

AUTOREFERAT

Dr nauk medycznych

Dariusz Górka

KATOWICE 2019

Załącznik nr 2
do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: Dariusz Górka

Stanowisko: starszy wykładowca

Miejsce pracy: Zakład Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego
Katedry Fizjoterapii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

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

28. 10. 1988 – Magister biologii i ochrony środowiska: specjalność: biochemia

Tytuł pracy: „Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych wybranych onkogenów
w ludzkich białaczkach”, Promotor: prof. dr hab. n. med. Mieczysław Chorąży,
Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet
Śląski w Katowicach.

06.06.1998 – Doktor nauk medycznych: biologia medyczna, specjalność: biologia
medyczna, Tytuł rozprawy: "Białka frakcji postmikrosomalnych
krótkotrwale predegenerowanych nerwów kulszowych szczura",
Promotor: prof. dr hab. n. med. Joanna Lewin-Kowalik, Katedra i Zakład Fizjologii,
Wydział Lekarski w Katowicach, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

02. 11 1988 – 31. 08. 1989 – stażysta biolog w Zakładzie Fizjologii Śląskiego
Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

01. 09. 1989 – 30. 09. 1996 – biolog w Zakładzie Fizjologii Śląskiego Uniwersytetu
Medycznego w Katowicach.

01. 10. 1996 – 30. 09. 1999 – asystent w Zakładzie Fizjologii Śląskiego Uniwersytetu
Medycznego w Katowicach.

01. 10. 1999 – 30. 09. 2011 – adiunkt w Zakładzie Fizjologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

01.10. 2011 – do nadal – starszy wykładowca w Zakładzie Fizjologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

01. 10. 2013 – do nadal Kierownik Zakładu Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego Katedry Fizjoterapii Wydziału Nauk o Zdrowiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

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

a) tytuł osiągnięcia naukowego, autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa,

Dorobek główny stanowi monografia:

„Wpływ zastosowania natężonego treningu lokomotorycznego na zmiany morfologiczne oraz wyniki funkcjonalne pourazowych uszkodzeń nerwów obwodowych u myszy Bcl-2”.

Autor: Dariusz Górka (100% udział własny)

**Wydawnictwo Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach,
Katowice 2019r.**

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

WPROWADZENIE

Wiadomo od dawna, że aktywność fizyczna wpływa pozytywnie na układ nerwowy. Udowodniono, że regularny trening u zwierząt może doprowadzić do wzmocnienia naturalnych mechanizmów naprawczych, dzięki nadekspresji neurotrofin i białek adhezyjnych. Jak wynika z wieloletnich badań, trening lokomotoryczny w znaczący sposób

wpływa na poprawę funkcjonalną szczurów, u których został uszkodzony rdzeń kręgowy. Niestety do tej pory badania nad wykorzystaniem treningu ruchowego w przypadku uszkodzenia nerwów obwodowych, nie spotkały się z tak dużym zainteresowaniem badaczy.

Dowiedziano wpływ białek Bcl-2 na procesy wzrostu aksonów w ośrodkowym układzie nerwowym. Konsekwentnym i uzasadnionym działaniem wydaje się być analiza ich oddziaływania na obwodzie. Dlatego postanowiono zbadać wpływ absencji tego genu oraz jednoczesny wpływ treningu lokomotorycznego na proces regeneracji nerwu obwodowego. Przedstawiany projekt obejmuje czynnościową, morfologiczną oraz immunohistochemiczną ocenę procesu regeneracji w obrębie nerwu kulszowego u myszy z nokautem genu *bcl-2*. Przy pomocy analizy histologicznej i czynnościowej myszy dzikich oraz myszy z brakiem genu *bcl-2* poddawanych treningowi lokomotorycznemu o zróżnicowanym natężeniu. Badania te mogą przyczynić się do modyfikacji strategii map w obrębie układu nerwowego.

Pomimo szeroko zakrojonych badań oraz zaangażowania specjalistów z wielu dziedzin nauki analiza możliwości wpływu na procesy neuroregeneracyjne wciąż nie jest zadowalająca. Mechanizmy patofizjologiczne po uszkodzeniach struktur nerwowych również budzą wiele kontrowersji. Znane są możliwości oddziaływania absencji genu *bcl-2* na substancje i czynniki neurotroficzne, co może mieć przełożenie na proces regeneracji nerwów obwodowych. Okazuje się również, że nieobecność genu *bcl-2* przekłada się na liczne procesy apoptotyczne w strukturach centralnego układu nerwowego.

Większość dotychczas przeprowadzonych badań dotyczących oddziaływania białek kodowanych przez gen *bcl-2* opiera się tylko na wynikach uzyskanych *in vitro*, przy użyciu izolowanych linii komórkowych. Fundamentalnym krokiem naprzód wydaje się więc określenie roli białek Bcl-2 w procesach związanych z regeneracją oraz rozwojem organizmu i utrzymaniem jego homeostazy w warunkach *in vivo*. Prowadzone wcześniej badania potwierdziły znaczący wpływ białek Bcl-2 na procesy wzrostu aksonów w OUN, kolejnym krokiem wydaje się zatem analiza oddziaływania owego białka na obwodzie. Badania te mogą przyczynić się do istotnej zmiany filozofii działań ratunkowych w obrębie układu nerwowego.

