

Załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

AUTOREFERAT

dr Joanna Sylwia Wessely-Szponder

Zakład Patofizjologii
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 2017

1. Imię i Nazwisko.

Joanna Sylwia Wessely-Szponder

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

- stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, specjalność – patofizjologia weterynaryjna, nadany uchwałą Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie w dniu 26 stycznia 2006 roku; tytuł rozprawy doktorskiej: „*Udział cytokin w destrukcyjnej odpowiedzi neutrofili w przebiegu zespołu oddechowego u jałówek.*”

(promotor prof. dr hab. Ryszard Bobowiec, recenzenci: prof. dr hab. Stanisław Graczyk, prof. dr hab. Andrzej Wernicki)

- tytuł: lekarz weterynarii (dyplom lekarza weterynarii nr 22805 z dnia 21 kwietnia 1993 roku wydany przez Akademię Rolniczą w Lublinie)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

Od 2006 roku do dnia dzisiejszego: Zakład Patofizjologii Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie (do 2008 roku Akademia Rolnicza w Lublinie); adiunkt

Od 2003 Zakład Patofizjologii Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie; asystent

Od 1994 Katedra Patofizjologii Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie; asystent

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.):

a) osiągnięciem naukowym jest tematyczny cykl publikacji objęty tytułem: Neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (NPP), właściwości, interakcje z neutrofilami i makrofagami, potencjalne zastosowania ekstraktu neutrofilowego we wspomaganiu procesów gojenia.

b) publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

1. **Wessely-Szponder J.,** Majer-Dziedzic B., Smolira A. 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. Journal of Microbiological Methods 83, 8-12. IF(2010):2,018, punkty MNiSW(2010):27.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu materiału, wyizolowaniu peptydów i przygotowaniu ich do dalszych oznaczeń oraz analizie otrzymanych wyników, opracowaniu wyników i ich interpretacji, a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 80%.

2. **Wessely-Szponder J.,** Bobowiec R., Szponder T. 2012. The influence of porcine prophenin on neutrophils isolated from rabbit blood during implantation of calcium sulphate graft material into bone tissue. World Rabbit Science 20, No 3, 163-172, IF(2012):0,62, punkty MNiSW(2012):25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wyizolowaniu peptydów, przeprowadzeniu badań na hodowlach neutrofilowych oraz analizie otrzymanych wyników, opracowaniu wyników i ich interpretacji, a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 90%.

3. **Wessely-Szponder J.,** Szponder T., Bobowiec R., Smolira A. 2013. The influence of porcine cathelicidins on neutrophils isolated from rabbits in the course of bone graft implantation. World Rabbit Science 21, 175-183, IF(2013):0,86, punkty MNiSW(2013):25.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, wyizolowaniu peptydów, przeprowadzeniu badań na hodowlach neutrofilowych oraz

analizie otrzymanych wyników, opracowaniu wyników i ich interpretacji, a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 85%.

4. Smolira A., **Wessely-Szponder J.** 2015. Importance of the matrix and the matrix/sample ratio in MALDI-TOF-MS analysis of cathelicidins obtained from porcine neutrophils. Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology 175, 2050-65. IF(2015):1,606, punkty MNiSW(2015):20.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu materiału biologicznego, z którego wyizolowałam peptydy i przygotowałam je do badań techniką MALDI TOF oraz analizie i interpretacji otrzymanych wyników w części dotyczącej peptydów pozyskanych z próbek biologicznych. Mój udział szacuję na 10%.

5. **Wessely-Szponder J.**, Smolira A. 2015. Response of antimicrobial peptides from porcine neutrophils to pentoxifylline and antigens from Gram negative and Gram positive bacteria. Research in Veterinary Science 104, 160–165, IF(2015): 1,298 punkty MNiSW(2016):35.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, pozyskaniu materiału, przeprowadzeniu badań na hodowlach neutrofilowych oraz analizie otrzymanych wyników, opracowaniu wyników i ich interpretacji, a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 90%.

