:731–758.

Sakkas GK, Ball D, Mercer TH, Sargeant AJ, Tolfrey K, Naish PF. Atrophy of non-locomotor muscle in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(10):2074–81.

Sakkas GK<sup>1</sup>, Ball D, Sargeant AJ, Mercer TH, Koufaki P, Naish PF. Skeletal muscle morphology and capillarization of renal failure patients receiving different dialysis therapies. *Clin Sci (Lond)*. 2004; 107(6):617-23.

Sandau KB, Fandrey J, Brüne B. Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide. *Blood*. 2001; 97(4):1009-15.

Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-69.

Schellinger IN, Cordasic N, Panesar J, Buchholz B, Jacobi J, Hartner A, Klanke B, Jakubiczka-Smorag J, Burzlaff N, Heinze E, Warnecke C, Raaz U, Willam C, Tsao PS, Eckardt KU, Amann K, Hilgers KF. Hypoxia inducible factor stabilization improves defective ischemia-induced angiogenesis in a rodent model of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017; 91: 616-627.

Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*<sup>−/−</sup> mice. *Nat Genet*. 2003; 35: 331-340.

Semenza GL. HIF-1, O<sub>2</sub>, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*. 2001; 107: 1-3.

Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24:97-106.

Serratrice G, Toga M, Roux H *et al*. Neuropathies, myopathies and neuromyopathies in chronic uremic patients. *Presse Med*. 1967; 75: 1835-8.

Smith LW, Smith JD, Criswell DS. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *J Appl Physiol (1985)*. 2002; 92(5):2005-11.

Smogorzewski M, Piskorska G, Borum PR, Massry SG. Chronic renal failure, parathyroid hormone and fatty acids oxidation in skeletal muscle. *Kidney Int*. 1988; 33: 555-560.

Sowter H. M, Ratcliffe P J, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res*. 2001; 61, 6669–6673.

Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001; 81(1):209-237.

- Stehouwer CD. Endothelial dysfunction in diabetic nephropathy: state of the art and potential significance for non-diabetic renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 778-81.
- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, et al. IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : central factors in the altered cytokine network of uremia - the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*. 2005; 67: 1216-1233.
- Teplan V, Schuck O, Horackova M, Skibova J, Holecek M. Effect of a keto acid-amino acid supplement on the metabolism and renal elimination of branched-chain amino acids in patients with chronic renal insufficiency on a low protein diet. *Wien Klin Wochenschr*. 2000; 112: 876-881.
- Tymk K, Mathieu-Costello O, Cheng L, Noble EG. Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 1999; 87:1496–1505.
- Utaka S, Avesani CM, Draibe SA, Kamimura MA, Andreoni S, Cuppari L. Inflammation is associated with increased energy expenditure in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr*. 2005; 82: 801-805.
- Vachal P, Miao S, Pierce JM, Guiadeen D, Colandrea VJ, Wyvratt MJ, Salowe SP, Sonatore LM, Milligan JA, Hajdu R, Gollapudi A, Keohane CA, Lingham RB, Mandala SM, DeMartino JA, Tong X, Wolff M, Steinhuebel D, Kieczykowski GR, Fleitz FJ, Chapman K, Athanasopoulos J, Adam G, Akyuz CD, Jena DK, Lusen JW, Meng J, Stein BD, Xia L, Sherer EC, Hale JJ. 1,3,8-Triazaspiro[4.5]decane-2,4-diones as efficacious pan-inhibitors of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 1-3 (HIF PHD1-3) for the treatment of anemia. *J Med Chem*. 2012; 55(7):2945-59.
- Vogt M, Puntschart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 173–182.
- Wagner PD, Masanés F, Wagner H, Sala E, Miró O, Campistol JM, Marrades RM, Casademont J, Torregrosa V, Roca J. Muscle angiogenic growth factor gene responses to exercise in chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281(2):R539-46.
- Wanic-Kossowska M, Grzegorzewska A, Plotast H, Bombicki K: Does calcitriol therapy improve muscle function in uremic patients. *Perit Dial Int*. 1996, 16 Suppl 1, S305-308
- Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet*. 2016; 388 (10041):276-84.
- Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Camenisch G, Gassmann M. Oxygen regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur. J. Biochem*. 1998; 253, 771– 777
- Yu Z, Li P, Zhang M, Hannink M, Stamler JS, Yan Z. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *PLoS One*. 2008; 3:e2086.
- Ziegan J. Kombinationem enzymhistochemischer Methoden zur Fasertypendifferenzierung und Beurteilung der Skelettmuskulatur. *Acta Histochem* 1979; 65: 34-40.

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

### **A. Publikacje naukowe znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR)**

1. Drewa T, Joachimiak R, Kaźnica A, Flisiński M, Brymora A, Manitius J. Bone marrow progenitors from animals with chronic renal failure lack capacity of in vitro proliferation. Transplant Proc. 2008; 40(5):1668-73.

Impact Factor: 1.055

Punktacja MNiSW: 15.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego celem wytworzenia modelu eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów, wyizolowaniu kości udowych oraz analizie piśmiennictwa.  
Mój udział procentowy szacuję na 20%.

2. Flisiński M, Drewa T, Manitius J. From stem cells incompetence to angiogenesis disorders in skeletal muscle in chronic kidney disease. Nephrol. Dial. Transplant. 2012. <http://ndt.oxfordjournals.org/content/27/1/218.full/reply>

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 80%.

3. Brymora A, Flisiński M, Johnson RJ, Goszka G, Stefańska A, Manitius J. Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patients with chronic kidney disease. Nephrol. Dial. Transplant. 2012; 27, 2: 608-612.

wskaźnik Impact Factor: 3.371

Punktacja MNiSW: 35.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, rekrutacji grupy badanej, przeprowadzeniu pomiarów masy ciała, pomiaru ciśnienia tętniczego, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie i interpretacji wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 35%.

4. Pokrywczyńska M, Flisiński M, Jundziłł A, Krzyżanowska S, Brymora A, Deptuła A, Bodnar M, Kłoskowski T, Stefańska A, Marszałek A, Manitius J, Drewa T. Impact of fructose diet and renal failure on the function of pancreatic islets. Pancreas. 2014; 43, 5: 801-808.

wskaźnik Impact Factor: 2.959

Punktacja MNiSW: 30.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego celem wytworzenia modelu eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 20%.

5. Brymora A, Flisiński M, Grześk G, Szadujkis-Szadurski L, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Inflammation, malnutrition and vascular contraction in experimental chronic kidney disease. J Nephrol. 2007; 20(4):423-9.  
Impact Factor: 1.138  
Punktacja MNiSW: 15.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego celem wytworzenia modelu eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

6. Stróżecki P, Kurowski R, Flisiński M, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in patients with diabetic nephropathy and patients with chronic kidney disease without diabetes. Pol Arch Med Wewn 2013; 123: 609-616.  
IF: 2,052  
Punktacja KBN/MNiSzW: 30,000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: rekrutacji grupy badanej, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 15%.

7. Stróżecki P, Kurowski R, Flisiński M, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Confirming the causal role of advanced glycation end-products in arterial stiffening. E. Yalcinkaya, M. Celik. Authors's reply. Pol. Arch. Med. Wewn. 2014; 124, 3: 148-149.  
Wskaźnik Impact Factor: 2.121  
Punktacja MNiSW: 30.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.

8. Stróżecki P, Serafin Z, Adamowicz A, Flisiński M, Włodarczyk Z, Manitius J. Coronary artery calcification and large artery stiffness in renal transplant recipients. Adv. Med. Sci. 2015; 60, 2: 240-245.  
wskaźnik Impact Factor: 1.211  
Punktacja MNiSW: 15.000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: rekrutacji grupy badanej, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 10%.



