

dr n. med. Marcin Kurowski

Kliniczne i immunologiczne wykładniki astmy u sportowców

AUTOREFERAT

Łódź, 2017

1. Imiona i nazwisko Marcin Maciej Kurowski

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

lekarz medycyny, 1999, Akademia Medyczna w Łodzi

doktor nauk medycznych, 2004, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

tytuł rozprawy doktorskiej:

Farmakoprofilaktyka objawów sezonowego alergicznego nieżytu nosa z zastosowaniem leku antyleukotrienowego i wybranych leków przeciwhistaminowych

Promotor: prof. dr hab. med. Paweł Górski

specjalista chorób wewnętrznych, 2007

specjalista alergologii, 2011

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

1999 – 2001 lekarz stażysta, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi

2000 – 2004 Studium Doktoranckie, Klinika Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Od 2004 Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, asystent (2004-2008), adiunkt (od 1 XII 2008)

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

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Kliniczne i immunologiczne wykładniki astmy u sportowców (cykl 5 prac)

4.2 Wykaz prac będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie medycyny:

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

Publikacja 1

Kurowski M, Jurczyk J, Krysztofiak H, Kowalski ML. Exercise-induced respiratory symptoms and allergy in elite athletes: Allergy and Asthma in Polish Olympic Athletes (A²POLO) project within GA²LEN initiative. *Clin Respir J* 2016;10:231-238

IF 2.356 MNiSW 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu jej koncepcji, opracowaniu zebranych danych kwestionariuszowych, analizie statystycznej i interpretacji wyników oraz na przygotowaniu manuskryptu. Udział mój szacuję na 65%.

Publikacja 2

Kurowski M, Hołodrowicz M, Kowalski ML. Objawy astmy i alergii wśród młodzieży uprawiającej wyczynowo pływanie i zapasy. *Alergia Astma Immunologia* 2014; 19 (3): 165-169

MNiSW 6

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na rekrutacji sportowców, przeprowadzaniu i analizie badań kwestionariuszowych, ocenie klinicznej, interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu manuskryptu. Wkład swój oceniam na 70%.

Publikacja 3

Kurowski M, Jurczyk J, Jarzębska M, Moskwa S, Makowska JS, Krysztofiak H, Kowalski ML. Association of serum Clara cell protein CC16 with respiratory infections and immune response to respiratory pathogens in elite athletes. *Respir Res* 2014 Apr 15;15:45. doi: 10.1186/1465-9921-15-45

IF 3.093 MNiSW 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badania, analizie statystycznej i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział szacuję na 65%.

Publikacja 4

Kurowski M, Jurczyk J, Moskwa S, Jarzębska M, Krysztofiak H, Kowalski ML. Winter ambient training conditions are associated with increased bronchial hyperreactivity and with shifts in serum innate immunity proteins in young competitive speed skaters. *Arch Med Sci* doi: 10.5114/aoms.2017.69438

IF 1.969 MNiSW 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu koncepcji badania, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w pracy, rekrutacji i badaniu pacjentów, statystycznej analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 65%.

Publikacja 5

Kurowski M, Jurczyk J, Olszewska-Ziąber A, Jarzębska M, Krysztofiak H, Kowalski ML. A similar pro/anti-inflammatory cytokine balance is present in the airways of competitive athletes and non-exercising asthmatics. *Adv Med Sci* 2017 Aug 16;63(1):79-86. doi: 10.1016/j.advms.2017.07.004. [Epub ahead of print]

IF 1.364 MNiSW 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współopracowaniu jej koncepcji, kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w pracy, rekrutacji i badaniu pacjentów, udziale w opracowaniu metodyki pobierania popłuczyn nosowych, statystycznej analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu. Swój udział oceniam na 70%.

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

4.3.1 Wprowadzenie

W ciągu ostatnich lat obserwuje się znaczący wzrost częstości chorób alergicznych i astmy, szczególnie w krajach rozwiniętych. Jednocześnie, wskutek przemian społecznych i związanych z nimi zmian stylu życia wzrasta liczba osób uprawiających sport zarówno amatorsko, jak i wyczynowo.

Wysiłek fizyczny jest jednym z bodźców mogących wywoływać lub nasilać objawy chorób alergicznych. Jednocześnie powysiłkowy skurcz oskrzeli bądź indukowane wysiłkiem objawy nieżyty nosa mogą występować u sportowców bez współistniejącej alergii lub astmy. Objawy takie mogą istotnie wpływać na wyniki sportowe a grupą szczególnie dotkniętą negatywnymi konsekwencjami ich występowania są sportowcy wyczynowi. W badaniach kwestionariuszowych astmę oskrzelową stwierdzano u znacznego, sięgającego nawet 50%, odsetka uprawiających niektóre dyscypliny sportowe, zarówno letnie (kolarstwo, kolarstwo górskie, pływanie, biegi długodystansowe), jak i zimowe (narciarstwo biegowe, łyżwiarstwo szybkie, kombinacja norweska). Jednocześnie przypuszcza się, że istnieje zjawisko niedorozpoznawalności (*underdiagnosis*) astmy i alergii wśród sportowców wyczynowych a objawy ze strony układu oddechowego są mylnie interpretowane i przypisywane zmęczeniu bądź infekcjom.

Mechanizmy związane z częstszym występowaniem astmy i powysiłkowego skurczu oskrzeli u sportowców nie zostały jeszcze do końca poznane. Zasadniczą rolę w rozwoju zapalenia błony śluzowej oskrzeli i nadreaktywności oskrzeli leżących u podłoża astmy wysiłkowej przypisuje się zwiększonej hiperwentylacji oraz obecności dodatkowych czynników w powietrzu wdychanym. Znaczenie czynników takich, jak kontakt z chloraminą u pływaków jest dobrze udokumentowane, ale niewiele wiadomo na temat innych czynników, np. warunków atmosferycznych związanych ze środowiskiem uprawiania sportu. Zwraca się także uwagę na rolę nieswoistych mechanizmów odporności choć brak jest badań w zróżnicowanych grupach sportowców. Niepełne wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój astmy indukowanej wysiłkiem ogranicza jej skuteczną prewencję.

W odniesieniu do objawów oddechowych występujących w związku z wysiłkiem fizycznym używa się najczęściej dwóch określeń:

1. Skurcz oskrzeli indukowany wysiłkiem (*exercise-induced bronchoconstriction* – EIB)
2. Astma indukowana wysiłkiem (*exercise-induced asthma* – EIA)

Obydwa terminy często używane były wymiennie. Aktualnie zaleca się aby skurczem oskrzeli indukowanym wysiłkiem (EIB) określać objawy występujące po wysiłku fizycznym u osób bez współistniejącej astmy i alergii. Pojęcie astmy indukowanej wysiłkiem (EIA)

powinno natomiast być zarezerwowane do objawów skurczu oskrzeli występujących po wysiłku fizycznym u chorych na astmę.

Opublikowano wiele badań nad częstością występowania objawów astmy lub powysiłkowego skurczu oskrzeli u sportowców wyczynowych. U ponad 11% spośród reprezentantów USA na olimpiadzie w Los Angeles (1984) stwierdzono objawy astmy indukowanej wysiłkiem. Wyniki badań przeprowadzonych przy okazji letnich Igrzysk Olimpijskich w Atlancie potwierdziły wcześniejsze obserwacje. Natomiast wśród reprezentantów USA na Zimowych Igrzyskach Olimpijskich w Nagano (1998) aż 22% sportowców miało wcześniej postawione rozpoznanie astmy, a ponad 18% stosowało w przeszłości leki przeciwastmatyczne.

Osobną grupę sportowców – w kontekście ryzyka rozwoju objawów astmy powysiłkowej – stanowią pływacy. Uprawianie pływania zalecane jest chorym na astmę jako działanie prowadzące do poprawy czynności układu oddechowego. Jednocześnie regularne pływanie zwiększać może prawdopodobieństwo wystąpienia astmy. Przebywanie w wilgotnym i ciepłym środowisku dominującym na krytych pływalniach teoretycznie zapobiega wysuszeniu i ochłodzeniu śluzówki dróg oddechowych. Jednocześnie należy jednak brać pod uwagę możliwość wystąpienia duszności po ekspozycji na związki chloru bądź na obecne w wilgotnym środowisku pływalni roztocze i zarodniki grzybów pleśniowych. Spośród sportów zimowych łyżwiarstwo szybkie jest dyscypliną związaną z częstym występowaniem takich objawów, jak kaszel czy duszność. Ich wystąpienie przypisuje się ekspozycji dróg oddechowych na chemiczne związki drażniące uwalniane z tafli lodowej.