Wszystkie zwierzęta poddano treningowi lokomotorycznemu w jednakowej kolejności, po odpowiednio długiej aklimatyzacji w urządzeniu. Zwierzęta trenowano na specjalnie zaprojektowanej bieżni, której prędkość przesuwu wynosiła 25 m/min bez przerwy przez, jedną godzinę dziennie, pięć dni w tygodniu. Wszystkie zabiegi chirurgiczne przeprowadzono w warunkach sali operacyjnej Centrum Medycyny

Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach umożliwiając obserwację operowanych zwierząt po zabiegu, do chwili wybudzenia ze znieczulenia.

Materiał badawczy stanowiło 150 myszy, o masie ciała 10 - 40g.

Pierwszą grupę badawczą stanowiły zwierzęta z nieobecny genem *bcl-2* -nokaut genu *bcl-2* (n=75). Grupę *bcl-2* [A] (n=25) stanowiły zwierzęta z nieobecny genem *bcl-2*, które zostały poddane uszkodzeniu nerwu kulszowego, a następnie wymuszonemu treningowi lokomotorycznemu na bieżni. Grupę *bcl-2* [B] (n=25), stanowiły myszy, których nie poddano wymuszonemu treningowi lokomotorycznemu po zmiążdżeniu nerwu kulszowego. W grupie zwierząt *bcl-2* [C] (n=25) znajdowały się myszy, u których nerw kulszowy nie uległ uszkodzeniu oraz nie został zastosowany program treningowy. Jednakowy podział przyjęto w przypadku drugiej grupy badanych zwierząt heterozygot myszy dzikich Wild Type (n=75).

Ze względu na wprowadzone modyfikacje genetyczne badanych zwierząt, niezbędna była ich genotypizacja w celu potwierdzenia obecności wprowadzonych mutacji. Badania czynnościowe i funkcjonalne odbywały się przy pomocy: Hot-Cold Plate oraz analizy CatWalk.

W znieczuleniu ogólnym, na zewnętrznej powierzchni uda myszy, nacięto skórę, na około 1 cm. Następnie nerw kulszowy był preparowano „na tępo”, po czym wywołano ucisk, w połowie jego długości (3 mm proksymalnie do bifurkacji nerwu kulszowego), klipsem naczyniowym (AESCULAP Inc., USA) przez 30 s, siła nacisku wynosiła 0,88 N (110 g/cm^2).

Po zakończeniu analizy czynnościowej danej grupy zwierząt, po ich uśpieniu, wycinano odcinki dalsze, uprzednio uszkodzonych nerwów kulszowych, oraz odcinki nieuszkodzonych nerwów we właściwych grupach. Pobrane tkanki utrwalano w roztworze 10% formaliny w PBS ok 6 godz. temp. 4st C. Następnie odwodniono w gradiencie sacharozy 10, 20, 30% w PBS i zamrożono w medium cryomatrix (Thermofisher). Zamrożone tkanki skrojono na skrawki

o grubości 10 μm na mikrotomie mrożakowym (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Niemcy) i montowano na szkiełka (POLYSINE, MenzelGlaeser, Niemcy). Skrawki poddano ocenie immunohistochemicznej z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych:

- Królicze anti-GAP – 43 (1:500 Novus Biologicals UK dla uwidocznienia stożków wzrostu regenerujących neurytów,

- Mysie anty-GFAP, (1: 500 Millipore UK) dla sprawdzenia ekspresji wybranych receptorów dla czynników neurotroficznych,

- Królicze anty-BDNF (1:500 Novus Biologicals UK) dla oceny stopnia ekspresji wybranych czynników neurotroficznych w obrębie regenerującego nerwu.

Badane skrawki blokowano w 10% surowicy koziej w PBS przez 60 min temp.pok. następnie inkubowano przez noc w 4°C z przeciwciałem I-rzędowym w 1% surowicy koziej w PBS. Później inkubowano przez 60 min w temp. pok. z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromami (Alexa Fluor 1:500 Thermo Fisher Scientific). Dla GAP-43 Alexa Fluor 568, GFAP – Alexa Fluor 488, BDNF Alexa Fluor 568. Preparaty zamykano w medium (Vectashield z DAPI) firmy Vector.

Preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym (ZEISS SCOPE.A1 NIEMCY) i konfokalnym (FluoView, Olympus, Japonia). Otrzymane obrazy, obejmujące miejsce uszkodzenia, zapisywano cyfrowo. Preparaty krojonych podłużnie nerwów badano metodą immunohistochemii. Analizowane skrawki blokowano w 10% surowicy koziej w PBS przez 60 min temp.pok. Następnie preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym (ZEISS SCOPE.A1 NIEMCY) i konfokalnym (FluoView, Olympus, Japonia). Uzyskane obrazy, obejmujące miejsce uszkodzenia, zapisywano cyfrowo.

Wyniki obejmują charakterystykę zmian ciężaru ciała oraz czucia powierzchniowego ciepła i zimna w trakcie trwania eksperymentu w obu badanych grupach myszy (zestawienie wyników obu grup myszy oraz wyniki badanych parametrów w poszczególnych grupach).