9. Stróżecki P, Flisiński M, Serafin Z, Wiechecka-Korenkiewicz J, Manitius J. Abdominal collateral vein as an unconventional vascular access for hemodialysis in patient with central vein occlusion. Semin Dial 2014; 27(4):E48-50.  
IF: 1.745  
Punktacja KBN/MNiSzW: 30,000

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 20%.

**Sumaryczna wartość punktacji prac naukowych, które nie wchodzą w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w pkt. IV, a znajdują się w bazie Journal Citation Reports wynosi:**

IF: 15,652

Punktacja KBN/MNiSzW: 200

**B. Monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych, innych niż znajdujące się w bazie, o której mowa w punkcie V A:**

1. Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M :The cystic artery in human foetuses. Folia Morphol. 2004;63,1:47-50.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu tętnicy pęcherzykowej, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, analizie piśmiennictwa, przetłumaczeniu pracy na język angielski, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 30%.
2. Krakowiak-Sarnowska E, Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. The pancreaticoduodenal arteries in human foetal development. Folia Morphol. 2004;63,3:281-284.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu tętnic trzustkowo-dwunastniczych, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, analizie piśmiennictwa, przetłumaczeniu pracy na język angielski, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 30%.
3. Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. Perforating veins of the shin in human foetuses. Folia Morphol. 2004;63,4:445-448.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu żył przeszywających goleni, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, analizie piśmiennictwa, przetłumaczeniu pracy na język angielski, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 30%.
4. Krakowiak-Sarnowska E, Flisiński P, Szpinda M, Sarnowski J, Lisewski P, Flisiński M. Morphometry of the pancreas in human foetuses. Folia Morphol. 2005;64,1:29-32.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: udziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu trzustki, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, analizie piśmiennictwa, przetłumaczeniu pracy na język angielski, przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 25%.

5. Szpinda M, Flisiński P, Elminowska-Wenda G, Flisiński M, Krakowiak-Sarnowska E. The variability and morphometry of the brachiocephalic trunk in human fetuses. *Folia Morphol.* 2005;64,4:309-314.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu pnia ramienno-głowego, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 25%.

6. Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. Variability and morphometric parameters of the carotid arteries in human fetuses. *Med. Biol. Sci.* 2005;19,4:147-151.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, udziale w preparowaniu tętnic szyjnych, przygotowaniu dokumentacji zdjęciowej, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 30%.

7. Flisiński M, Korenkiewicz J, Pączkowska B, Manitius J. Ostre cewkowo-śródmiąższowe zapalenie nerek u pacjenta z zespołem nerczycowym. *Probl. Lek.* 2002;41, 6:381-384.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zgromadzeniu danych klinicznych, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

8. Flisiński M, Manitius J. Czynniki prognostyczne powodzenia zabiegu rewaskularyzacji tętnicy nerkowej u chorych z przewlekłą chorobą niedokrwienną nerek. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2005;19,110:206-210.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

9. Brymora A, Flisiński M, Grześk G, Szadujkis-Szadurski L, Manitius J. Analiza reakcji izolowanej tętnicy ogonowej szczura z przewlekłą, eksperymentalną niewydolnością nerek na działanie angiotensyny II. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2005;9,2:88-94.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego celem wytworzenia modelu eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 40%.

10. Brymora A, Flisiński M, Grześ G, Szadujkis-Szadurski L, Manitius J. Stan zapalny, ciśnienie tętnicze i postępujące uszkodzenie ściany naczynia w przewlekłej, eksperymentalnej chorobie nerek. *Nadciśnienie Tętnicze*. 2006; 10, 2:111-120.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu projektu badania, przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego celem wytworzenia modelu eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 40%.
11. Flisiński M, Brymora A, Manitius J. Zaburzona struktura mikrokrążenia w mięśniach szkieletowych w przebiegu przewlekłej choroby nerek. *Problemy Lekarskie*. 2006;45,3:107–110.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 80%
12. Stróżecki P, Flisiński M, Manitius J. Wpływ zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej na budowę i czynności mięśni szkieletowych u chorych dializowanych. *Probl. Lek.* 2006;45,3:114-116.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 20%.
13. Flisiński M, Stróżecki P, Stefańska A, Zarzycka-Lindner G, Brymora A, Manitius J. Cardiac troponin I in patients with chronic kidney disease treated conservatively or undergoing long-term hemodialysis. *Kardiologia Polska*. 2007;65:1068-1075.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: opracowaniu projektu badania, rekrutacji grupy badanej, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie uzyskanych wyników, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 70%.
14. Stróżecki P, Flisiński M, Brymora A, Kurowski R, Doroszewski W, Zarzycka-Lindner G, Oręziak A, Manitius J. Ocena stosowania leków blokujących układ renina-angiotensyna-aldosteron u chorych hemodializowanych. *Nadciśnienie Tętnicze*. 2007;11,4:310-317.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: udziale w opracowaniu projektu badania, rekrutacji grupy badanej, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 10%.
15. Marcinkowska E, Flisiński M, Manitius J. Znaczenie i prognostyczne troponin w przewlekłej chorobie nerek. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2007;23,137:375-381.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 20%.

16. Brymora A, Trafny R, Bogucka S, Marszałek A, Korenkiewicz J, Flisiński M, Manitius J. Anderson-Fabry disease : diagnostic problems from gastrointestinal manifestations to the diagnosis of kidney disease. Pol. Arch. Med. Wewn. 2008;118,11:670-674.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 15%.
17. Flisiński M, Windyga J, Stefańska E, Huszcza S, Donderski R, Manitius J. Acquired hemophilia : a case report. Pol. Arch. Med. Wewn. 2008;118,4:228-233.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: przygotowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 70%.
18. Błażejewska A, Flisiński M, Pypkowski J, Manitius J. Pierwotna czy trzeciorzędowa nadczynność przytarczyc u chorej na przewlekłą chorobę nerek - opis przypadku. Pol. Merkuriusz Lek. 2009;27,162:484-487.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, zgromadzeniu danych klinicznych, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 30%.
19. Goszka G, Brymora A, Flisiński M, Manitius J. Dietary fructose - prevalence and effects on metabolism, potential risk of increased metabolic syndrome complications. Med. Biol. Sci. 2010;24,2:11-15.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: współudziale w opracowaniu koncepcji pracy, analizie piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 20%.
20. Kretowicz M, Goszka G, Brymora A, Flisiński M, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Czy istnieje związek pomiędzy dziennym spożyciem fruktozy a wartościami ciśnienia tętniczego i stężeniem kwasu moczowego u chorych z przewlekłą chorobą nerek bez cukrzycy? Czasopismo: Nadciśnienie Tętnicze. 2011;15,6:341-346.  
Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: rekrutacji grupy badanej, wprowadzaniu wyników do bazy, analizie piśmiennictwa oraz przygotowaniu tekstu do publikacji.  
Mój udział procentowy szacuję na 15%.
21. Serwacka A, Protaziuk T, Zagozda M, Popow A, Kierzkiewicz M, Manitius J, Myśliwiec M, Daniewska D, Gołębiowski S, Rydzewska-Rosołowska A, Flisiński M, Stępień K, Rydzewska G, Olszewski WL, Rydzewski A. Lack of effect of the

CD14 promoter gene C-159T polymorphism on nutritional status parameters in hemodialysis patients. Med. Sci. Monitor. 2011;17, 2:CR117-CR121.

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: udziale w rekrutacji grupy badanej, udziale w pomiarach antropometrycznych.