Intensywny wysiłek fizyczny prowadzi do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej, a tym samym zwiększonej podatności na infekcje. U osób uprawiających intensywny wysiłek fizyczny opisywano zmiany parametrów układu odpornościowego dotyczące większości elementów odpowiedzi immunologicznej. Pojedynczy epizod intensywnego treningu wiąże się ze wzrostem wydzielania białek ostrej fazy oraz cytokin o działaniu prozapalnym (TNF- α , IL-1 β , MIP-1 α). Zaobserwowano także, wtórny w stosunku do tego zjawiska, wzrost surowiczych stężeń cytokin o działaniu przeciwzapalnym, np. IL-10, IL-1ra. Podczas intensywnego wysiłku obserwuje się także znaczne zwiększenie osoczowego stężenia IL-6. Następstwem hiperwentylacji towarzyszącej intensywnemu wysiłkowi jest naprzemienne ogrzewanie i ochładzanie dróg oddechowych. Zjawiska te prowadzą do dehydratacji komórek nabłonka oddechowego, następnie do stresu hiperosmolarnego, którego efektem jest wzmożone wydzielanie chemokin takich, jak RANTES i IL-8, powodujących nasiloną migrację leukocytów do dróg oddechowych. Intensywny wysiłek fizyczny powoduje także przesunięcie równowagi Th1/Th2 na korzyść limfocytów Th2 wynikające ze zmniejszenia odsetka limfocytów Th1. Zaburzenie równowagi Th1/Th2 u osób uprawiających sport wyczynowy odgrywa istotną rolę w zwiększeniu podatności na infekcje dróg oddechowych. Uwalniane podczas wysiłku kortyzol i adrenalina zmniejszają natężenie odpowiedzi Th1-zależnej. Z kolei wydzielana przez kurczące się włókna mięśniowe IL-6 bezpośrednio stymuluje odpowiedź związaną z limfocytami Th2. Działanie IL-6 w kierunku zmniejszenia odpowiedzi Th1 i zwiększenia Th2 prowadzi prawdopodobnie – u osób poddawanych

intensywnemu treningowi - do zmniejszenia skuteczności mechanizmów ochrony przeciwwirusowej.

W licznych badaniach klinicznych i epidemiologicznych zaobserwowano zwiększoną częstość infekcji układu oddechowego u sportowców wyczynowych. Związek natężenia wysiłku z podatnością na infekcje układu oddechowego obrazuje tzw. model „krzywej J” (J-shaped curve model). Zakłada on, że o ile umiarkowana aktywność fizyczna zmniejsza podatność na infekcje układu oddechowego, to długotrwały, powtarzalny wysiłek na poziomie wyczynowym wywołuje efekt wręcz przeciwny. Sportowcy wyczynowi zgłaszają częste występowanie objawów infekcji górnych lub dolnych dróg oddechowych, jednak infekcyjne tło dolegliwości zostaje potwierdzone w 30-45% przypadków. Uważa się, że - w niektórych przypadkach - występowanie objawów sugerujących infekcje, w których nie udaje się wykryć patogenu wirusowego bądź bakteryjnego, może być skutkiem aktywacji mechanizmów procesu zapalnego. Zjawisku temu towarzyszyć mogą zmiany stężeń białek odpowiedzi nieswoistej o właściwościach prozapalnych, przeciwzapalnych, a także immunomodulujących.

4.3.2 Cel prowadzonych badań

Głównym celem prowadzonych badań było zbadanie nie w pełni poznanych uwarunkowań związanych z występowaniem astmy u sportowców ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej.

Głównemu celowi przyporządkowane zostały następujące szczegółowe zadania badawcze:

- Ocena częstości występowania astmy i alergii wśród sportowców wyczynowych na podstawie badań kwestionariuszowych oraz badania klinicznego
- Poszukiwanie związku obecności infekcji układu oddechowego oraz stężeń białek immunomodulujących z występowaniem objawów astmy i alergii wśród sportowców
- Ocena wpływu warunków atmosferycznych oraz obciążenia wysiłkiem fizycznym na stężenie wybranych białek nieswoistej odpowiedzi immunologicznej
- Badanie zmian stężeń tych białek w kondensacie powietrza wydychanego (EBC) i wydzielinach nosowych pod wpływem prowokacji wysiłkiem fizycznym

4.3.3 Występowanie astmy i alergii wśród sportowców wyczynowych

Ocena częstości występowania objawów chorób alergicznych i astmy u sportowców wyczynowych oraz odniesienie wyników badań kwestionariuszowych do klinicznej oceny badanej populacji stanowią treść **publikacji nr 1 oraz publikacji nr 2**.

Badania stanowiące treść **publikacji nr 1** przeprowadzone zostały w ramach projektu GA²LEN (Global Allergy and Asthma European Network) będącego siecią doskonałości działającą pod auspicjami Unii Europejskiej. Ocena wzajemnych zależności sportu wyczynowego i astmy oraz chorób alergicznych stanowiła tematykę wiodącą jednego z

pakietów pracy (*workpackages*) w ramach tego projektu, a przeprowadzone w Polsce badanie nad występowaniem astmy i alergii wśród sportowców wyczynowych otrzymało akronim A²POLO (Allergy and Asthma in Polish Olympic Athletes). Cele tej pracy obejmowały:

- ocenę częstości występowania objawów astmy i chorób alergicznych u sportowców wyczynowych na podstawie danych uzyskanych z badań kwestionariuszowych
- weryfikację danych kwestionariuszowych poprzez badanie lekarskie, badania czynnościowe płuc oraz testy skórne

Badaniem objęto 222 sportowców (140 mężczyzn, 63.1%) tzw. „szerokiej kadry” reprezentacji Polski na Igrzyska Olimpijskie w Pekinie w 2008 roku. Ostatecznie 179 osób z tej grupy reprezentowało Polskę podczas Igrzysk. Mediana wieku badanych sportowców wynosiła 26 lat. Ocena sportowców w ramach opisywanego badania opierała się o:

- wywiad i badanie lekarskie
- kwestionariusz AQUA[®] (Allergy Questionnaire for Athletes)
- punktowe testy skórne (PTS) ze standardowym panelem alergenów wziewnych
- spirometrię z próbą odwracalności obturacji
- nieswoistą wziewną prowokację z metacholiną

W badaniu kwestionariuszowym 28.4% sportowców zgłaszało co najmniej jeden objaw astmy indukowanej wysiłkiem fizycznym (kaszel, uczucie braku tchu, ucisk w klatce piersiowej bądź świsty oddechowe). W odniesieniu do objawów astmy nie obserwowano istotnych różnic w częstości ich występowania między sportowcami uprawiającymi dyscypliny wytrzymałościowe (*endurance*) i niewytrzymałościowe (*non-endurance*). Ocena kliniczna pozwoliła na rozpoznanie astmy u 11.3%, czyli 25 badanych sportowców. Warto odnotowania jest fakt, że przed włączeniem do badania rozpoznanie astmy było postawione jedynie u 5.9% sportowców, a 8.6% sportowców deklaroowało w kwestionariuszu, że kiedykolwiek przyjmowali leki przeciwastmatyczne z grupy β 2-agonistów, glikokortykosteroidów bądź antagonistów receptora leukotrienowego.

Atopię definiowaną jako obecność dodatniego wyniku PTS z co najmniej jednym alergenem stwierdzono u 38.9% badanych. Alergeny, na które najczęściej uczuleni byli polscy sportowcy to: roztocze kurzu domowego (19.6%), pyłek bylicy (16.7%), pyłki traw (16.2%), pyłek brzozy (15.7%), olchy (13.7%) oraz leszczyny (12.7%). W świetle podnoszonej coraz częściej roli alergenów karalucha w patogenezie alergii układu oddechowego warto odnotować, że sensytyzację na te alergeny stwierdzono u 10.3% sportowców.