Najważniejsze wyniki analizy poszczególnych parametrów chodu uzyskane za pomocą systemu CatWalk przedstawiono ukazując zmiany zachodzące w cotygodniowych badaniach w obu badanych grupach Bcl-2 (A, B, C) oraz Wild Type (A, B, C).

Dla ułatwienia interpretacji rezultatów poszczególnych parametrów chodu CatWalk zestawiono wyniki uzyskane w trakcie badania łapy prawej, gdzie uszkodzony został nerw kulszowy oraz wyniki łapy lewej, w której owego urazu nerwu nie wykonano. Dzięki temu możliwa była interpretacja zmian poszczególnych parametrów chodu w odniesieniu do łapy zdrowej oraz ich porównanie w obu badanych grupach zwierząt.

Wyniki analizy CatWalk podzielono na parametry czasowo – przestrzenne, kinetyczne oraz koordynacyjne. W związku z dużą liczbą badanych parametrów chodu przedstawione rezultaty analiz statystycznych zostały zestawione analogicznie z podziałem na poszczególne podgrupy badanych zwierząt A, B, C. Przedstawiono również istotne różnice wyników

CatWalk porównując je w obu badanych grupach Bcl-2 oraz Wild Type - łącznie, bez podziału na poszczególne podgrupy A, B, C.

Kolejno przedstawiono rezultaty analiz statystycznych badań immunohistochemicznych: GAP-43 dla uwidocznienia stożków wzrostu regenerujących neurytów, GFAP- dla sprawdzenia ekspresji wybranych receptorów, dla czynników neurotroficznych oraz BDNF- dla oceny stopnia ekspresji wybranych czynników neurotroficznych w obrębie regenerującego nerwu. Wyniki obu grup bcl-2 oraz Wild Type zestawiono oddzielnie dla zwierząt z uszkodzonym nerwem oraz stosowanym wymuszonym treningiem lokomotorycznym na bieżni, porównując je z myszami pozbawionymi możliwości takiego treningu o takiej intensywności.

Z naszych badań wynika, że podczas pierwszych 14 dni treningu po urazie zmiążdzeniowym nerwu kulszowego u myszy z nokautem genu *bcl-2*, ponad trzykrotnie zwiększa się liczba komórek GAP-43 pozytywnych w miejscu zmiążdżenia, w porównaniu z myszami, którym nie przeprowadzono treningu.

Na pewno można sobie wyobrazić, że bardzo intensywny trening na bieżni może zwiększyć syntezę białek cytoszkieletowych, co do tej pory zaobserwowano po urazie. Jednak gwałtowny i efektywny wpływ treningu na bieżni na intensyfikację wspomnianej syntezy byłby trudny do zrozumienia, głównie przez tradycyjny pogląd na syntezę somatyczną i powolny transport białek aksonalnych. Przyszłe badania mogą wskazać bardziej ustandaryzowany schemat treningu lokomotorycznego, w zależności od rodzaju uszkodzenia obwodowego układu nerwowego. Szybkość transportu tych białek może mieć wpływ na wczesną inicjację procesów oddziałujących na odrost uszkodzonego nerwu, ze względu na białka syntetyzowane w okolicy miejsca uszkodzenia. U myszy, u których mRNA transportowane jest do aksonów, rozkład procesów i ich relokacja odpowiedzialnych za właściwości transportowe aksonu po zranieniu są zmniejszone.

Odpowiedź stożków wzrostu dla BDNF, która naszym zdaniem jest wymagana do zwiększenia poprawy funkcjonalnej w zakresie wyznaczników chodu poprzez trening na bieżni, zależy od lokalnej syntezy białek.

Trening lokomotoryczny był chętnie wykorzystywany w badaniach na zwierzętach, jako forma rekreacji lub jako ogólnoustrojowe oddziaływanie mające na celu intensyfikację fizjologicznych procesów adaptacyjnych. Na podstawie doświadczeń własnych doszliśmy do wniosku, że jeśli intensywność ćwiczeń jest wysoka, wymagana jest ich mniejsza częstotliwość [294]. Na podstawie dostępnych danych stwierdziliśmy z pewną ostrożnością,

że zasada ta dotyczy również treningu na bieżni w celu zwiększenia regeneracji aksonu po uszkodzeniu nerwów obwodowych. Przykładowo, zaledwie cztery minuty intensywnego poruszania się na bieżni poprawia regenerację aksonu w takim samym zakresie, jak sześćdziesiąt minut treningu w niskim tempie (tj. 5 lub 10 m / min). Dlatego uważamy, że dalsze badania wpływu treningu lokomotorycznego są uzasadnione w celu określenia najbardziej efektywnego minimalnego balansu, czasu ćwiczeń i intensywności, aby zmaksymalizować efekt treningu w odniesieniu do funkcjonalnych wyników regeneracji aksonu.