Mój udział procentowy szacuję na 5%.

Wykaz wszystkich publikacji został przygotowany przez Bibliotekę Medyczną Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i stanowi Załącznik nr 5 do wniosku.

#### **Omówienie wyników publikacji, które nie wchodzą w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w pkt. IV**

Poza problematyką zaburzeń mikrostruktury mięśni szkieletowych w przebiegu PChN głównymi obszarami mojej działalności naukowo-badawczej były:

1. Badania oceniające funkcję mezenchymalnych komórek macierzystych w przewlekłej chorobie nerek.
2. Ocena wpływu fruktozy na funkcję nerek u pacjentów z PChN w stadium 2 i 3 oraz wysp trzustkowych w eksperymentalnej niewydolności nerek u szczurów.
3. Powikłania sercowo-naczyniowe w PChN w badaniach klinicznych i eksperymentalnych.

#### **Ad. 1.**

Wykazanie, że komórki progenitorowe śródbłonna pochodzące ze szpiku kostnego (EPC) są ważne w przebudowie naczyń i ponownym odbudowaniu uszkodzonej ściany naczyniowej (Asahara 1999) stały się punktem wyjścia dla badań przeprowadzonych w kooperacji z zespołem Prof. dr hab. Tomasza Drewy z Zakładu Inżynierii Tkankowej Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy. W badaniu analizowano liczebność oraz zdolność do proliferacji hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) CD34-. Komórki wyizolowano z materiału pobranego z głów kości udowych od szczurów z eksperymentalną niewydolnością nerek – model CKD1/2 i CKD5/6 oraz z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnic w liczbie MSC izolowanych od szczurów z grupy kontrolnej i obu grup CKD. Natomiast już we wczesnych stadiach PChN (grupa CKD1/2) zaobserwowano mniejszą zdolność do proliferacji MSC in vitro. **Hodowle pierwotne CD34- pobrane od szczurów w grupie CKD1/2 i CKD5/6 przestawały się dzielić w ciągu 2 tygodni, podczas gdy komórki z grupy kontrolnej wykazały prawidłową morfologię mezenchymalnych komórek macierzystych w ciągu 3 miesięcznej obserwacji. Badanie to wykazało nieprawidłową funkcję MSC obecną już we wczesnych stadiach PChN.** Ponieważ MSC mogą migrować do miejsc uszkodzenia śródbłonna i brać udział w jego regeneracji, zmniejszona zdolność do proliferacji tych komórek może być ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za nieprawidłową angiogenezę i dysfunkcję śródbłonna w PChN. Praca opublikowana przez Noh i wsp. (Noh 2012) potwierdziła nasze obserwacje wykazując nieprawidłowości zarówno w angiogenezie, jak i funkcji MSC wyizolowanych od myszy z eksperymentalną niewydolnością nerek (CKD). MSC charakteryzowały się zmniejszoną ekspresją HIF-1, VEGF i VEGFR-1. Przedwczesne starzenie się MSC było odpowiedzialne

za utratę zdolności do migracji i tworzenia struktur kapilarnych in vitro. Co ciekawe, zaburzenia funkcji MSC utrzymywały się również po ich przeniesieniu do środowiska bez toksyn moczowych. Wyniki te pokrywały się z wykazanymi przez nas wcześniej zaburzeniami ekspresji HIF-1, VEGF i VEGFR-1 w mięśniu brzuchatym łydki, wyizolowanym od szczurów z niewydolnością nerek. **Przedstawione dane doprowadziły do postawienia przeze mnie hipotezy, że zaburzenia metaboliczne w PChN mogą być przyczyną globalnego defektu regulacji angiogenezy w tkankach, poprzez uszkodzenie genomu oraz nieprawidłowe przekazywanie sygnału między komórkami i mechanizmy naprawcze. Swoje stanowisko przesłałem jako List do Redakcji czasopisma Nephrology Dialysis and Transplantation (Flisiński 2012)**

## Ad. 2.

Potwierdzono, że nadmierne spożycie fruktozy, powszechnie stosowanej jako słodzik w przemyśle spożywczym, stanowi czynnik ryzyka rozwoju hiperurykemii (Choi 2007), nadciśnienia tętniczego (Jalal 2010), zespołu metabolicznego (Johnson 2009) i uszkodzenia nerek (Nakayama 2010). W badaniu obserwacyjnym (Kretowicz 2011), które zostało przeprowadzone przy moim współudziale, w grupie pacjentów z PChN w stadium 2-4 wykazaliśmy dodatnią korelację pomiędzy dobowym spożyciem fruktozy a stężeniem kwasu moczowego oraz między stężeniem kwasu moczowego, a liczbą przyjmowanych leków obniżających ciśnienie tętnicze. Nadmierne spożycie fruktozy może zatem stanowić czynnik ryzyka progresji PChN. Wobec tego interwencja w postaci zastosowania diety niskofruktozowej może mieć korzystny wpływ na hamowanie progresji choroby. Ponieważ dotychczas nie przeprowadzono badań oceniających wpływ takiej diety u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, nawiązaliśmy współpracę z Profesorem Richardem J. Johnson`em z Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado Denver, USA, który jest ekspertem w zakresie badań nad toksycznym wpływem fruktozy na rozwój epidemii otyłości, cukrzycy i progresji niewydolności nerek. Przeprowadziliśmy pilotażowe badanie, w którym ocenialiśmy wpływ diety o niskiej zawartości fruktozy na wykładniki stanu zapalnego, wydalanie kwasu moczowego i funkcję nerek (Brymora 2012). Grupę badaną stanowiło 28 chorych bez cukrzycy (17 mężczyzn, 11 kobiet w średnim wieku 59 lat) w stadium 2 i 3 PChN (średni eGFR 47 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>). Interwencja dietetyczna polegała na zmianie diety podstawowej zawierającej około 60 g fruktozy (HF) dziennie (z czego 2/3 stanowiły cukry przemysłowe), na dietę o zawartości około 12 gramów na dobę (LF) przez 6 tygodni. Dieta była ustalana, a następnie monitorowana przez dietetyka, a jej przestrzeganie raportowane za pomocą dzienniczka samokontroli. Po okresie sześciu tygodni diety, pacjenci mogli wznowić swoją regularną dietę i byli obserwowani przez kolejne 6 tygodni. Spożycie fruktozy w okresie powrotu do stosowania regularnej diety wyniosło średnio 53 gramy/dobę i było nieznacznie niższe od spożycia fruktozy w okresie podstawowym. Nie stwierdzono różnic w ogólnym spożyciu kalorii we wszystkich trzech okresach badania. Zastosowanie diety LF, przez stosunkowo krótki okres 6 tygodni, wiązało się z obniżeniem ciśnienia tętniczego. Ta redukcja ciśnienia była istotna statystycznie w grupie pacjentów zakwalifikowanych, na podstawie całodobowego pomiaru ciśnienia tętniczego (ABPM), do grupy dipper w przeciwieństwie do pacjentów non-dipper (spadek nocny ciśnienia mniejszy niż 10%). Nie wykazano wpływu na szacowaną wielkość filtracji kłębuszkowej metodą MDRD (eGFR) ani białkomocz, aczkolwiek obecny był trend do niższego stężenia kreatyniny

i wzrostu eGFR. Potwierdzono natomiast obniżenie rozpuszczalnej międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej – 1 (sICAM-1), CRP i stężenia insuliny na czczo. Obecna była tendencja do obniżenia się stężenia kwasu moczowego w surowicy oraz nieistotna redukcja wydalania kwasu moczowego i frakcyjnego wydalania kwasu moczowego z moczem. **Jedną z ciekawszych obserwacji było to, że korzyści płynące ze stosowania diety w odniesieniu do obniżenia się wartości ciśnienia tętniczego, stężenia kwasu moczowego w surowicy i stanu zapalnego utrzymywały się również po powrocie do stosowania normalnej diety. W świetle uzyskanych wyników można przypuszczać, że wydłużenie okresu stosowania diety niskofruktozowej doprowadziłoby do poprawy funkcji nerek. Ta interwencja dietetyczna może być zatem cenną strategią w hamowaniu postępu choroby w grupie pacjentów z PChN w stadium 2 i 3.**