Spośród 25 sportowców, u których rozpoznano astmę, jedynie u niewiele ponad jednej trzeciej (n=9; 36%) obserwowano dodatni wynik próby odwracalności obturacji oskrzeli. Ogółem dodatni wynik próby odwracalności zanotowano u 14 badanych sportowców. Co ciekawe, 22 spośród 25 sportowców z rozpoznaną astmą spełniało jedno z kryteriów dodatniej próby rozkurczowej, czyli 200 ml wzrost FEV1 w stosunku do wartości wyjściowej.

Objawy typowe dla alergicznego nieżytu nosa (ANN) były podawane przez 27% ankietowanych sportowców, choć tylko 9% miało postawione rozpoznanie ANN przed włączeniem do badania A²POLO. Ostatecznie, badanie lekarskie i badania dodatkowe pozwoliły na rozpoznanie ANN u 46 spośród 222, tj. u 21% badanych olimpijczyków.

Kwestionariusz AQUA (Allergy Questionnaire for Athletes) został opracowany w 2009 przez Boniniego i współpracowników jako potencjalne narzędzie badania przesiewowego sportowców wyczynowych w kierunku chorób alergicznych. Poszczególnym pytaniom przyporządkowane są wartości liczbowe. Autorzy ustalili wartość 5 lub więcej punktów jako pozwalającą na zidentyfikowanie chorych na alergię sportowców z 97.1% swoistością przy czułości 58.1%. W badanej populacji polskich olimpijczyków u 43.8% (n=96) uzyskano 5 lub więcej punktów w kwestionariuszu AQUA. Wśród tych sportowców ponad połowa (52.8%) nie miała uprzednio rozpoznanej żadnej choroby alergicznej. Wśród sportowców z rozpoznaniem ANN wartość punktacji AQUA ≥ 5 obserwowano u 77.4%, a wśród sportowców z astmą u 74.1%. Średnia wartość punktowa AQUA była istotnie wyższa u sportowców atopowych w porównaniu ze sportowcami nieatopowymi (9.49 ± 0.93 vs 4.27 ± 0.50 ; $P = 0.00001$; $\text{średnia} \pm \text{SEM}$).

W omawianej pracy wykazano, że u sportowców wyczynowych częstość występowania objawów typowych dla astmy i alergii układu oddechowego znacznie przewyższa częstość rozpoznań tych schorzeń. Niedodiagnozowanie astmy i alergii u uprawiających sport wyczynowo może wpływać na osiągnięte wyniki oraz znacząco upośledzać jakość życia sportowców. Wyniki badania A²POLO wskazują na konieczność edukacji sportowców, kadry trenerskiej, jak również sportowego personelu medycznego, w zakresie astmy i chorób alergicznych.

Celem badań zawartych w publikacji nr 2 było określenie częstości występowania klinicznych i immunologicznych wykładników astmy i alergii w wybranych grupach młodzieży uprawiającej sport wyczynowo. Badaniem objęto 48 pływaków oraz 20 zapaśników w wieku 11-18 lat. Ocena kliniczna badanych obejmowała: badanie lekarskie, wypełnienie kwestionariusza AQUA, punktowe testy skórne z podstawowym panelem alergenów wziewnych oraz spirometrię spoczynkową i próbę rozkurczową. Ponadto, u 14 pływaków przeprowadzono nieswoistą wziewną próbę prowokacyjną z metacholiną. Cechy atopii, definiowanej jako dodatni punktowy test skórny z co najmniej 1 alergenem stwierdzono u 31,25% pływaków oraz 55% zapaśników. W grupie pływaków objawy ze strony nosa występowały u 18,75%, objawy ze strony oczu u 10,4%, kaszel u 6,25% a duszność u 4,2% badanych. Wśród zapaśników objawy ze strony nosa występowały u 15%, kaszel u 5%, a duszność u 20% sportowców. Wartości spoczynkowe FEV1 nie różniły się istotnie między badanymi grupami. Próba rozkurczowa była dodatnia u 18,75% pływaków i 5% zapaśników. Mimo to, różnica częstości występowania dodatniego wyniku próby odwracalności obturacji między badanymi grupami nie była statystycznie istotna. Nieswoistą wziewną próbę prowokacyjną z metacholiną przeprowadzono – ze względów organizacyjnych – jedynie u 14 losowo wybranych pływaków. U 9 z nich (tj. u 64,3 %) próba była dodatnia. Mediana PC20

metacholiny wynosiła 3,156 mg/ml (odstęp międzykwartylowy: 2,12-3,815), a mediana PD20 – 0,614 mg (0,344-1,152). Spośród 9 pływaków z dodatnią próbą prowokacyjną z metacholiną jedynie u 3 (33,3%) odnotowano dodatni wynik próby odwracalności obturacji.

Podsumowując, w grupie młodzieży uprawiającej wyczynowo pływanie bądź zapasy wykazano, że intensywny, regularny wysiłek fizyczny – zwłaszcza wykonywany w niekorzystnych warunkach środowiskowych – może mieć negatywny wpływ na drogi oddechowe i prowadzić do rozwoju nieswoistej nadreaktywności oskrzeli będącej wykładnikiem przewlekłego stanu zapalnego. Uwagę zwraca również brak związku dodatnich wyników próby odwracalności obturacji, jak również nieswoistej wziewnej próby prowokacyjnej z obecnością deklarowanych objawów typowych dla astmy i alergii dróg oddechowych. Rozbieżności te mogą być interpretowane na kilka sposobów:

- Objawy astmy i powysiłkowego skurczu oskrzeli bardzo często są mylnie interpretowane przez sportowców i uważane za normalne objawy związane ze zmęczeniem spowodowanym intensywnym treningiem
- Intensywny wysiłek sportowy na poziomie wyczynowym może zwiększać prawdopodobieństwo rozwoju przewlekłych zmian zapalnych w drogach oddechowych, których jedynym klinicznym wykładnikiem może być nadreaktywność dróg oddechowych na bodźce nieswoiste

Każda z powyżej przedstawionych interpretacji znajduje potwierdzenie w opublikowanym dotychczas piśmiennictwie. Ponadto, prawdopodobieństwo rozwoju nadreaktywności dróg oddechowych wzrasta wraz z długością wyczynowego uprawiania sportu. Istotną rolę odgrywa także ekspozycja na niekorzystne czynniki środowiskowe, np. związki chloru bądź zimne, suche powietrze.

Przedstawione dane potwierdzają także, że próba odwracalności obturacji oskrzeli oraz wziewna próba prowokacyjna z metacholiną mają ograniczoną wartość diagnostyczną w odniesieniu do astmy indukowanej wysiłkiem.

4.3.4 Białko CC16 a objawy astmy i alergii oraz infekcje układu oddechowego u sportowców wyczynowych

Ocenę stężeń białka CC16 w surowicy krwi sportowców wyczynowych, jak również poszukiwanie związku stężeń CC16 z obecnością objawów astmy i alergii, infekcji układu oddechowego oraz z wykładnikami swoistej humoralnej odpowiedzi na infekcję wybranymi patogenami oddechowymi stanowiły temat **publikacji nr 3** wchodzącej w skład niniejszego osiągnięcia naukowego. Białko komórek Clary (CC16) posiada właściwości immunomodulujące i przeciwzapalne. Pomiar jego stężenia w surowicy może służyć także do oceny uszkodzenia nabłonka oddechowego. Badanie przeprowadzono w grupie 203 polskich sportowców reprezentujących poziom olimpijski. Grupy kontrolne obejmowały 49 chorych na astmę łagodną oraz 53 zdrowych ochotników. W oparciu o dane z kwestionariusza AQUA zidentyfikowano 39 sportowców (19.2%), u których występowały częste infekcje układu

oddechowego. Między sportowcami atopowymi a nieatopowymi nie obserwowano istotnych różnic w odniesieniu do częstości infekcji oraz do surowiczego stężenia CC16. U sportowców z częstymi infekcjami oddechowymi obserwowano istotnie niższe surowicze stężenie białka CC16 w porównaniu ze sportowcami nie deklarującymi występowania częstych infekcji w kwestionariuszu (mediana 5.57 vs 7.03 ng/ml; $p = 0.01$, test U Manna-Whitneya). Analiza z wykorzystaniem regresji logistycznej po przyjęciu zmiennej niezależnej „CC16 \leq 4.99 ng/ml” wykazała, że ryzyko częstych infekcji układu oddechowego było istotnie większe u sportowców z niskim (definiowanym jako niższe bądź równe 4.99 ng/ml) surowiczym stężeniem CC16 (OR = 2.56; 95%CI:1.19-5.50; $p < 0.02$). U sportowców wyczynowych obserwowano także niezbyt silne dodatnie korelacje surowiczego stężenia CC16 ze stężeniami przeciwciał przeciw wybranym patogenom wywołującym infekcje układu oddechowego:

- anty-PIV1,2,3 IgG ($R=0.2$, $p<0.01$) – w całej grupie sportowców
- anty-RSV IgG ($R=0.29$, $p=0.009$) – u sportowców atopowych
- anty-PIV 1,2,3 IgG ($R=0.31$, $p=0.01$) – u sportowców atopowych
- anty-AdV IgG ($R=0.27$, $p=0.02$) – u sportowców atopowych

Ponadto, u uprawiających sport wyczynowo istotnie rzadziej obserwowano dodatnie wyniki badań serologicznych wykrywających IgG przeciw PIV1,2,3, RSV oraz *M. pneumoniae*.

Zebrane w tej publikacji wyniki są interesujące ze względu na wielowymiarową rolę przypisywaną białku CC16 w patologjach układu oddechowego. Z jednej strony CC16 jest jednym z markerów integralności bariery nabłonkowej, z drugiej natomiast – aktywnie uczestniczy w procesach immunomodulacji i regulacji zapalenia. Udział i znaczenie białka CC16 w tych zjawiskach wciąż jest przedmiotem dyskusji. Uzyskane dane wskazują, że zmniejszone stężenie CC16 posiadającego właściwości przeciwzapalne może przyczyniać się do zwiększonej podatności na infekcje układu oddechowego u osób uprawiających regularnie wysiłek fizyczny na poziomie wyczynowym. Pośrednio na immunomodulujące właściwości CC16 wskazują także dodatnie korelacje surowiczego stężenia tego białka oraz przeciwciał klasy IgG swoistych dla wybranych patogenów powodujących infekcje układu oddechowego. Fakt, że istotne dodatnie korelacje obserwowano przede wszystkim u sportowców atopowych, sugeruje – w kontekście nieświerdzenia różnic między stężeniami CC16 u sportowców atopowych i nieatopowych – możliwą rolę atopii jako czynnika modyfikującego *per se* odpowiedź immunologiczną na wirusowe patogeny oddechowe.

4.3.5 Wpływ warunków atmosferycznych oraz obciążenia wysiłkiem fizycznym na stężenie wybranych parametrów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej

Badania prowadzone u sportowców uprawiających zarówno zimowe, jak i letnie dyscypliny wytrzymałościowe w niekorzystnych warunkach atmosferycznych wykazały istotny wpływ epizodu ostrego, intensywnego wysiłku na powstanie stanu zapalnego w drogach oddechowych. Mniej uwagi poświęcano dotychczas wpływowi wysiłku powtarzanego regularnie w dłuższym okresie czasu na zapalenie dróg oddechowych oraz na

nieswoistą odpowiedź immunologiczną. Ponadto, jak wspomniano we wstępie, u sportowców w wielu przypadkach epizodów rozpoznawanych jako infekcje dróg oddechowych nie udaje się zidentyfikować patogenu odpowiedzialnego za ich powstanie, co pozwala domniemywać, że część tych epizodów wynika z zaostrzenia stanu zapalnego dróg oddechowych i nie ma związku z zakażeniem. Przytoczone powyżej fakty stały się inspiracją do przeprowadzenia badań oceniających wpływ wysiłku fizycznego na wybrane parametry nieswoistej odpowiedzi immunologicznej u sportowców wyczynowych, z uwzględnieniem możliwego wpływu warunków atmosferycznych. Oceniano następujące parametry odpowiedzi nieswoistej:

- cytokiny o silnym działaniu prozapalnym: TNF- α , interleukina (IL-)6, IL-1 β
- IL-10 i IL-1ra (antagonistę receptora interleukiny 1) jako związki o działaniu przeciwzapalnym, w odniesieniu do których zaobserwowano zmniejszenie stężeń osoczowych w związku z wysiłkiem fizycznym u osób predysponowanych do częstych infekcji dróg oddechowych.
- Rozpuszczalną formę receptora bakteryjnego lipopolisacharydu (sCD14) jako markera aktywacji monocytów.
- Zewnątrzkomórkowe białko szoku cieplnego (HSPA1, HSP-70) uważane za „sygnał niebezpieczeństwa” (danger signal) dla mechanizmów odporności nieswoistej.

Wyniki tych badań zostały zawarte w **publikacji nr 4** wchodzącej w skład niniejszego osiągnięcia naukowego. Grupę badaną stanowili łyżwiarze szybcy (n=36, mediana wieku 15 lat) uprawiający tę dyscyplinę od co najmniej 3 kolejnych sezonów. Czworo sportowców miało wcześniej rozpoznaną astmę, alergiczny nieżyt nosa bądź alergię pokarmową. Grupę kontrolną (n=22) stanowili niepalący studenci medycyny bez rozpoznanej astmy bądź alergii. W celu oceny wpływu warunków atmosferycznych na parametry odpowiedzi nieswoistej oraz nadreaktywność dróg oddechowych sportowcy badani byli dwukrotnie:

- 1) Podczas zimowego sezonu treningowego (WTP, winter training period) – w tym okresie sportowcy trenowali intensywnie w często niekorzystnych warunkach otoczenia (odkryty tor do jazdy szybkiej na lodzie) oraz często uczestniczyli w zawodach.
- 2) Podczas letniego sezonu treningowego (STP, summer training period) – w tym okresie regularny trening obejmował głównie jazdę na rolkach, również na odkrytym torze.

Warto zaznaczyć, że – mimo odmiennej charakterystyki i warunków – całkowite obciążenie wysiłkiem fizycznym mierzone kwestionariuszem IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) nie różniło się istotnie między wymienionymi powyżej okresami treningowymi.

Prawie 80% łyżwiarzy szybkich podawało w kwestionariuszu występowanie objawów powysiłkowego skurczu oskrzeli (EIB). Najczęściej występowały kaszel i ucisk w klatce piersiowej (77.8%), duszność (55.6%) oraz świszczący oddech (48.1%). U przeważającej

większości sportowców (88.9%) objawy te pojawiały się nieregularnie, zazwyczaj w ciągu pierwszych 10 minut po zakończeniu wysiłku i ustępowały w ciągu 30 minut.

Nadreaktywność dróg oddechowych na bodźce nieswoiste oceniono w obu okresach treningowych metodą wziewnej próby prowokacyjnej z metacholiną u 21 sportowców. W okresie zimowym dodatni wynik uzyskano u 42.9%, a w okresie letnim u 19.1% sportowców; u 4 sportowców prowokacja z metacholiną była dodatnia zarówno podczas WTP, jak i STP.

U sportowców w czasie letniego sezonu treningowego średnie surowicze stężenia IL-1ra i HSPA1 były istotnie niższe w porównaniu z sezonem zimowym, jak również w porównaniu z grupą kontrolną. W odniesieniu do IL-1ra opisane sezonowe zmienności stężeń w surowicy ograniczone były do sportowców, u których nie występowały częste infekcje dróg oddechowych.

Podczas zimowego sezonu treningowego (WTP) obserwowano istotne korelacje między surowiczym stężeniem IL-1ra a temperaturą powietrza atmosferycznego, zarówno w dniu badania jak i ze średnią temperaturą w okresie poprzedzających 7 oraz 28 dni. W tym samym okresie zanotowano także istotne dodatnie korelacje stężenia IL-1ra w surowicy z wilgotnością względną powietrza oraz z obciążeniem wysiłkiem mierzonym kwestionariuszem IPAQ.