Uważamy, że w przypadku zmiążdzeniowego modelu uszkodzenia nerwu kulszowego, wzmocnienie procesów związanych z regeneracją aksonu przez trening na bieżni u myszy z brakiem genu *bcl-2*, jest efektem stymulacji syntezy białek aksonalnych. W przypadku takiego modelu uszkodzenia mniej istotne wydają się białka syntetyzowane lokalnie. W odpowiedzi na trening na bieżni można zakładać reakcje, które nie ograniczają się do białek strukturalnych potrzebnych do budowy nowych aksonów. Obejmują one również białka sygnalizacyjne, jak BDNF i jego receptor *trkB*. Trening lokomotoryczny może się zatem stać użytecznym środkiem pobudzania do wzrostu regenerujących aksonów obwodowych w przypadku uszkodzenia nerwu obwodowego o typie neuropraksji.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moje dotychczasowe dokonania naukowe obejmują w sumie 28 prac pełnotekstowych, spośród których 12 znajduje się na Liście Filadelfijskiej (Impact Factor), 3 rozdziałów w podręcznikach krajowych, 3 współautorstwa podręczników krajowych. Liczba streszczeń ze zjazdów międzynarodowych – 25, ze zjazdów krajowych – 17.

Łączna punktacja : IF = 20.415 MNiSW = 370

Liczba cytowań Web of Science: 136 Indeks Hirscha = 6

Kierunki badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

Działalność naukowo – badawcza prowadzona przeze mnie w początkowym okresie, po ukończeniu studiów i podjęciu pracy zawodowej w Katedrze i Zakładzie Fizjologii, obejmowała obszar związany z regeneracją w obrębie obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego.

Układ nerwowy może reagować na uraz w dwojaki sposób. Wypustki nerwowe, tworzące nerwy obwodowe, mogą w sprzyjających warunkach samoistnie regenerować, podczas gdy komórki w obrębie ośrodkowego układu nerwowego takich właściwości nie posiadają. Jedną z technik badawczych, stosowaną do wzbudzania regeneracji uszkodzonych neurytów OUN, jest implantacja w nim fragmentów nerwów obwodowych. W poprzednio prowadzonych badaniach stwierdziliśmy, że predegeneracja odcinka dystalnego nerwu użytego do wszczepu nasila jego aktywność neurotroficzną, oraz że intensywność tego wpływu zależy od czasu predegeneracji.

W celu wzbudzenia regeneracji w OUN, aplikuje się także w pobliże uszkodzonych neurytów substancje aktywne, w tym również wyciągi tkankowe. Z badań prowadzonych w Katedrze Fizjologii wynikało, że uzyskane z predegenerowanych odcinków dalszych nerwów obwodowych frakcje submikrosomalne są w stanie wzbudzić i podtrzymać odrost uszkodzonych neurytów. Intensywność ich działania zależy od czasu, jaki upływa od przecięcia nerwu obwodowego do pobrania materiału tkankowego do izolacji. Czasy te wyznaczyliśmy na 7, 14, 28 i 35 dni po uszkodzeniu.

Etapy pracy:

1. Izolacja frakcji postmikrosomalnych z predegenerowanych nerwów kulszowych szczura.
2. Rozdziały elektroforetyczne SDS PAGE w żelu poliakrylamodowym.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym jest użyteczną i powszechnie stosowaną metodą rozdzielania i charakterystyki białek. Jest to stosunkowo prosta i szybka technika. Na jednym żelu można przeprowadzić jednocześnie analizę wielu próbek, a rozdzielone białka można skutecznie wykrywać w żelu np. metodami barwienia, immunoprecypitacji czy autoradiografii. Można więc stosować tę technikę na przykład przy analizie białek we frakcjach zbieranych w trakcie rozdzielania na kolumnie chromatograficznej.

W SDS-PAGE stwarza się warunki, w których wszystkie składniki próbki mają ten sam ładunek; ich ruchliwość jest więc jedynie funkcją mas cząsteczkowych (SDS-PAGE). Użycie anionowego detergentu soli sodowej kwasu dodecylosiarkowego (SDS – ang. Sodium Dodecyl Sulfate) pozwala na rozdzielenie elektroforetyczne białek zgodnie z ich masą cząsteczkową. Przed i w trakcie elektroforezy białka ulegają dysocjacji i denaturacji w obecności SDS, który łączy się z białkami specyficznie w stosunku masowym 4,1:1. Zapewnia to przejście przez białko ujemnego ładunku elektrycznego netto o stałej gęstości, bez względu na jego długość. Dla całkowitego rozwinięcia polipeptydu i zapewnienia mu pierwszorzędowej struktury, niezbędne jest dodatkowo zniszczenie mostków dwusiarczkowych (β -merkaptotanol lub ditiotretiol). Oplaszczanie białka przez SDS oraz redukcja mostków dwusiarczkowych pozwalają na separację białek w żelu poliakrylamidowym ze względu na ich wielkość, a zatem pośrednio masę cząsteczkową. Szybkość migracji w SDS-PAGE nie jest determinowana przez ładunek elektryczny białka zależny od pH i konformacji białka.

Dzięki możliwości rozdzielania białek na podstawie ich wielkości możemy oznaczyć masę cząsteczkową nieznanego białka, porównując jego położenie w żelu w stosunku do innych białek (tzw. białek wzorcowych) po zakończonej migracji i wybarwieniu.