W kolejnej pracy eksperymentalnej nad rolą fruktozy, przeprowadzonej w kooperacji z dr Martą Pokrywczyńską z Zakładu Medycyny Regeneracyjnej Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, oceniano wpływ diety o podwyższonej zawartości fruktozy na liczbę i funkcję wysp trzustkowych, u szczurów w różnych stadiach eksperymentalnej przewlekłej choroby nerek – model CKD1/2 i CKD5/6 oraz w grupie kontrolnej (CON) (Pokrywczyńska 2014). Szczury z każdej z grup zostały przyporządkowane do 3 różnych protokołów diety: RD - dieta standardowa zawierająca 3% fruktozy; F10 – dieta RD z dodatkiem 10% roztworu fruktozy w wodzie do picia; F60 – komercyjna karma w formie stałej o zawartości 60% fruktozy. Po 8 tygodniach pozostawania na diecie przeprowadzono ocenę liczby wysp trzustkowych oraz ich żywotności. Oceniono również funkcję wysp trzustkowych w teście stymulacji wydzielania insuliny pod wpływem niskiego (2,8 mmol/l) i wysokiego (16,7 mmol/l) stężenia glukozy. Wyliczono wskaźnik stymulacji wydzielania insuliny (SI), który był wyrażony jako iloraz wydzielania insuliny w odpowiedzi na wysokie stężenie glukozy do wydzielania insuliny w odpowiedzi na niskie stężenie glukozy. Nie wykazano różnic w ilości wysp trzustkowych wyizolowanych w badanych grupach na diecie RD (zatem sama niewydolność nerek nie miała wpływu na liczbę wysp). Natomiast wykazano znacznie większą liczbę wysp w grupie CON pod wpływem diety F10 i F60 w porównaniu z CON na diecie RD, a także w porównaniu z grupami CKD1/2 i CKD5/6 na diecie F10 i F60 (zatem dieta wysoko-fruktozowa w grupie CON prowadziła do zwiększenia liczby wysp, natomiast nie zaobserwowano tego efektu w obu grupach CKD). Wysepki wyizolowane od szczurów CON niezależnie od rodzaju diety charakteryzowały się wyższą żywotnością komórek, niż te pochodzące od zwierząt z grup CKD. **Wykazano istotne zaburzenia uwalniania insuliny w odpowiedzi na glukozę, które różniły się w zależności od zawartości fruktozy w diecie w grupach z niewydolnością nerek.** Wskaźnik SI wykazał istotnie wyższe wartości w grupach CKD na diecie F10 w porównaniu z CON. Podczas gdy w grupach CKD dieta F60 powodowała zmniejszenie wartości SI wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek. **Dieta o dużej zawartości fruktozy przyspieszała również włóknienie trzustki wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek.** Wykazano obniżenie stężenia insuliny i peptydu C w grupie CKD5/6 na diecie F60 w porównaniu z CDK5/6 na diecie F10, co korelowało z nasileniem zmian zwyrodnieniowych. Natomiast dieta F10 odpowiadała za wzrost stężenia insuliny i peptydu C w surowicy oraz zwiększała oporność na insulinę (HOMA-IR), bardziej niż dieta F60 we wszystkich grupach badanych. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ilości spożytych kalorii pomiędzy grupami. Jednak ostateczna masa ciała i przyrost masy ciała były zależne od stosowanej diety i wykazały tendencję odwrotną, wzrastały na

diecie F10 i zmniejszały się na diecie F60. **Wyniki tego badania wskazują zatem na odmienny wpływ diety wysokofruktozowej na funkcję wysp trzustkowych – o ile 10% fruktoza stymuluje insulinooporność, to dieta o bardzo wysokiej zawartości fruktozy 60% wykazuje działanie toksyczne, wyczerpanie wysp trzustkowych i nasilone włóknienie narządu. Niewydolność nerek wykazuje działanie addycyjne w procesie uszkodzenia wysp trzustkowych, poprzez nasilanie włóknienia oraz zaburzenia metaboliczne nasilające insulinooporność.** Wyniki te potwierdzają również badania innych autorów (Gu 2017).

### Ad. 3.

Choroby sercowo-naczyniowe (CVD) odpowiadają za zwiększoną śmiertelność chorych z PChN, która wynosi w przybliżeniu 9% rocznie i jest średnio 20 razy większa w porównaniu z grupą osób zdrowych (Foley 1998). Mechanizmy, które predysponują pacjentów z PChN do zwiększonego ryzyka CVD, nie są dobrze poznane, ale sugeruje się, że zaburzenia funkcji śródbłonna mogą odgrywać ważną rolę (Schiffrin 2007). Dysfunkcja śródbłonna uznawana jest za wczesny marker CVD (Brocq 2008), który odpowiada za nieprawidłowy skład macierzy pozakomórkowej, pogrubienie błony wewnętrznej, przerost komórek mięśni gładkich, co umożliwia postęp miażdżycy (Chhabra 2009) i przyczynia się do rozwoju nadciśnienia (Félétou 2010). Zmiany te mogą prowadzić do nieprawidłowej odpowiedzi wazokonstrykcyjnej (Brymora 2005) i wazodylatacyjnej (Luksha 2012) tętnic lub zwiększonej prędkości fali tętna (PWV) (Stróżecki 2013).

W badaniu eksperymentalnym przeprowadzonym z dr Andrzejem Brymorą z Kliniki Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, analizowaliśmy reakcję skurczową tętnicy ogonowej szczura (tętnica oporowa) w odpowiedzi na działanie wzrastających stężeń fenylefryny (PHE) (Brymora 2007) w różnych stadiach PChN indukowanej zabiegiem chirurgicznej resekcji 1/2, 3/4 i 5/6 miazdzy nerek. Wykazano, że reaktywność tętnic ogonowych szczurów na PHE była największa w grupach po zabiegu nefrektomii 1/2 i 3/4 miazdzy nerek w porównaniu z grupą kontrolną i po zabiegu nefrektomii 5/6. W grupie nefrektomii 5/6 wykazano osłabioną reaktywność naczynia na PHE oraz najwyższe wartości ciśnienia tętniczego. Również inni autorzy (Spradley 2013) potwierdzili, uzyskane przez nas wyniki, mniejszej wrażliwości tętnic na PHE u szczurów po zabiegu nefrektomii 5/6. Uważa się, że odpowiada za to zwiększona aktywność syntazy tlenku azotu w tętnicy ogonowej, wtórnie do nadciśnienia tętniczego i nasilonego stresu oksydacyjnego. Nieprawidłowa kurczliwość tętnicy ogonowej w PChN została wykazana również po podaniu angiotensyny II (Ang II) (Brymora 2005, Brymora 2006). **Nasze wspólne badania w tym zakresie potwierdzają upośledzoną funkcję śródbłonna, wtórnie do stanu zapalnego, obecną już we wczesnych stadiach PChN, co odpowiada za nieprawidłową reakcję skurczową i rozkurczową naczynia.** W bardziej zaawansowanych stadiach PChN, wraz z pojawieniem się nadciśnienia tętniczego, zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz nagromadzeniu zaawansowanych produktów glikacji (AGE) dochodzi do dalszej przebudowy naczyń oraz ich zwiększonej sztywności, co zostało potwierdzone w badaniu przeprowadzonym w grupie pacjentów z PChN w okresie przeddializacyjnym (Stróżecki 2013, Stróżecki 2014). W badaniach przeprowadzonych wspólnie z dr hab. Pawłem Stróżeckim z Kliniki Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy, **stwierdziliśmy wyższe stężenie AGE i**