Wyniki przedstawione w omawianej publikacji potwierdzają, że regularne uprawianie intensywnego wysiłku fizycznego w niekorzystnych warunkach otoczenia sprzyja powstawaniu stanu zapalnego dróg oddechowych. Świadczy o tym wysoka częstość dodatnich wyników nieswoistych wziewnych prób prowokacyjnych z metacholiną w zimowym okresie treningowym.

Ponadto, przeprowadzone badania dostarczyły nowych informacji na temat roli parametrów atmosferycznych w rozwoju procesu zapalnego związanego z wysiłkiem. Surowiczy poziom IL-1ra odzwierciedla przewlekłą, długotrwałą ekspozycję na niską temperaturę otoczenia podczas jazdy szybkiej na lodzie. IL-1ra pojawia się jako czynnik przeciwzapalny, w odpowiedzi na rozwój zapalenia stymulowany zarówno wysiłkiem fizycznym, jak i niekorzystnymi warunkami otoczenia. Ze względu na fakt, że stężenie IL-1ra wzrastało wraz ze spadkiem temperatury tylko w zimowym okresie treningowym, można przypuszczać, iż surowicze IL-1ra jest – przynajmniej w części – markerem zmian zapalnych indukowanych przez ekspozycję na zimne powietrze. Obciążenie wysiłkiem było podobne zimą i latem, tak więc niekorzystne warunki atmosferyczne, w których odbywa się trening, mogą przyczyniać się do rozwoju zapalenia niezależnie od natężenia wykonywanego wysiłku. Wpływ wysiłku fizycznego na stymulację syntezy IL-1ra niezależny jest z kolei od warunków treningowych i w badanej grupie obserwowany był zarówno w okresie letnim, jak i zimowym, co dodatkowo potwierdza oddzielny i wyjątkowy wpływ czynników atmosferycznych na rozwój zapalenia u osób intensywnie trenujących.

W badanej grupie sportowców obserwowano zwiększone stężenia IL-1ra u osób negujących występowanie częstych infekcji układu oddechowego. Potwierdza to

przeciwpalne działanie IL-1ra w kontekście możliwego dobroczynnego wpływu wysiłku fizycznego na stan odporności oraz na podatność na infekcje dróg oddechowych.

Białko szoku cieplnego HSPA1 stanowi sygnał niebezpieczeństwa (*danger signal*) aktywujący mechanizmy odpowiedzi nieswoistej (komórki NK, monocyty). Opisano jego wydzielanie pod wpływem ostrych bodźców stresowych, m.in. wysiłku fizycznego. Prezentowane badania dowodzą, że nie tylko ostry, lecz także powtarzalny, przewlekły wysiłek fizyczny może indukować syntezę białek szoku cieplnego i tym samym dodatkowo stymulować odpowiedź immunologiczną. W badanej grupie szczególnie widoczne jest to podczas zimowego sezonu treningowego.

Podwyższone stężenia sCD14 bez względu na sezon treningowy odzwierciedlają przewlekłą stymulację procesu zapalnego związaną z intensywnym wysiłkiem fizycznym. Nie obserwowano związku sCD14 z deklarowaną podatnością na infekcje oddechowe, co jest zjawiskiem odmiennym niż opisywane przez innych autorów, którzy wiązali zwiększone stężenie sCD14 ze wzrostem podatności na infekcje wskutek modyfikacji odpowiedzi na bakteryjny lipopolisacharyd. Zmiany sCD14 towarzyszące intensywnemu wysiłkowi fizycznemu wymagają zatem dalszych badań.

4.3.6 Wpływ wysiłku fizycznego na stężenia cytokin pro- i przeciwzapalnych oraz wybranych białek odpowiedzi nieswoistej w górnych i dolnych drogach oddechowych

Wpływ wysiłku fizycznego na obecność wybranych cytokin i białek odpowiedzi nieswoistej w drogach oddechowych był przedmiotem badań opisanych w **publikacji nr 5**. Oceniano stężenia TNF- α , IL-1ra, IL-10, HSPA1 oraz sCD14 w kondensacie powietrza wydychanego (EBC) oraz popłuczynach nosowych. Badano zmiany stężeń wymienionych białek pod wpływem narażenia zarówno na ostry, krótkotrwały, jak i przewlekły intensywny wysiłek fizyczny. Badania prowadzono w trzech grupach: u sportowców wyczynowych (pływaków i łyżwiarzy szybkich), u chorych na astmę nie wykonujących regularnie wysiłku sportowego oraz u osób zdrowych, również niećwiczących regularnie. Materiał do badania pobierano przed i po prowokacji wysiłkiem fizycznym na bieżni w dwóch punktach czasowych w okresach zwiększonej i zmniejszonej aktywności treningowej, odpowiednich dla każdej z dyscyplin.

Wyniki badań zawartych w omawianej publikacji pokazują, że w dolnych drogach oddechowych zależności i proporcje między stężeniami prozapalnego TNF- α i przeciwzapalnej cytokiny IL-1ra są podobne u sportowców wyczynowych i u chorych na astmę, natomiast różnią się istotnie od stężeń obserwowanych u osób zdrowych nie uprawiających regularnego wysiłku fizycznego.

Spoczynkowe stężenia EBC TNF- α u sportowców w obu okresach treningowych i chorych na astmę były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Warto podkreślić, że tylko jeden z badanych sportowców miał rozpoznaną astmę, natomiast 2/3 z nich odczuwało dyskomfort oddechowy związany z wysiłkiem fizycznym. Może to oznaczać, że w drogach oddechowych u sportowców obecny jest proces zapalny o podobnym natężeniu jak ten występujący u

chorych na astmę. Badani sportowcy uprawiali dyscypliny uważane za sprzyjające rozwojowi zapalenia w drogach oddechowych, można więc założyć, że obserwowany proces zapalny jest niekorzystnym skutkiem regularnie powtarzanego intensywnego wysiłku fizycznego. Na korzyść takiej interpretacji przedstawionych wyników przemawia fakt, że znaczący odsetek sportowców odczuwało objawy sugerujące astmę indukowaną wysiłkiem, mimo braku takiego rozpoznania w wywiadzie.

Spoczynkowe stężenia IL-1ra – cytokiny o działaniu przeciwzapalnym – w EBC sportowców wyczynowych oraz chorych na astmę były istotnie niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te dodatkowo przemawiają na korzyść przedstawionej powyżej hipotezy zakładającej indukcję stanu zapalnego w drogach oddechowych przez regularny wysiłek fizyczny o dużej intensywności.

W odniesieniu do stężeń TNF- α w wydzielinach nosowych nie obserwowano różnic między badanymi grupami. W przypadku IL-1ra obserwowano istotnie wyższe stężenia u sportowców oraz chorych na astmę w porównaniu z grupą kontrolną. Inni autorzy (Benson et al. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; De Kluijver et al. *Clin Exp Allergy* 2003) obserwowali zmniejszone stężenia IL-1ra w popłuczynach nosowych u chorych na astmę. Ze względu na nowatorski charakter badań cytokin w NLF w kontekście stymulacji wysiłkiem fizycznym, trudno jest odnieść przedstawione wyniki do wcześniejszych obserwacji. W badanych przez nas populacjach sportowców i chorych na astmę zwiększone stężenie IL-1ra w wydzielinach nosowych prawdopodobnie odzwierciedla miejscową odpowiedź przeciwzapalną.

Wysiłek fizyczny wykonywany podczas próby prowokacji na bieżni nie wywoływał istotnych zmian w stężeniach TNF- α ani IL-1ra w EBC i wydzielinach nosowych w żadnej z badanych grup. Zwraca jednak uwagę znaczna niekiedy wewnątrzgrupowa zmienność wpływu wysiłku na zmianę stężenia cytokin – obserwowano zarówno kilku- kilkunastokrotny wzrost, jak i spadek stężenia poszczególnych białek pod wpływem prowokacji wysiłkiem fizycznym. Najmniejszą zmiennością międzypersonalną w omawianym kontekście obserwowano w odniesieniu do stężeń TNF- α w EBC, niezależnie od badanej grupy.