Metody opanowane przeze mnie, w tym czasie, to izolacja białek frakcji postmikrosomalnych oraz rozdziały elektroforetyczne w żelach poliakrylamidowych SDS PAGE.

- [1] Lewin-Kowalik J, Sieroń AL, Krause M, Barski J, Górka D. Time-dependent regenerative influence of predegenerated nerve grafts on hippocampus. *Brain Res.Bull.* 1992 : Vol.29, No.6, p.831-835

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.692;

Punktacja ministerstwa: 20.000

- [2] Marcol W, Kotulska-Wolwender K, Świąch-Sabuda E, Larysz-Brysz M, Gołka B, Górka D, Lewin-Kowalik J. Regeneration of sciatic nerves of adult rats induced by extracts from distal stumps of pre-degenerated peripheral nerves. *J.Neurosci.Res.* 2003: Vol.72, No.3, p.417-424.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 3.374;

Punktacja ministerstwa: 24.000

Kolejnym etapem mojej pracy naukowej była analiza frakcji postmikrosomalnych uzyskanych z predegenerowanych nerwów kulszowych szczura po 1 – 6 dni po uszkodzeniu. Celowym byłoby zbadanie zmian zachodzących w tych frakcjach, w pierwszym tygodniu

degeneracji nerwu obwodowego. Uchwycenie najkrótszego czasu, w którym dochodzi do znaczącego wzrostu aktywności neurotroficznego w uszkodzonym nerwie obwodowym, pozwoliłoby na uproszczenie procedury eksperymentalnej. Miałoby to również duże znaczenie zarówno w ewentualnym przyszłościowym zastosowaniu terapeutycznym krótkotrwale predegenerowanych implantów nerwów obwodowych oraz uzyskanych z nich oczyszczonych wyciągów, jak również w wyizolowaniu i scharakteryzowaniu zawartych w nich substancji o właściwościach neurotroficznymi. Temat stał się przedmiotem mojej pracy doktorskiej.

Badania przeprowadziłem na 160 dojrzałych samcach szczurzych szczepu Wistar C. Po uspianiu zwierząt, przecinałem obydwie nerwy kulszowe na wysokości stawu biodrowego, nie zbliżając się do przecięcia kikutów nerwu. Zwierzęta zostały podzielone na 7 równych liczebnie grup, po 20 osobników w grupie, w zależności od czasu, jaki upłynął od przecięcia nerwu do pobrania materiału do badań, a mianowicie 1, 2, 3, 4, 5, 6, dni. W grupie kontrolnej nerwów wcześniej nie uszkadzałem. Szczury były zabijane przez dekapitację. Wycinałem odcinki dalsze przeciętych uprzednio nerwów kulszowych lub nieuszkodzone nerwy kulszowe w grupie kontrolnej.

a) Elektroforetyczny rozdział białek w pierwszym kierunku.

W zestawie własnej konstrukcji, przeprowadzałem rozdziały elektroforetyczne w pionowych żelach poliakrylamidowych, według metody Laemmli. Analizę rozdziałów elektroforetycznych przeprowadzałem za pomocą opracowanego specjalnie w tym celu programu obliczeniowego oceny masy molowej białek po rozdziałach elektroforetycznych w żelach poliakrylamidowych i agarozowych. Masę cząsteczkową białek obliczałem stosując metodę aproksymacji 2 x 3 punkty krzywej wzorcowej według Southerna. Opracowania statystycznego wyników dokonałem za pomocą testu Wilcoxon.

b) Analiza białek metod elektroforezy dwukierunkowej.

Otrzymane frakcje submikrosomalne były analizowane metodą elektroforezy dwukierunkowej wg O'Farrella. Składa się ona z dwóch etapów: ogniskowanie izoelektryczne (isoelectric focusing), umożliwiające rozdział białek według ich punktów izoelektrycznych, oraz rozdział elektroforetyczny według mas molowych. Po zakończeniu ogniskowania żele mocznikowe były podbarwiane i montowane w aparacie do elektroforezy dla przeprowadzenia rozdziału w drugim kierunku. Żele były fotografowane; masy molowe rozdzielonych białek obliczałem przy pomocy programu komputerowego, zaś pI poszczególnych frakcji ustalałem według wyznaczonej uprzednio krzywej wzorcowej.

Badania pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- a. Po uszkodzeniu nerwów kulszowych szczura w uzyskanych z nich frakcjach submikrosomalnych wzrasta stężenie białek.
- b. Zmiany składu białkowego frakcji submikrosomalnych zależy od czasu predegeneracji i są najbardziej nasilone w trzecim i czwartym dniu po przecięciu.
- c. Frakcje o określonych masach molowych których stężenie zmienia się w czasie są mieszaninami białek o różnych punktach izoelektrycznych.