zwiększoną sztywność tętnic, ocenianą metodą pomiaru prędkości fali tętna (PWV) w grupie chorych z PChN w stadium 3-4. Zaburzenia te były szczególnie nasilone u pacjentów z nefropatią cukrzycową. W innym badaniu, którego byłem współautorem (Stróżecki 2015) przeprowadzonym w grupie pacjentów po zabiegu przeszczepienia nerki (RTR) potwierdzono wysoką częstość, wynoszącą 69%, występowania zwapnień naczyń wieńcowych, co przekładało się również na większą sztywność naczyń ocenianą metodą PWV. W populacji pacjentów z PChN już w okresie przeddializacyjnym prawdopodobieństwo zgonu z powodu powikłań sercowo-naczyniowych jest większe, niż rozpoczęcia terapii nerkozastępczej (Sarnak 2003). PChN jest bowiem niezależnym czynnikiem ryzyka choroby wieńcowej (CAD), która jest główną przyczyną zachorowalności i śmiertelności chorych z PChN. Wynika to z nagromadzenia licznych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, zarówno tradycyjnych jak i specyficznie skojarzonych z PChN, jak zapalenie, stres oksydacyjny, dysfunkcja śródbłonna, zwapnienia naczyń wieńcowych, hiperhomocysteinemia oraz AGE które odpowiadają za przyspieszoną miażdżycę tętnic. (Cai 2013). Objawy CAD mogą nie być typowe, a testy diagnostyczne zwłaszcza w odniesieniu do stężenia troponin sercowych (Tn) charakteryzują się mniejszą czułością i specyficznością. Ponadto stężenia troponin mogą być niespecyficycznie podwyższone w surowicy chorych z PChN (Marcinkowska 2007). Z tego powodu przeprowadziłem badanie, w którym porównywałem stężenie TnI w grupie pacjentów z PChN stadium 3-5, przewlekłe hemodializowanych (HD) i w grupie osób zdrowych. **Wykazałem, istotnie wyższe stężenia TnI w grupie HD i nieistotnie podwyższone w grupie PChN, w porównaniu z kontrolną** (odpowiednio  $0,063 \pm 0,08$  i  $0,066 \pm 0,162$  do  $0,01 \pm 0,03$  ng/ml). **U 46% pacjentów HD stężenie cTnI znajdowało się powyżej wartości 99 percentyla dla zupełnie zdrowej populacji, przy braku klinicznych objawów CAD, przewlekłej niewydolności serca w III/IV klasie wg NYHA i po wykluczeniu cukrzycy. W żadnym przypadku stężenie TnI nie przekroczyło jednak wartości odcięcia dla ostrego zawału serca. Wraz z zaawansowaniem niewydolności nerek obecne było istotnie wyższe stężenie CRP, wyższe wartości ciśnienia tętniczego i większy przerost mięśnia lewej komory serca. Podwyższone stężenie troponi odzwierciedla zatem zaawansowanie współistniejących powikłań ze strony układu sercowo- naczyniowego.** W innym badaniu (Stróżecki 2007) obejmującym grupę 102 chorych hemodializowanych wykazaliśmy wysoką 45% częstość występowania objawów niewydolności serca (CHF) w tej grupie chorych. Podczas gdy leki z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-i) i blokujących receptor dla angiotensyny 2 (ARB) były stosowane tylko u 57% pacjentów z CHF. Główne przeciwwskazania do stosowania tych grup leków stanowiły niskie wartości ciśnienia tętniczego i hiperkaliemia. **Intersującą obserwacją tej pracy było wykazanie, że zastosowanie ACEi lub ARB u chorych HD z niewydolnością serca, wiązało się z mniejszym ryzykiem hiperkaliemii, w porównaniu do chorych HD bez objawów CHF. Badanie to potwierdza fakt, że pomimo dużego ryzyka sercowo-naczyniowego pacjentów z PChN, często nie otrzymują oni optymalnego leczenia.**

Poza wymienionymi powyżej pracami, brałem również udział w badaniu oceniającym wpływ polimorfizmu promotora CD14 genu C-159T u pacjentów hemodializowanych na wskaźniki stanu odżywienia (Serwacka 2011). Jestem autorem kilku prac poglądowych dotyczących znaczenia diagnostycznego i rokowniczego sercowych troponin w populacji pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (Marcinkowska 2007), oceny wskaźników powodzenia

zabiegu rewaskularyzacji miażdżycowego zwężenia tętnic nerkowych (Flisiński 2005), wpływu fruktozy na zespół metaboliczny (Goszka 2010), a także prac kazuistycznych przedstawiających przypadek wykorzystania żył krążenia obocznego, jako dostępu do hemodializy, u pacjenta z niedrożnym spływem żył głównych (Stróżecki 2014), nabytej hemofilii (Flisiński 2008), choroba Anderssona-Fabry'ego (Brymora 2008), zastosowania cinakalcetu w leczeniu pierwotnej nadczynności przytarczyc (Błażejewska 2009) i ostrego śródmiąższowego zapalenia nerek u pacjenta z zespołem nerczycowym (Flisiński 2002). W okresie pracy w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej brałem udział w badaniach anatomicznych, których tematem była charakterystyka morfometryczna i zmienność położenia pnia ramienno-głowego (Szpinda 2005), tętnicy pęcherzykowej (Flisiński 2004), tętnic trzustkowo-dwunastniczych (Krakowiak-Sarnowska 2004) i żył przeszywających goleni (Flisiński 2004) oraz ocena morfometryczna położenia trzustki (Krakowiak-Sarnowska 2005).

### **Piśmiennictwo cytowane w omówieniu punktów V A i V B:**

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner KM, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85: 221–228.

Błażejewska A, Flisiński M, Pypkowski J, Manitius J. Pierwotna czy trzeciorzędowa nadczynność przytarczyc u chorej na przewlekłą chorobę nerek - opis przypadku. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2009;27,162:484-487.

Brocq ML, Leslie SJ, Milliken P, Megson I. Endothelial Dysfunction: From Molecular Mechanisms to Measurement, Clinical Implications, and Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10: 1631–1674).

Brymora A., Flisiński M, Grzešek G, Szadujkis-Szadurski L, Manitius J. Analiza reakcji izolowanej tętnicy ogonowej szczura z przewlekłą, eksperymentalną niewydolnością nerek na działanie angiotensyny II. *Nadciśnienie Tętnicze* 2005, 9, 2, 88–94

Brymora A, Flisiński M, Grzešek G, Szadujkis-Szadurski L, Manitius J. Stan zapalny, ciśnienie tętnicze i postępujące uszkodzenie ściany naczyń w przewlekłej, eksperymentalnej chorobie nerek. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2006; 10,2:111-120.

Brymora A, Flisiński M, Grzešek G, Szadujkis-Szadurski L, Odrowaz-Sypniewska G, Manitius J. Inflammation, malnutrition and vascular contraction in experimental chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2007; 20(4):423-9.

Brymora A, Trafny R, Bogucka S, Marszałek A, Korenkiewicz J, Flisiński M, Manitius J. Anderson-Fabry disease : diagnostic problems from gastrointestinal manifestations to the diagnosis of kidney disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008; 118,11:670-674.