Obserwowano istotne statystycznie dodatnie korelacje spoczynkowego stężenia TNF- α w EBC i procentowego spadku FEV1 podczas próby prowokacji wysiłkiem fizycznym w grupie sportowców ($R=0.74$, $p<0.01$) oraz u chorych na astmę ($R=0.64$, $p<0.05$). Wskazuje to, że stężenia TNF- α w EBC odzwierciedlają toczący się miejscowo proces zapalny związany z nadreaktywnością dróg oddechowych. Ze zjawiskiem tym mamy do czynienia zarówno u chorych na astmę, jak i u uprawiających regularnie intensywny wysiłek fizyczny, szczególnie w niekorzystnych warunkach otoczenia. Jak wspomniano wyżej, stężenia TNF- α w EBC w niewielkim stopniu podlegają modyfikacji pod wpływem wysiłku fizycznego. Obserwacja ta również potwierdza, że TNF- α jest stabilnym, lokalnym markerem procesu zapalnego dolnych dróg oddechowych.

W omawianej pracy wykazano po raz pierwszy obecność HSPA1 i sCD14 w EBC oraz obecność HSPA1 w wydzielinach nosowych, a także potwierdzono obecność sCD14 w wydzielinach nosowych. W odniesieniu do stężeń HSPA1, sCD14 oraz IL-10 w EBC i wydzielinach nosowych nie zaobserwowano różnic ani zależności między grupami. Analiza i

porównanie stężeń HSPA1 i sCD14 w dolnych drogach oddechowych w poszczególnych grupach wskazuje, że obecność tych białek w EBC nie ma związku z ostrym bądź przewlekłym stanem zapalnym. Nie obserwowano wpływu przewlekłego zapalenia ani stymulacji wysiłkiem na stężenie białka HSPA1 w górnych drogach oddechowych.

Najistotniejszy wniosek wynikający z wyników zawartych w omawianej publikacji dotyczy podobnego charakteru zaburzeń równowagi między prozapalnym TNF- α a przeciwzapalnym IL-1ra w dolnych drogach oddechowych zarówno u chorych na astmę, jak i u sportowców wyczynowych. Praca zawiera także nowe dane dotyczące miejscowej obecności wybranych białek odpowiedzi nieswoistej w górnych i dolnych drogach oddechowych oraz wpływu wysiłku fizycznego na ich stężenia.

4.3.7 Podsumowanie

W publikacjach będących podstawą do sformułowania wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego przedstawiłem wyniki badań nad zjawiskami związanymi z występowaniem objawów astmy i alergii u sportowców wyczynowych, jak również z wpływem wysiłku fizycznego na proces zapalny w drogach oddechowych. Wyniki te pozwoliły mi na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) Rzeczywista częstość występowania objawów astmy i alergii u sportowców wyczynowych znacznie przewyższa częstość rozpoznań tych chorób. Wykazane niedodiagnozowanie astmy i alergii w tej populacji może wpływać na osiągnięte wyniki sportowe oraz znacząco upośledzać jakość życia.
- 2) W populacji sportowców wyczynowych osoby, które częściej zapadają na infekcje układu oddechowego mają zmniejszone surowicze stężenie immunomodulacyjnego białka CC16.
- 3) Obecność cech atopii jest czynnikiem modyfikującym odpowiedź immunologiczną na wirusowe patogeny oddechowe.
- 4) Surowicze stężenie antagonisty receptora interleukiny 1 (IL-1ra) – cytokiny o działaniu przeciwzapalnym - jest potencjalnym, pośrednim wskaźnikiem zapalenia rozwijającego się wskutek przewlekłej, długotrwałej ekspozycji na niekorzystne warunki atmosferyczne podczas treningu sportowego.
- 5) Niekorzystne warunki atmosferyczne, w których odbywa się trening sportowy, przyczyniają się do rozwoju zapalenia niezależnie od natężenia wykonywanego wysiłku.
- 6) U sportowców wyczynowych rzadziej zapadających na infekcje układu oddechowego protekcyjne działanie wysiłku fizycznego w tym zakresie może być związane z modyfikacją wydzielania IL-1ra.
- 7) W dolnych drogach oddechowych u sportowców toczy się przewlekły proces zapalny, którego wykładnikiem jest zwiększone stężenie prozapalnego TNF- α i zmniejszone stężenie przeciwzapalnego IL-1ra w kondensacie powietrza wydychanego. Zaburzenie równowagi stężeń cytokin pro- i przeciwzapalnych w dolnych drogach oddechowych

u sportowców jest podobne do dysproporcji obserwowanych u chorych na astmę, natomiast różni się istotnie od obserwowanych u osób zdrowych nie uprawiających regularnego wysiłku fizycznego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

5.1 Tematyka badań przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych

Szeroko pojętą tematyką alergologii i immunologii klinicznej zainteresowałem się na III roku studiów medycznych. W latach 1996-1999 miałem indywidualny tok studiów w Klinice Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Łodzi, a moim opiekunem naukowym był prof. dr hab. Piotr Kuna. Efektem studiów indywidualnych w wymienionej Klinice były 2 publikacje poglądowe dotyczące zespołu przewlekłego zmęczenia (1997) oraz szczepionek DNA i ich potencjalnego wykorzystania w immunoterapii chorób alergicznych (1999). Po uzyskaniu dyplomu lekarza rozpocząłem studia doktoranckie w Klinice Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Łodzi. W roku 2004 obroniłem pracę doktorską pt. „Farmakoprofilaktyka objawów sezonowego alergicznego nieżytu nosa z zastosowaniem leku antyleukotrienowego i wybranych leków przeciwhistaminowych”, której promotorem był prof. dr hab. Paweł Górski. Główny wniosek wypływający z mojej pracy doktorskiej dotyczył wysokiej skuteczności połączenia montelukastu i cetyryzyny (w porównaniu z placebo oraz z każdym leków zastosowanych osobno) w 6-tygodniowej przedsezonowej farmakoprofilaktyce objawów sezonowego alergicznego nieżytu nosa u chorych uczulonych na alergeny pyłku traw. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane jako artykuł oryginalny w „Allergy” (2004; 59: 280-8).

W okresie XII 2002 – XI 2003 przebywałem na stypendium European Respiratory Society (ERS) w laboratorium kierowanym przez prof. prof. Iana M. Adcocka i Petera Barnesa w Imperial College w Londynie. Pobyt ten pozwolił mi nauczyć się technik hodowli komórkowych oraz metod biologii molekularnej. Umiejętności te wykorzystałem w późniejszej działalności naukowej.

5.2 Tematyka badań po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych

Rozprawę doktorską obroniłem w październiku 2004 roku, a 1 listopada zacząłem pracę w Klinice Immunologii, Reumatologii i Alergii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, początkowo na stanowisku asystenta, następnie – od grudnia 2008 roku – adiunkta. W początkowym okresie pracy zaangażowany byłem w rozwijanie działalności Pracowni Immunologii Molekularnej istniejącej w strukturach Kliniki. Plonem mojej aktywności naukowej w ramach wspomnianej pracowni był udział w powstaniu następujących publikacji:

- Kowalski ML, Borowiec M, **Kurowski M**, Pawliczak R. Alternative splicing of cyclooxygenase-1 gene: altered expression in leucocytes from patients with bronchial

asthma and association with aspirin-induced 15-HETE release. *Allergy* 2007; 62: 628-34. (IF 5.014 MNiSW 24)

Zjawisko alternatywnego składania (splicingu) komórkowego pre-mRNA pozwala na powstanie różnych mRNA z jednego genu i jest jednym z mechanizmów regulujących ekspresję oraz potencjalnie modyfikującym biologiczne właściwości białka kodowanego przez dany gen. Zjawisko to pisano także w odniesieniu do genu cyklooksygenazy 1 (*COX-1*) – enzymu odgrywającego istotną rolę w patogenezie objawów astmy z nadwrażliwością na niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Celem powyższej pracy było zbadanie obecności alternatywnego splicingu mRNA dla *COX-1* w leukocytach krwi obwodowej chorych na astmę oraz osób zdrowych. W analizie wyników badań molekularnych uwzględniono wiele aspektów charakterystyki klinicznej chorych, włączając w to nadwrażliwość na NLPZ. Obecność alternatywnego splicingu *COX-1* analizowano także w odniesieniu do indukowanej przez aspirynę produkcji kwasu 15-hydroksyeikozotetraenowego (15-HETE) przez leukocyty, które to zjawisko opisane zostało jako charakterystyczne dla populacji chorych na tzw. astmę aspirynową. Nasze badania wykazały istotnie większą ekspresję alternatywnego transkryptu *COX-1* w całej populacji chorych na astmę bez istotnych różnic między chorymi z nadwrażliwością i bez nadwrażliwości na NLPZ. Wykazano także, że obecność alternatywnego mRNA *COX-1* u osób nadwrażliwych na NLPZ wiąże się ze zwiększoną syntezą i uwalnianiem 15-HETE, co sugeruje udział alternatywnych produktów genu *COX-1* w patogenezie astmy z nadwrażliwością na NLPZ.