- [3] Górka D, Lewin-Kowalik J, Larysz-Brysz M, Gołka B, Święch-Sabuda E, Małeczka-Tendera E. Postmicrosomal protein fractions from short-time-predegenerated rat sciatic nerve. *Acta Neurobiol.Exp.*2000; Vol.60 No.4, s.437-445.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 0.631

Punktacja ministerstwa: 10

- [4] Lewin-Kowalik J, Barski JJ, Krause M, Górka D, Gołka B, Larysz-Brysz M. Neurotrophic effect of submicrosomal fractions obtained from pre-degenerated peripheral nerves. *Restor.Neurol.Neurosci.*1994; Vol.7, No.2, p.71-78.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.435

Punktacja ministerstwa: 15

- [5] Gołka B, Święch-Sabuda E, Gołka D, Marcol W, Górka D, Pietrucha-Dutczak M, Lewin-Kowalik J. The changes in neurotrophic properties of the peripheral nerves extracts following blocking of BDNF activity. *Neurol.Res.*2007; Vol.29, No.5, p.500-505.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.634

Punktacja ministerstwa: 27

- [6] Pietrucha-Dutczak M, Lewin-Kowalik J, Górka D, Larysz-Brysz M. 2-D-Page analysis of the content and composition of proteins obtained from predegenerated distal stumps of rat sciatic nerves. *Ann.Acad.Med.Siles.*2000; Vol.42-43, s.27-36.

Punktacja ministerstwa: 3

- [7] Górka D, Larysz-Brysz M, Lewin-Kowalik J, Krause M, Barski JJ. Content and composition of proteins obtained from short-time-predegenerated distal stumps of rat sciatic nerves. *Appl.Biol.Commun.*1994; Vol.4, No.3/4, p.61-68.

Punktacja ministerstwa: 3

- [8] Barski JJ, Lewin-Kowalik J, Krause M, Górka D, Larysz-Brysz M, Gołka B, Święch-Sabuda E. Autologous connective tissue bars as vehicles for the administration of growth-influencing substances to the brain. *Brain Res.Brain Res.Protoc.*1997; Vol.1, No.1, p.27-32.

Punktacja ministerstwa: 15

Kierunki badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

Kolejnym etapem mojej działalności naukowej, już po uzyskaniu stopnia doktora, była aplikacja frakcji postmikrosomalnych predegenerowanych nerwów kulszowych szczura do hipokampa, jak i samych fragmentów predegenerowanych nerwów. Zabiegi były wykonywane u szczurów w znieczuleniu ogólnym, a sama implantacja frakcji oraz fragmentów nerwów była możliwa przy pomocy aparatu stereotaktycznego. Praca wymagała umiejętności operacji mikrochirurgicznych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz odpowiednio opracowanej metody znieczulenia zwierząt.

- [9] Lewin-Kowalik J, Sieroń A, Krause M, Barski J, Górka D. The influence of peripheral nerve graft's predegeneration stage on the regrowth of hippocampal injured neurites and concomitant changes in submicrosomal fraction proteins of grafts. *Acta Physiol.Hung.*1992; Vol.46, No.5, p.219-231.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 0.228

Punktacja ministerstwa: 5

- [10] Lewin-Kowalik J, Koksanowicz E, Barski JJ, Krause M, Górka D, Gołka B, Kwiek S. Experimental hyperthyroidism enhances the regeneration of central neurites promoted by peripheral nerve grafts in the hippocampus. *Restor.Neurol.Neurosci.*1993; Vol.6, No.1, p.57-63.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 2.609

Punktacja ministerstwa: 15

- [11] Lewin-Kowalik J, Górka D, Larysz-Brysz M, Gołka B, Święch-Sabuda E, Małecka-Tendera E, Krause M. Short-time-predegenerated peripheral nerve grafts promote regrowth of injured hippocampal neurites. *Acta Physiol.Hung.*1997; /1998 Vol.85 no.3, p.259-268.

Punktacja ministerstwa: 5

- [12] Lewin-Kowalik J, Górka D, Larysz-Brysz M, Gołka E, Święch-Sabuda E, Małecka-Tendera E, Krause M. Purified extracts from short-time-predegenerated rats' sciatic nerves promote the regrowth of injured hippocampal neurites. *Acta Physiol.Hung.*1997; /1998 Vol.85 no.4, p.325-334.

Punktacja ministerstwa: 5

Po zdobyciu wiedzy na temat zmian zachodzących po wszczepieniu predegenerowanego nerwu w obrębie hipokampa moje zainteresowania koncentrowały się na możliwości zastosowania autologicznego wszczepu nerwu predegenerowanego w obrębie nerwu wzrokowego.

- [13] Gołka B, Lewin-Kowalik J, Święch-Sabuda E, Larysz-Brysz M, Górka D, Małecka-Tendera E. Predegenerated peripheral nerve graft rescue retinal ganglion cells from axotomy-induced death. *Exp.Neurol.*2001; Vol.167, No.1, p.118-125.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 3.503

Punktacja ministerstwa: 20

- [14] Święch-Sabuda E, Gołka B, Kotulska K, Larysz-Brysz M, Górka D, Gołka D, Marcol W, Lewin-Kowalik J. Do peripheral nerve extracts protect retinal ganglion cells from axotomy-induced death? *Restor.Neurol.Neurosci.*2004; Vol.22, No.1, p.11-18.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1.412

Punktacja ministerstwa: 15

Kontynuacją poprzednich badań w zespole Pani prof. dr hab. n. med. Joanny Lewin-Kowalik było zastosowanie polimer hollow fibers, jako narzędzia do wzbudzenia regeneracji w ośrodkowym układzie nerwowym, przy pomocy frakcji białkowej o określonej masie cząsteczkowej.