6. **Wessely-Szponder J.**, Szponder T., Bobowiec R. 2017. Different activation of monocyte-derived macrophages by antimicrobial peptides at a titanium tibial implantation in rabbits. Research in Veterinary Science 115, 201-210, IF(2015): 1,298 punkty MNiSW(2015):35.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, izolacji ekstraktu neutrofilowego, przeprowadzeniu badań na hodowlach makrofagów oraz analizie otrzymanych wyników, opracowaniu wyników i ich interpretacji, a także przygotowaniu tekstu manuskryptu (autor korespondencyjny). Mój udział szacuję na 90%.

Łączna punktacja prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji:

- według listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **167 pkt.**

- łączny *impact factor* według listy JCR: **7,7**

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

Moim głównym obszarem zainteresowań są neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe (NPP) u różnych gatunków zwierząt. Znajdują one zastosowanie jako komponent krwiopochodnych preparatów, w szczególności ekstraktu neutrofilowego, użytecznego w zwalczaniu drobnoustrojów i kontrolowaniu intensywności procesu zapalnego z uwzględnieniem wspomagania wzrostu kostnego.

Neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe są ważnym i efektywnym składnikiem wrodzonej odporności i równocześnie alternatywą dla konwencjonalnych antybiotyków (Hancock i Sahl, 2006). Większość antybakteryjnych peptydów cechują małe rozmiary (12-50 aminokwasów), ładunek kationowy (za który odpowiadają reszty argininowe i lizynowe), umożliwiające interakcje z błonami drobnoustrojów oraz amfipatyczna natura (Agieri *wsp.* 2015, Bowdish *i wsp.*, 2005, Zanetti 2004). U ssaków na podstawie różnic w budowie, właściwości antybakteryjnych i oddziaływań na komórki organizmu gospodarza wyodrębniono trzy główne grupy NPP: defensyny, katelicydyny i histatyny.

Defensyny są kationowymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi wykazującymi również działanie immunomodulujące. Oprócz neutrofilowych są też one wytwarzane przez monocyty i makrofagi, keratynocyty lub komórki nabłonka układu oddechowego, pokarmowego, moczowego i reprodukcyjnego, w komórkach Panetha, skórze i błonach śluzowych (Brandenburg *i wsp.*, 2012).

Drugą grupę stanowią katelicydyny, które w formie prekursorowej składają się z N-końcowego peptydu, domeny katelinowej o stałej powtarzalnej sekwencji oraz zróżnicowanej C-końcowej sekwencji, odpowiedzialnej za jej właściwości i unikalnej dla danego peptydu. Katelicydyny wykryto u ludzi i wielu gatunków zwierząt: bydła, małąp, myszy, szczurów, królików, świnek morskich, świń, owiec, kóz, koni i psów. Konie, bydło, świnię, owce, kozy,

króliki należą do gatunków „polikatelicydynowych”, posiadających różne geny kodujące różne katelicydyny. Z kolei ludzie, małpy, psy, myszy, szczury posiadają pojedynczy gen katelicydyny.