- Kowalski ML, Wolska A, Grzegorzczak J, Hilt J, Jarzebska M, Drobniewski M, Synder M, **Kurowski M**. Increased responsiveness to toll-like receptor 4 stimulation in peripheral blood mononuclear cells from patients with recent onset rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation*, vol. 2008, Article ID 132732, 7 pages, 2008. doi:10.1155/2008/132732 (IF 1.395 MNiSW 10)

Przekazywanie sygnału przez receptory Toll-podobne (TLR) przyczynia się do pobudzenia mechanizmów procesu zapalnego w przebiegu różnych stanów patologicznych. Nie inaczej jest w przypadku zlokalizowanego w błonie maziowej zapalenia w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. Celem powyższej pracy była więc ocena efektów stymulacji TLR2 i TLR4 na syntezę mediatorów zapalenia przez komórki jednojądrowe krwi obwodowej (PBMC) chorych na RZS, pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów oraz od osób zdrowych. U chorych na RZS stwierdzono zauważalny, kilkudziesięciokrotny wzrost syntezy cytokin prozapalnych (IL-6 i TNF- α) pod wpływem stymulacji lipopolisacharydem (LPS) tj. agonistą TLR4. W pozostałych grupach obserwowano znacznie niższy, najwyżej 8-krotny wzrost produkcji ww. cytokin. Wykazano także, że ekspresja TLR2 i TLR4 modyfikowana jest w odmienny sposób u osób chorujących i nie chorujących na RZS. Ekspresja mRNA TLR4 w komórkach niestymulowanych oraz stymulowanych LPS bądź cytokinami prozapalnymi była podobna u chorych na RZS i chorobę zwyrodnieniową, natomiast znacznie niższa w porównaniu do ekspresji u osób zdrowych. Ekspresja mRNA

TLR2 po stymulacji LPS była istotnie (kilkanaście razy) większa jedynie u osób zdrowych, podczas gdy ten sam bodziec wywoływał istotne zmniejszenie ekspresji mRNA TLR4 u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową. Stymulowanie PBMC mieszaniną cytokin prozapalnych powodowało zmniejszenie ekspresji mRNA zarówno TLR2, jak i TLR4 we wszystkich grupach, chociaż istotność statystyczną obserwowano u chorych na osteoartrozę (w odniesieniu do TLR2 i TLR4) oraz w odniesieniu do TLR4 w grupie kontrolnej. Podsumowując, wykazano, że PBMC od chorych ze świeżo rozpoznany RZS wykazują wysoką reaktywność na stymulację lipopolisacharydem bakteryjnym, a ekspresja receptorów toll-podobnych jest różna u zdrowych i u chorych na zapalne choroby stawów.

- **Kurowski M**, Majkowska-Wojciechowska B, Wardzyńska A, Kowalski ML. Associations of allergic sensitization and clinical phenotypes with innate immune response genes polymorphisms are modified by house dust mite allergen exposure. *Arch Med Sci* 2011; 7: 1029-1036 (IF 1.214 MNiSW 25)

Inspiracją do podjęcia badań będących tematem tej pracy były liczne doniesienia na temat związku predyspozycji do rozwoju astmy i alergii z obecnością polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) w genach kodujących białka biorące udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. W dotychczasowych badaniach oceniano związek SNP z cechami klinicznymi chorób bez uwzględnienia stopnia ekspozycji na alergen. Celem pracy była więc ocena związku występowania wybranych SNP w genach kodujących cząsteczki CD14 (receptor lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych) oraz TLR4 i TLR9 (receptor Toll-podobny typu 4 i 9) z fenotypowymi cechami alergii atopowej w kontekście ekspozycji na alergeny roztoczy kurzu domowego (HDM). Pod uwagę brano następujące SNP: C-159T i G-1359T w genie *CD14*, A896G w genie *TLR4* oraz G2848A w genie *TLR9*. Badanie przeprowadzono u 326 dzieci w wieku 12-16 lat mieszkających na obszarach miejskich (m. Łódź, n=168) bądź typowo wiejskich (powiaty wieluński i skierniewicki, n=158). Alergiczny nieżyt nosa, astma oraz atopia występowały częściej u dzieci miejskich. Chociaż stężenia alergenów roztoczy były większe w gospodarstwach domowych na terenach wiejskich, to częstość uczuleń na alergeny HDM (mierzona obecnością IgE swoistych dla alergenu głównego Der p 1) była większa u dzieci miejskich. W całej grupie 326 dzieci nie stwierdzono związku między stopniem ekspozycji na HDM a sensytyzacją. U dzieci z genotypami CD14/-159CC, CD14/-159TT and TLR9/2848GA większa ekspozycja na alergeny HDM wiązała się z rzadszym występowaniem alergicznego nieżytku nosa. Obserwowano statystycznie istotne związki między zwiększonym narażeniem na alergeny HDM a mniejszą częstością atopii u osób z wariantami CD14/-159CC, CD14/-1359GT, TLR4/896AA oraz TLR9/2848GA. U dzieci z genotypami CD14/-159CC oraz CD14/-1359GG obserwowano natomiast istotne dodatnie korelacje między stężeniami alergenu roztoczy w gospodarstwie domowym a stężeniami swoistych IgE dla tego alergenu ($R = 0.66$; $p = 0.005$ dla CD14/-159CC i $R = 0.57$; $p = 0.003$ dla CD14/-1359GG). Przeciwny efekt obserwowano w odniesieniu do wariantu 896AG polimorfizmu w obrębie genu dla TLR4: osoby z tym genotypem narażone na najwyższe

stężenia alergenu Der p 1 (>2µg/g kurzu) w domu były uczulone na roztocze istotnie rzadziej niż narażeni na mniejsze stężenia alergenu.

Podsumowując, powstanie swoistego uczulenia na alergeny jak również objawów chorób alergicznych może być związane z obecnością określonych polimorfizmów w obrębie genów kodujących białka odpowiedzi nieswoistej oraz podlegać modyfikacji w zależności od stopnia ekspozycji na alergen.

- Lewandowska-Polak A, Brauncajs M, Paradowska E, Jarzębska M, **Kurowski M**, Moskwa S, Leśnikowski ZJ, Kowalski ML. Human parainfluenza virus type 3 (HPIV3) induces production of IFN γ and RANTES in human nasal epithelial cells (HNECs). *J Inflamm (Lond)* 2015 Feb 21;12:16. doi: 10.1186/s12950-015-0054-7. **(IF 1.975 MNiSW 20)**

Infekcje wirusowe mogą stanowić ważny czynnik wywołujący zaostrzenia astmy i innych chorób obturacyjnych dróg oddechowych. W odniesieniu do zaostrzeń astmy istotnym patogenem jest wirus paragrypy typu 3 (PIV3). Pod wpływem infekcji wirusowej w nabłonku dróg oddechowych dochodzi do aktywacji mechanizmów nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, w tym do zwiększonego uwalniania cytokin prozapalnych. Jak dotąd, wpływ infekcji PIV3 na nabłonek górnych dróg oddechowych nie został dokładnie opisany. W związku z tym, celem omawianej pracy była ocena wpływu zakażenia wirusem PIV3 na syntezę i uwalnianie interferonu (IFN- γ) oraz cytokin prozapalnych przez komórki nabłonka górnych dróg oddechowych (HNECs *human nasal epithelial cells*) linii RPMI 2650. Pod wpływem zakażenia PIV3 w HNECs zaobserwowano istotny wzrost ekspresji mRNA IFN- γ po 24 godzinach. W supernatantach hodowli komórkowych obserwowano istotny wzrost wydzielania IFN- γ po 24 i 48 godzinach od zakażenia wirusem. PIV3 indukował także istotny wzrost ekspresji mRNA oraz syntezy białka prozapalnej cytokiny RANTES (CCL5) po 72 godzinach od zakażenia. W odniesieniu do pozostałych analizowanych cytokin: TNF- α , IL-10, TSLP, IL-8, GM-CSF oraz eotaksyny nie obserwowano wpływu zakażenia wirusem PIV3 na syntezę i uwalnianie przez HNECs.