- [15] Barski JJ, Lewin-Kowalik J, Krause M, Górka D, Larysz-Brysz M, Gołka E, Święch-Sabuda E. Autologous connective tissue bars as vehicles for the administration of growth-influencing substances to the brain. *Brain Res.Brain Res.Protoc.*1997; Vol.1, No.1, p.27-32.

Punktacja ministerstwa: 15

- [16] Larysz-Brysz M, Kotulska K, Górka D, Gołka D, Marcol W, Lewin-Kowalik J. Polymer hollow fiber-encapsulated peripheral nerve extracts change their activity towards injured hippocampal neurites in rats. *Acta Physiol.Hung.*2007; Vol.94 No.3, p.237-247.

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 0.453

Punktacja ministerstwa: 13

- [17] Lewin-Kowalik J, Marcol W, Kotulska-Wolwender K, Larysz-Brysz M, Święch-Sabuda E, Górka D, Gołka E, Małecka-Tendera E. Dead-ended autologous connective tissue chambers in peripheral nerve repair : early observations. *Acta Physiol.Hung.*2003; Vol.90, No.2, p.157-166.

Punktacja ministerstwa: 5

- [18] Barski JJ, Lewin-Kowalik J, Krause M, Gołka B, Górka D, Larysz-Brysz M. Autologous connective tissue chamber as a tool for introducing active substances into the CNS. *Acta Physiol.Hung.*1996; Vol.84, No.1, p.43-53.

Punktacja ministerstwa: 5

Następnym ważnym etapem mojej działalności była analiza obecności metaloproteinaz zawartych w określonych tkankach. Cel ten wymagał opanowania nowej techniki w postaci zymografii elektroforetycznej.

Badania dotyczyły zjawisk zachodzących podczas:

1. cholestazy zewnątrzwątrobowej,
2. eksperymentalnie wywołanego tętniaka aorty brzusznej u szczurów z hipercholesterolemią i zmianami miażdżycowymi ściany aorty.

Metaloproteinazy 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) są żelatynazami należącymi do czwartej klasy metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. MMP-2 – żelatynaza A – obecna w większości komórek organizmu, szczególnie w układzie nerwowym; jej substratami są liczne białka macierzy pozakomórkowej, białka mieliny. MMP-9 – żelatynaza B – charakterystyczna dla leukocytów, miocytów, śródbłónka naczyń, tkanki nerwowej oraz licznych guzów; jej substratami są liczne białka macierzy pozakomórkowej (szczególnie kolageny) oraz białka mieliny. Zależność MMP-9 od aktywności MMP-2 jest podstawą ich wspólnego oznaczania.

W praktyce klinicznej z cholestazą zewnątrzwątrobową spotykamy się najczęściej u pacjentów z nowotworami pola trzustkowo – dwunastniczego (głowy trzustki, brodawki Vatera i dystalnego odcinka dróg żółciowych), kamicią przewodową i jatrogennymi uszkodzeniami dróg żółciowych. Poznanie zmian aktywności metaloproteinaz w czasie trwania cholestazy zewnątrzwątrobowej może przyczynić się do lepszego zrozumienia jej patofizjologii. Doświadczenia polegające na wywołaniu cholestazy zewnątrzwątrobowej u zwierząt przez podwiązanie przewodu żółciowego wspólnego w celu badania zaburzeń różnych funkcji wątroby i innych narządów były wykonywane i są opisywane w literaturze. Większość tego typu badań przeprowadzona została na szczurach.

Tętniaki aorty brzusznej pozostają od wielu lat istotną przyczyną zgonów wśród osób powyżej 60 roku życia. Stopniowa degradacja błony elastycznej zachodząca w ścianie naczynia powoduje postępujące poszerzenia światła naczynia, które nieleczone prowadzi do pęknięcia. Leczenie operacyjne zaawansowanych tętniaków wiąże się z bardzo wysokim ryzykiem. Obecnie sposobem postępowania u tych chorych jest systematyczna kontrola progresji zmian w naczyniu i następnie interwencja chirurgiczna przy znacznym jego poszerzeniu. Ten rodzaj postępowania, jakkolwiek zapewnia u większości chorych możliwość wkroczenia z interwencją w odpowiednim momencie, nie wydaje się satysfakcjonujący. Konieczne jest poszukiwanie rozwiązań zachowawczych,

które pozwoliłyby nie tylko na bierną obserwację postępu choroby, ale również na zahamowanie, lub, w najlepszym wypadku, odwrócenie leżących u jej podstaw procesów patologicznych.

Celem pracy było zbadanie różnic w ekspresji i aktywności poszczególnych metaloproteinaz (MMP) i ich inhibitorów (TIMP) w ścianie eksperymentalnie wywołanego tętniaka aorty brzusznej u szczurów z hipercholesterolemią i zmianami miażdżycowymi ściany aorty w porównaniu do zwierząt z prawidłowym lipidogramem oraz określenie dynamiki zmian aktywności metaloproteinaz i ich inhibitorów w trakcie powstawania eksperymentalnego tętniaka aorty w obu grupach.