Brymora A, Flisiński M, Johnson R.J., Goszka G., Stefańska A., Manitius J. Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012; 27, 2: 608-612.

Cai Q, Mukku VK, Ahmad M Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update. *Curr Cardiol Rev.* 2013; 9(4):331-9.

- Chhabra N. Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis. *Internet J Med Update*. 2009; 4: 33–41.
- Choi JW, Ford ES, Gao X, Choi HK. Sugar-sweetened soft drinks, diet soft drinks, and serum uric acid level: the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Rheum*. 2007; 59: 109–116.
- Drewa T, Joachimiak R, Kaźnica A, Flisiński M, Brymora A, Manitius J. Bone marrow progenitors from animals with chronic renal failure lack capacity of in vitro proliferation. *Transplant Proc*. 2008; 40(5): 1668-73.
- Félétou M, Köhler R, Vanhoutte P. Endothelium-derived Vasoactive Factors and Hypertension: Possible Roles in Pathogenesis and as Treatment Targets. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12: 267–275.
- Flisiński M, Korenkiewicz J, Pączkowska B, Manitius J. Ostre cewkowo-śródmiąższowe zapalenie nerek u pacjenta z zespołem nerczycowym. *Probl. Lek*. 2002;41, 6:381-384.
- Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. The cystic artery in human fetuses. *Folia Morphol*. 2004; 63,1:47-50.
- Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. Perforating veins of the shin in human fetuses. *Folia Morphol*. 2004; 63,4:445-448.
- Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. Variability and morphometric parameters of the carotid arteries in human fetuses. *Med. Biol. Sci*. 2005; 19,4:147-151.
- Flisiński M, Manitius J. Czynniki prognostyczne powodzenia zabiegu rewaskularyzacji tętnicy nerkowej u chorych z przewlekłą chorobą niedokrwinną nerek. *Pol. Merkuriusz Lek*. 2005; 19,110:206-210.
- Flisiński M, Brymora A, Manitius J. Zaburzona struktura mikrokrążenia w mięśniach szkieletowych w przebiegu przewlekłej choroby nerek. *Problemy Lekarskie*. 2006; 45,3:107–110.
- Flisiński M, Stróżecki P, Stefańska A, Zarzycka-Lindner G, Brymora A, Manitius J. Cardiac troponin I in patients with chronic kidney disease treated conservatively or undergoing long-term hemodialysis. *Kardiol Pol*. 2007; 65:1068-1075.
- Flisiński M, Windyga J, Stefańska E, Huszcza S, Donderski R, Manitius J. Acquired hemophilia : a case report. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2008; 118,4:228-233.
- Flisiński M, Drewa T, Manitius J. From stem cells incompetence to angiogenesis disorders in skeletal muscle in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012; 27, 1, 225. <http://ndt.oxfordjournals.org/content/27/1/218.full/reply>
- Foley N.R., Parfrey S.P., Sarnak M.J. Cardiovascular disease in chronic renal failure. *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal failure*. *Am. J. Kidney Dis*. 1998; 32 (supl.): S112–S119
- Goszka G, Brymora A, Flisiński M, Manitius J. Dietary fructose - prevalence and effects on metabolism, potential risk of increased metabolic syndrome complications. *Med. Biol. Sci*. 2010; 24,2:11-15.
- Gu TT, Song L, Chen TY, Wang X, Zhao XJ, Ding XQ, Yang YZ, Pan Y, Zhang DM, Kong LD: Fructose downregulates miR-330 to induce renal inflammatory response and insulin signaling impairment: Attenuation by morin. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(8).
- Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21: 1543–1549.

- Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glasscock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev* 2009; 30: 96–116.
- Krakowiak-Sarnowska E, Flisiński P, Szpinda M, Flisiński M. The pancreaticoduodenal arteries in human foetal development. *Folia Morphol.* 2004; 63,3:281-284.
- Krakowiak-Sarnowska E, Flisiński P, Szpinda M, Sarnowski J, Lisewski P, Flisiński M. Morphometry of the pancreas in human fetuses. *Folia Morphol.* 2005; 64,1:29-32.
- Kretowicz M, Goszka G, Brymora A, Flisiński M, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Czy istnieje związek pomiędzy dziennym spożyciem fruktozy a wartościami ciśnienia tętniczego i stężeniem kwasu moczowego u chorych z przewlekłą chorobą nerek bez cukrzycy? *Czasopismo: Nadciśnienie Tętnicze.* 2011; 15,6:341-346.
- Luksha L, Stenvinkel P, Hammarqvist F, Carrero JJ, Davidge ST, Kublickiene K. Mechanisms of endothelial dysfunction in resistance arteries from patients with end-stage renal disease. *PLoS One.* 2012; 7(4):e36056.
- Marcinkowska E, Flisiński M, Manitius J. Znaczenie diagnostyczne i prognostyczne troponin w przewlekłej chorobie nerek. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2007; 23,137:375-381.
- Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Roncal C, Perez-Pozo SE, Johnson RJ, Nakagawa T. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298(3): F712-20.
- Noh H, Yu MR, Kim HJ, Jeon JS, Kwon SH, Jin SY, Lee J, Jang J, Park JO, Ziyadeh F, Han DC, Lee HB. Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 218-225
- Pokrywczyńska M, Flisiński M, Jundziłł A., Krzyżanowska S., Brymora A., Deptuła A., Bodnar M., Kloskowski T., Stefańska A., Marszałek A., Manitius J., Drewa T. Impact of fructose diet and renal failure on the function of pancreatic islets. *Pancreas.* 2014; 43, 5: 801-808.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-69.
- Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic Kidney Disease: Effects on the Cardiovascular System. *Circulation.* 2007; 116: 85–97.
- Serwacka A, Protaziuk T, Zagozda M, Popow A, Kierzkiewicz M, Manitius J, Myśliwiec M, Daniewska D, Gołębiowski S, Rydzewska-Rosołowska A, Flisiński M, Stępień K, Rydzewska G, Olszewski WL, Rydzewski A. Lack of effect of the CD14 promoter gene C-159T polymorphism on nutritional status parameters in hemodialysis patients. *Med. Sci. Monitor.* 2011; 17, 2:CR117-CR121.
- Spradley FT, White JJ, Paulson WD, Pollock DM, Pollock JS. Differential regulation of nitric oxide synthase function in aorta and tail artery from 5/6 nephrectomized rats. *Physiol Rep.* 2013; 1(6):e00145.
- Stróżecki P, Flisiński M, Manitius J. Wpływ zaburzeń gospodarki wapniowo-fosforanowej na budowę i czynności mięśni szkieletowych u chorych dializowanych. *Probl. Lek.* 2006; 45, 3:114-116.

Stróżecki P, Flisiński M, Brymora A, Kurowski R, Doroszewski W, Zarzycka-Lindner G, Oręziak A, Manitius J. Ocena stosowania leków blokujących układ renina-angiotensyna-aldosteron u chorych hemodializowanych. *Nadciśnienie Tętnicze*. 2007; 11,4:310-317.

Stróżecki P, Kurowski R, Flisiński M, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in patients with diabetic nephropathy and patients with chronic kidney disease without diabetes. *Pol Arch Med Wewn*. 2013; 123: 609-616.

Stróżecki P, Kurowski R, Flisiński M, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G, Manitius J. Confirming the causal role of advanced glycation end-products in arterial stiffening. E. Yalcinkaya, M. Celik. Authors's reply. *Pol. Arch. Med. Wewn*. 2014; 124, 3: 148-149.