W powyższej pracy wykazano po raz pierwszy, że komórki nabłonka górnych dróg oddechowych wydzielają IFN- γ pod wpływem stymulacji wirusem paragrypy. Efekt ten był proporcjonalny do ilości wirusa a jego szczytowe natężenia obserwowano 24 godziny po zakażeniu. Wydzielanie IFN- γ przez komórki nabłonka oddechowego w następstwie infekcji wirusowej stanowić może istotny mechanizm obronny ograniczający destrukcyjny efekt rozwijającego się zapalenia w odniesieniu do otaczających tkanek.

Wzmoczone wydzielanie RANTES po zakażeniu wirusem obserwowano także w innych modelach badawczych. Zjawisko to może przyczyniać się do powstawania indukowanych infekcją wirusową zaostrzeń przewlekłych chorób obturacyjnych układu oddechowego.

Opisane zjawiska wymagają dalszych badań na komórkach z hodowli pierwotnych pobranych od pacjentów z różnymi schorzeniami dróg oddechowych.

Od roku 2008 zaangażowany byłem w realizację międzynarodowego projektu GA²LEN (Global Allergy and Asthma European Network) – sieci doskonałości w ramach 5. Programu Ramowego UE. Byłem współwykonawcą badania A2POLO (Alergia i Astma wśród POLskich Olimpijczyków) w ramach pakietu zadaniowego 2.8 „Allergy, Asthma and Sports” – wyniki badania stanowią podstawę **publikacji nr 1** wchodzącej w skład niniejszego wniosku. Polscy olimpijczycy uczestniczący w Igrzyskach w Pekinie byli także jedną z grup, u których oceniano podatność na infekcje, stężenie białka CC16 oraz odpowiedź immunologiczną przeciw patogenom oddechowym (**publikacja nr 3**). Zagadnienia związane z występowaniem astmy i alergii u sportowców oraz z wpływem wysiłku na odpowiedź immunologiczną były też głównym tematem projektu naukowego „Rola odporności nieswoistej i czynników infekcyjnych w patogenezie astmy powysiłkowej i zapalenia w drogach oddechowych u sportowców wyczynowych”, który uzyskał finansowanie MNiSW w ramach grantu nr 5981/B/P01/2011/40 realizowanego w latach 2011-2015. Wyniki uzyskane podczas badań prowadzonych w ramach tego projektu stanowią część przedkładanego osiągnięcia naukowego (**publikacje 4 i 5**).

W ramach projektu GA²LEN byłem także zaangażowany w badanie mające na celu ocenę różnych technik pozyskiwania materiału biologicznego z nabłonka nosa dla oceny zakażeń wirusowych górnych dróg oddechowych. Porównywano płukanie, szczotkowanie, wymaz oraz aspirację (zasysanie). Wykazano, że poprzez płukanie jamy nosowej można uzyskać dobrej jakości materiał umożliwiający wykrycie wirusa przy stosunkowo niewielkim dyskomforcie dla pacjenta. Wyniki zostały opublikowane jako artykuł oryginalny: *Irini S. Spyridaki, Ioannis Christodoulou, Lieke de Beer, Vegard Hovland, Marcin Kurowski, Agnieszka Olszewska-Zięber, Kai-Hakon Carlsen, Karin Lodrup-Carlsen, Cornelis M. van Drunen, Marek L. Kowalski, Richard Molenkamp, Nikolaos G. Papadopoulos. Comparison of four nasal sampling methods for the detection of viral pathogens by RT-PCR—A GA²LEN project. J Virol Methods 2009; 156: 102–106*. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tłumaczeniu i przystosowaniu kwestionariusza do wykorzystania w badaniu polskich pacjentów oraz na zebraniu danych kwestionariuszowych.

W latach 2013-2016 byłem zaangażowany w projekt Centrum Badań nad Zdrowym Starzeniem (Healthy Aging Research Center – HARC) finansowany przez Unię Europejską. Byłem kierownikiem zadania (Task Leader) w ramach pakietu zadaniowego “Virtual Research Laboratory and Biobank – increasing the research potential by improving infrastructure (V-Lab)”. Moja rola w tym projekcie polegała na udziale w organizacji Biobanku na terenie Międzywydziałowej Katedry Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii UM w Łodzi. Działający w strukturach Katedry Biobank umożliwia obecnie przechowywanie ok. 10 000 próbek materiału biologicznego w ciekłym azocie oraz około 40 000 próbek w temperaturze -80C.

W tym samym okresie Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii brała udział w dotyczącym alergii pokarmowej projekcie iFAAM (Integrated Approaches to Food Allergen and Allergy Management) finansowanym w ramach 7. Programu Ramowego Unii Europejskiej. W wymieniony projekt byłem zaangażowany w latach 2015-2016 jako

współwykonawca w ramach pakietu zadaniowego WP1 „Early life nutrition and allergy in a EuroPrevall birth cohort”. Spośród ponad 1500 dzieci włączonych do łódzkiej kohorty urodzeniowej w latach 2005-2006 ponownie – po 10 latach – przebadano 868, z czego 408 przybyło na wizyty kliniczne celem oceny sensytyzacji i ewentualnej kwalifikacji do podwójnie ślepej próby prowokacji pokarmowej. W opisywanym projekcie byłem jednym z lekarzy przeprowadzających wizyty kliniczne oraz nadzorujących kwalifikacje i przeprowadzanie prób prowokacyjnych. Wieloośrodkowe publikacje podsumowujące projekt są obecnie w przygotowaniu.

5.3 Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 12 prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznej punktacji IF 29,580 (MNiSW 277),
- 2 prace oryginalne w czasopismach spoza w/w listy o łącznej punktacji 11 pkt. MNiSW,
- 2 prace poglądowe opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznej punktacji IF 13,696 (MNiSW 85);
- 10 prac poglądowych w czasopismach spoza w/w listy – 27 pkt. MNiSW,
- 8 rozdziałów w monografiach bądź podręcznikach
- 2 publikacje w suplementach/wydaniach specjalnych czasopism

Łączny **Impact Factor** moich publikacji wynosi **43,276** a łączna punktacja **MNiSW 400**. Prace oryginalne, których jestem pierwszym bądź ostatnim autorem mają łączną wartość **IF=14,887 i 162 pkt. MNiSW**. Moje prace cytowane były (wyłączając autocytowania) 256 razy wg bazy SCOPUS, 155 razy wg bazy Web of Science oraz 119 razy wg bazy Web of Science Core Collection (dane na 22.09.2017). Mój **indeks Hirscha** wynosi 7 (wg SCOPUS), 6 (wg Web of Science) oraz 5 (wg Web of Science Core Collection).

Wyniki badań przedstawiam od kilkunastu lat na krajowych i międzynarodowych zjazdach i konferencjach, przede wszystkim European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), European Respiratory Society (ERS) oraz Polskiego Towarzystwa Alergologicznego (PTA).

Od roku 2015 rokrocznie jestem członkiem komitetów naukowych (Scientific Program Committee) kolejnych zjazdów European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI).

Od wielu lat jestem też zaangażowany w działalność organizacyjną EAACI i PTA. W strukturach EAACI działałem w Sekcji Młodych (2005-2009), byłem sekretarzem (2011-2015) oraz przewodniczącym (2015-2017) Grupy Zainteresowań „Allergy, Asthma and Sports”. Od czerwca 2017 jestem członkiem zarządu (Board Member) Sekcji Astmy. W ramach PTA byłem przewodniczącym Sekcji Młodych Alergologów (2005-2009), a od czerwca 2011 jestem sekretarzem grupy zainteresowań „Alergia, Astma i Sport”.