- [19] Lekstan A, Lampe P, Lewin-Kowalik J, Olakowski M, Jabłońska B, Łabuzek K, Jędrzejowska-Szypułka H, Olakowska E, Górka D, Filip I, Dranka-Bojarowska D. Concentrations and activities of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors (TIMPS) in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *J.Physiol.Pharmacol.*2012; Vol.63, No.6, p.589-599

**Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 2.476
Punktacja ministerstwa: 25**

- [20] Kotulska-Wolwender K, Larysz-Brysz M, Fus Z, Korczyńska I, Górka D, Lewin-Kowalik J. Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej - perspektywy ich wykorzystania w medycynie. *Wiad.Lek.*2002; T.55 nr 7-8, s.463-471.

Punktacja ministerstwa: 5

- [21] Lewin-Kowalik J, Marcol W, Larysz-Brysz M, Wolwender K, Pietrucha-Dutczak M, Górka D. Pre-degenerated peripheral nerve extracts applied to the proximal stump of transected sciatic nerve enhance both regeneration and automatic behavior in rats. *Med.Sci.Monitor*2002; Vol.8, No.10, p.BR414-420

- [22] Woszczycka-Korczyńska I, Górka D, Matuszek I, Pietrucha-Dutczak M, Lewin-Kowalik J. Aktywność metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) w odcinkachdystalnych przeciętych nerwów kulszowych dorosłych szczurów. *Wiad.Lek.*2005; T.58 nr 7-8, s.411-414.

Punktacja ministerstwa: 6

- [23] Magdalena Larysz-Brysz, Katarzyna Kotulska, Dariusz Górka, Marita Pietrucha-Dutczak, Beata Gołka, Joanna Lewin-Kowalik. Peripheral nerve extracts with blocked NGF activity maintain growth-promoting activity upon injured hippocampal neurites in rats. *Ann.Acad.Med.Siles.*2008; Vol.62, No.3-4, p.7-13

Punktacja ministerstwa: 6

- [24] Marita Pietrucha-Dutczak, Wiesław Marcol, Izabella Korczyńska, Iwona Matuszek, Dariusz Górka, Joanna Lewin-Kowalik. Struktura powłok mielinowych.

Część I. Pol.Merk.Lek.2003; T.15 nr 87, s.268-272.

Punktacja ministerstwa: 5

[25] Izabella Woszczycka-Korczyńska, Joanna Lewin-Kowalik, Dariusz Górka, Edyta Olakowska. Neurotrofiny w biologii i medycynie. Pol.Merk.Lek.2006; T.20, nr 119, s.602-605

Punktacja ministerstwa: 6

Obecnie w Zakładzie Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego Katedry Fizjoterapii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, którego kierownikiem jestem od 2013 roku, prowadzimy następujące badania:

- Ocena wpływu apoptozy oraz treningu lokomotorycznego o zróżnicowanym natężeniu na proces regeneracji w obwodowym układzie nerwowym u myszy z knockout'em genu bcl-2.
- Ocena wpływu terapii hiperbarycznej na proces regeneracji komórek w obwodowym układzie nerwowym u szczurów.
- Ocena wpływu terapii hiperbarycznej na proces regeneracji komórek w obwodowym układzie nerwowym u myszy z knockout'em genu bcl-2 poddanych treningowi lokomotorycznemu.
- Ocena wpływu międzykolcowej stabilizacji dynamicznej DIAM na dolegliwości bólowe w lędźwiowym odcinku kręgosłupa- rola fizjoterapii.
- Ocena wpływu terapii hiperbarycznej oraz binauralnej formy nadźwiękawiania przy użyciu tonów izochronicznych na proces regeneracji nerwów obwodowych u myszy z nokautem mTORC1 genu TSC-1, TSC-2.

[26] Suszyński K, Marcol W, Górka D. Physiotherapeutic techniques used in the management of patients with peripheral nerve injuries. Neural.Regen.Res.2015; Vol.10, No.11, p.1770-1772

Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 0.968

Punktacja ministerstwa: 15

Udział w projektach badawczych:

Byłem członkiem zespołów badawczych zajmujących się następującymi projektami w ramach badań statutowych od 1996 - 2011, temat „Poszukiwanie czynników indukujących i promujących przeżywalność uszkodzonych komórek OUN” NN-4-073/96, NN-1-012/97, NN-4-013/98, KNW-64/10, KNW-1-030/P/1/0

Od czasu objęcia stanowiska Kierownika Zakładu Medycyny Sportowej i Fizjologii Wysiłku Fizycznego Katedry Fizjoterapii Wydziału Nauk o Zdrowiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach kieruję lub jestem uczestnikiem następujących badań statutowych: KNW-2-028/N/7/N, KNW-1-138/N/8/0, KNW-2-061/D/7/N, KNW-2-016/N/6/N, KNW-1-109/N/6/O

Działalność dydaktyczna

Jestem promotorem pomocniczym (na etapie wszczęcia) w 2 przewodach doktorskich na Wydziale Nauk o Zdrowiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Byłem promotorem 56 oraz recenzentem 11 prac magisterskich napisanych przez studentów kierunku Fizjoterapia Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (informacje w „Wykazie opublikowanych prac naukowych.”).