Stróżecki P, Flisiński M, Serafin Z, Wiechecka-Korenkiewicz J, Manitius J. Abdominal collateral vein as an unconventional vascular access for hemodialysis in patient with central vein occlusion. *Semin Dial* 2014; 27(4):E48-50.

Stróżecki P, Serafin Z, Adamowicz A, Flisiński M, Włodarczyk Z, Manitius J. Coronary artery calcification and large artery stiffness in renal transplant recipients. *Adv. Med. Sci*. 2015; 60, 2, 240-245.

Szpinda M, Flisiński P, Elminowska-Wenda G, Flisiński M, Krakowiak-Sarnowska E. The variability and morphometry of the brachiocephalic trunk in human fetuses. *Folia Morphol*. 2005; 64,4:309-314.

**C. Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania: IF: 23.174 (w tym jako pierwszy autor 7,525)**

**Sumaryczna wartość punktacji KBN/MNiSzW: 395.500**

**Sumaryczna wartość Index Copernicus: 491.110**

**D. Liczba cytowań publikacji:**

- według bazy Web of Science: 123
- według bazy Scopus: 130

**E. Indeks Hirscha:**

- według bazy Web of Science: H=6
- według bazy Scopus: H=7

**F. Kierowanie projektami badawczymi oraz udział w projektach badawczych:**

1. Kierowanie projektem badawczym „Rola czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF-1) w patogenezie rozwoju zmian o charakterze miopatii mocznicowej w różnych funkcjonalnie mięśniach szkieletowych u szczurów z eksperymentalną niewydolnością nerek”; grant UMK nr 02/2010
2. Udział w projekcie badawczym „Wpływ diety za zwiększoną zawartością fruktozy na progresję przewlekłej choroby nerek, białkomocz, indukcję stanu zapalnego, funkcję śródbłónka oraz zmiany w mikrokrażeniu nerek oceniane metodą dopplerowską u szczurów z przewlekłą eksperymentalną niewydolnością nerek”. – grant UMK nr 03/2010.

## **G. Wygłoszenie referatów na międzynarodowych i krajowych konferencjach tematycznych**

1. Mariusz Flisiński. Zaburzona struktura mikrokrążenia w mięśniach szkieletowych w przebiegu przewlekłej choroby nerek.  
VII Krakowskie Dni Dializoterapii. Kraków, 7-9.09.2006
2. Mariusz Flisiński. Udar mózgu a choroby nerek - ujęcie epidemiologiczne.  
XIII Interdyscyplinarnego Forum Polskiego Towarzystwa Udaru Mózgu.  
Sandomierz, 25–26.09.2015.
3. Mariusz Flisiński. Zmiany w mięśniach szkieletowych w przebiegu przewlekłej niewydolności nerek – badania eksperymentalne.  
Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego Oddział Gdańsko-Pomorski i Towarzystwa Internistów Polskich Oddział Bydgosko-Toruński. Toruń, 23.04.2016.

## **H. Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (wykaz zawiera tylko prace w których byłem pierwszym autorem)**

1. M. Flisiński, A. Brymora, G. Elminowska-Wenda, J. Manitus. Ocena zmian w mięśniach szkieletowych szczurów w doświadczalnym modelu przewlekłej niewydolności nerek. IX Zjazd Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. Warszawa, 21-23 X 2004.plakat
2. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, G. Elminowska-Wenda, J. Manitus. The inflammatory state in chronic kidney disease as a cause of rarefaction of capillaries in skeletal muscle. The American Society of Nephrology. Philadelphia, PA, USA, 8-13 XI 2005.plakat
3. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, G. Elminowska-Wenda, J. Manitus. Stan zapalny w przewlekłej chorobie nerek a mikrokrążenie w mięśniach szkieletowych. Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego "Nadciśnienie tętnicze - pomiędzy sercem a nerką". Bydgoszcz, 29 IX-1 X 2005.plakat
4. M. Flisiński, A. Brymora, G. Elminowska-Wenda, K. Walasik, J. Bogucka, J. Manitus. Evaluation of microvasculature and fibre types and their diameters in the rat gastrocnemius muscle in experimental renal failure. 4<sup>th</sup> Conference of Clinical Anatomy of the Polish Anatomical Society. Gdańsk, 29-30 IX 2006. plakat
5. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska. The inflammatory state in chronic kidney disease and its influence on skeletal muscle capillaries and serum angiogenic growth factors concentration. XLIII ERA-EDTA CONGRESS, Glasgow, United Kingdom. 15-18.07.2006. plakat
6. M. Flisiński, A. Brymora, G. Elminowska-Wenda, K. Walasik, J. Bogucka, J. Manitus. Evaluation of muscle microvasculature, fiber types and diameters in experimental renal failure. World Congress of Nephrology. Rio de Janeiro, Brazil 21-25 IV 2007. plakat
7. M. Flisiński, A. Brymora, I. Bartłomiejczyk, L. Pączek, J. Manitus. Lower expression of VEGF and capillary rarefaction in locomotor but not postural skeletal muscles in experimental renal failure. 41st Annual Meeting ASN. Philadelphia, PA, USA, 4-9 XI 2008.plakat
8. M. Flisiński, A. Brymora, R. Gołda, I. Bartłomiejczyk, A. Stefańska, G. Elminowska-Wenda, L. Pączek, J. Manitus. Obniżona zawartość HIF-1 oraz utrata kapilar w mięśniu brzuchatym łydki u szczurów z eksperymentalną przewlekłą chorobą nerek. X Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Bydgoszcz, 26-29 V 2010.plakat
9. M. Flisiński, A. Brymora, I. Bartłomiejczyk, R. Gołda, A. Stefańska, G. Elminowska-Wenda, L. Pączek, J. Manitus. Decreased content of HIF-1 and VEGF-A are responsible

- for capillary rarefaction in locomotor but not postural muscles of rats with CKD. XLVII ERA-EDTA Congress. II DGfN Congress. Munich, Germany, 25-28 VI 2010. plakat
10. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, P. Stróżecki, J. Manitius. The impact of dietary fructose increase on markers of kidney injury and inflammation in rats. ISN World Congress of Nephrology 2013. Sustainability and Diversity. Hong Kong, 31 V-4 VI 2013.plakat
  11. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, P. Stróżecki, T. Drewa, J. Manitius. Wpływ diety z zawartością 60% fruktozy na wskaźniki uszkodzenia nerek i stanu zapalnego u szczurów z eksperymentalną niewydolnością nerek. XX Jubileuszowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Olsztyn-Ryn, 14-16 VI 2012. plakat
  12. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, P. Stróżecki, J. Manitius. The impact of dietary fructose increase on markers of kidney injury and inflammation in uninephrectomized rats. 50th ERA-EDTA Congress. Istanbul, Turkey, 18-21 V 2013. plakat
  13. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, P. Stróżecki, J. Manitius. Wpływ zwiększonej zawartości fruktozy w diecie na wskaźniki uszkodzenia nerek i stanu zapalnego u szczurów. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Wrocław, 20-22 VI 2013. Plakat
  14. M. Flisiński, A. Brymora, P. Stróżecki, A. Stefańska, J. Manitius. The impact of dietary fructose intake on markers of kidney injury and inflammation in subtotaly nephrectomized rats. 51st ERA-EDTA Congress. Amsterdam, The Netherlands 31 V- 3 VI 2014.plakat
  15. M. Flisiński, A. Brymora, P. Stróżecki, A. Stefańska, J. Manitius. Increased fructose intake as a causative factor of proximal tubular injury in rats. ISN World Congress of Nephrology 2015. Cape Town, 2015.03.13.plakat
  16. M. Flisiński, A. Brymora, A. Stefańska, P. Stróżecki, J. Manitius. Wpływ diety wysokofruktozowej na wskaźniki uszkodzenia cewki proksymalnej i funkcji nerek u szczurów po zabiegu subtotalnej nefrektomii. XXII Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego. Kołobrzeg, 2015.06.18.plakat

## **VI. Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacja o współpracy międzynarodowej habilitanta**

### **A. Działalność dydaktyczna:**

1. Moja działalność dydaktyczna rozpoczęła się już w czasie studiów w Akademii Medycznej w Bydgoszczy. W latach 1998-2000, jako wolontariusz, brałem aktywny udział w ćwiczeniach ze studentami prowadzonymi w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej. Po ukończeniu studiów medycznych i odbyciu stażu podyplomowego, od 1 stycznia 2002 rozpocząłem pracę naukowo-dydaktyczną, na stanowisku asystenta, w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej. Po uzyskaniu tytułu specjalisty chorób wewnętrznych w 2007 roku, kontynuuję pracę naukowo-dydaktyczną w Katedrze i Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych. Od 10 lat jestem odpowiedzialny za koordynację zajęć klinicznych z chorób wewnętrznych i nefrologii ze studentami Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum w Bydgoszczy. Jako asystent dydaktyczny zajmuję się opracowywaniem i modyfikacją regulaminów dydaktycznych i sylabusów z nefrologii i chorób wewnętrznych. Przygotowuję bieżące plany zajęć, przeprowadzam zaliczenia testowe, przygotowuję karty obciążeń dydaktycznych. Jestem zaangażowany w organizację egzaminu testowego z chorób wewnętrznych. Prowadzę ćwiczenia i seminaria z przedmiotu choroby wewnętrzne i nefrologia ze studentami Wydziału Lekarskiego i English Division Collegium Medicum w Bydgoszczy.

2. Prowadzenie zajęć ze studentami medycyny w ramach programu międzynarodowej wymiany studentów ERASMUS.
3. Kierowanie specjalizacją w zakresie nefrologii 3 lekarzy (1 zakończona).
4. Udział w kształceniu podyplomowym pielęgniarek – wykłady w ramach kursów doskonalących.
5. Udział w kształceniu podyplomowym diagnostów laboratoryjnych – kierowanie stażem w Stacji Dializ.

#### **B. Działalność popularyzatorska:**

- Udział w kursie przygotowującym studentów do Lekarskiego Egzaminu Krajowego w 08.2017 roku, organizowanym przez Collegium Medicum.
- Udział w cyklicznych akcjach społecznych „Światowy Dzień Nerki” oraz „Światowy Dzień Nadciśnienia Tętniczego”.

#### **C. Udział w komitetach organizacyjnych międzynarodowych i krajowych konferencji naukowych:**

1. Konferencja Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego „Zaburzenia odżywienia w chorobach nerek”, Bydgoszcz, 5-7.09.2003.
2. Konferencja Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego „Nadciśnienie tętnicze – pomiędzy sercem a nerką”. Bydgoszcz, 29.09.-01.10.2005.
3. Konferencja Naukowa Oddziału Gdańsko-Pomorskiego Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego, Bydgoszcz, 27-28.09.2008.
4. X Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego, Bydgoszcz, 26-29.05.2010.

#### **D. Udział w projektach realizowanych we współpracy z naukowcami z innych ośrodków polskich i zagranicznych:**

1. Prof. Richard J. Johnson z Division of Renal Diseases and Hypertension, University of Colorado Denver, Denver, CO, USA.

Badania oceniające wpływ diety o podwyższonej zawartości fruktozy na funkcję nerek, wykładniki zespołu metabolicznego i ciśnienia tętniczego. Współpraca uwieńczona publikacją artykułu w renomowanym czasopiśmie nefrologicznym z listy Journal Citation Reports.

2. Prof. dr. hab. Leszek Pączek z Kliniki Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Instytutu Transplantologii, Uniwersytet Medyczny w Warszawie. Badania oceniające ekspresję czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF-1) u szczurów w różnych stadiach przewlekłej choroby nerek. Współpraca uwieńczona publikacją w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports.

3. Dr hab. inż. Gabriela Elminowska – Wenda z Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy. Badania oceniające mikrostrukturę mięśni szkieletowych u szczurów w różnych stadiach przewlekłej choroby nerek. Współpraca uwieńczona przygotowaniem i obroną rozprawy doktorskiej oraz publikacjami w czasopismach z listy Journal Citation Reports.

4. dr n. med. Ryszard Gołda z Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. Badania oceniające ekspresję białka HIF-1 $\alpha$  w



mięśniach szkieletowych. Współpraca uwieńczona publikacją w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports.

5. dr n. med. Agnieszka Serwacka z Kliniki Chorób Wewnętrznych, Nefrologii i Transplantologii, Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie. Badania oceniające polimorfizm w regionie promotorowym genu receptora CD14 a stanem odżywienia pacjentów przewlekle hemodializowanych. Współpraca uwieńczona publikacją naukową oraz doniesieniami zjazdowymi.

6. Udział w realizacji międzynarodowych badań klinicznych dotyczących leczenia niedokrwistości czynnikami stymulującymi erytropoezę u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w okresie przeddializacyjnym oraz u chorych dializowanych (3 badania kliniczne), ocena skuteczności parikalcytolu w redukcji albuminurii u pacjentów z nefropatią cukrzycową (1 badanie).

**E. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych:**

- Polskie Towarzystwo Nefrologiczne
- Polskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
- Towarzystwo Internistów Polskich
- European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association.

**F. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych i krajowych:**

- Redox Report - 1 recenzja w 2014 roku.
- Journal of Applied Physiology – 1 recenzja w 2015 roku.
- International Journal of Nephrology and Kidney Failure – 1 recenzja w 2017 roku
- Journal of Investigational Biochemistry – 1 recenzja w 2017

**G. Otrzymane nagrody i wyróżnienia**

- Wyróżnienie Dziekana Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy za rozprawę doktorską pt. ” Ocena liczby kapilar oraz średnicy i udziału procentowego włókien mięśniowych w wybranych mięśniach szkieletowych u szczurów w różnych stadiach eksperymentalnej przewlekłej choroby nerek”

**VII. Inne:**

**A. Udział w kursach i szkoleniach:**

- 2005: Postgraduate Training Course in Nephrology, Praga, Czechy.
- 2013: Szkolenie pedagogiczno-etyczne dla nauczycieli akademickich Collegium Medicum w Bydgoszczy.
- 2017: Szkolenie pedagogiczno-etyczne dla nauczycieli akademickich Collegium Medicum w Bydgoszczy.

**B. Działalność lecznicza:**

W mojej codziennej pracy zajmuję się diagnostyką i leczeniem pacjentów hospitalizowanych w Klinice Nefrologii, Nadciśnienia Tętniczego i Chorób Wewnętrznych, a także pozostających pod opieką Stacji Dializ i Poradni Nefrologicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 w Bydgoszczy. Od ponad 10 lat zajmuję się i doskonalam technikę implantacji cewników

dializacyjnych (cewniki czasowe i permanentne) do żył centralnych. Udzielam również konsultacji lekarskich z zakresu nefrologii i chorób wewnętrznych dla innych klinik. Realizuję programy terapeutyczne NFZ, dotyczące leczenia niedokrwistości nerkopochodnej oraz wtórnej nadczynności przytarczyc. Biorę aktywny udział w badaniach klinicznych realizowanych w Klinice Nefrologii, co skutkuje wdrażaniem nowych metod terapeutycznych do praktyki klinicznej.

*Marek Flisowski*

.....  
podpis wnioskodawcy