Katelicydyny jako peptydy przeciwdrobnoustrojowe pełnią rolę ochronną w zakażeniach wywołanych przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie, grzyby i wirusy osłonkowe oraz przez inwazje pasożytnicze. Ze względu na strukturę katelicydyny podzielono na cztery rodzaje: peptydy linearne o budowie alfa-helikalnej, peptydy bogate w niektóre aminokwasy (argininę, glicynę, histydynę, prolinę, tryptofan), peptydy o strukturze pętli i peptydy beta-płaszczynowe (McPhee i wsp., 2005, Ramanathan i wsp., 2002). Katelicydyny w formie aktywnej są niskocząsteczkowymi kationowymi peptydami, zbudowanymi z 20 do 60 aminokwasów w zależności od gatunku i magazynowanymi w neutrofilowych ziarnistościach wtórnych (Ramanathan i wsp., 2002). Syntetyzowane są w formie pre-pro-peptydów, gdzie sekwencja sygnałowa jest zbudowana z 29-30 reszt aminokwasowych, sekwencja katelinowa, powtarzalna u wszystkich gatunków, jest fragmentem peptydowym o masie cząsteczkowej ok. 11 kDa (98-114 reszt aminokwasowych), natomiast zmienna jest sekwencja C-końcowa zbudowana z 12-100 reszt aminokwasowych, stanowiąca aktywny peptyd wyodrębniony w wyniku działania proteaz. Katelicydyny są magazynowane w ziarnistościach wtórnych neutrofilii w postaci nieaktywnych propeptydów. Ekspresja dojrzałych (biologicznie aktywnych) postaci katelicydyn może być konstytutywna lub indukowana i zależy od gatunku, rodzaju tkanki i rodzaju egzogennych stymulatorów, takich jak: produkty bakteryjne, urazy, czynniki zapalne (Brown i Hancock, 2001, Agier i wsp., 2015). Aktywacji ulegają one w wyniku odszczepienia najpierw N-końcowego peptydu sygnałowego, a następnie fragmentu katelinowego od C-końcowego fragmentu zmiennego, stanowiącego dojrzały aktywny peptyd. Odszczepienie to odbywa się z udziałem endogennych proteaz serynowych; u ludzi proteinazy 3, u świń elastazy, magazynowanej w ziarnistościach pierwotnych. Powstające jako końcowy produkt aktywne katelicydyny, jako peptydy antybakteryjne mają istotne znaczenie nie tylko w zwalczaniu drobnoustrojów, ale również w regulowaniu obronnych reakcji organizmu (Ramanathan i wsp. 2002, Sang i Blecha, 2009).

Trzecia grupa NPP to niewielkie kationowe peptydy- histatyny, występujące u naczelnych, wytwarzane i wydzielane przez ślinianki, uczestniczące w utrzymaniu

odporności jamy ustnej oraz wykazujące silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze (Brandenburg i wsp., 2012).

Wobec nasilającego się zjawiska oporności drobnoustrojów na konwencjonalne antybiotyki, na podstawie dyrektywy unijnej, zalecane jest ograniczenie antybiotykoterapii jako postępowania leczniczego (Anon.). Stąd wynika rosnące zainteresowanie alternatywnym sposobem zwalczania infekcji, w tym również peptydami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (Anderson i wsp., 2004). Oparte na nich leki zostały wprowadzone do lecznictwa w zwalczaniu trudno gojących się zakażeń np. syntetyczny analog protegryn Isegran (IB 367) w zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń jamy ustnej u pacjentów z niedoborami odporności spowodowanymi transplantacją lub wysokimi dawkami chemioterapii, Pexiganan w postępowaniu przy stopie cukrzycowej, Omiganan jako środek do zwalczania miejscowych zakażeń (Eland i wsp., 2012). Szersze wprowadzenie ich do terapii okazało się trudne, ze względu na skomplikowany proces produkcji i cytotoksyczność, stąd głównie znajdują miejscowe zastosowanie. Okazało się jednak, że oprócz doskonale znanej aktywności antybakteryjnej, NPP wykazują również działanie immunomodulujące, regulując przebieg i stopień nasilenia reakcji zapalnej. Pomimo istotności tego odkrycia odpowiedzialne mechanizmy nie zostały dotychczas szczegółowo wyjaśnione i opisane. Wiadomo, że NPP modyfikują ekspresję cytokin pro- i przeciwzapalnych modulując w ten sposób odpowiedź immunologiczną organizmu. Regulują one równowagę pomiędzy indukcją zapalenia i wygaszaniem reakcji zapalnej zapobiegając w ten sposób uszkadzającym działaniom nadmiernie nasilonej odpowiedzi zapalnej leżącej u podłoża wielu chorób i stanów patologicznych, m in. w postaci wstrząsu septycznego. Są to więc działania zarówno prozapalne i przeciwzapalne, w zależności od stanu klinicznego i aktualnych potrzeb organizmu (Brown i Hancock, 2006). Immunomodulacja polega między innymi na modyfikowaniu ekspresji genów w monocytach i komórkach nabłonkowych, działaniu chemotaktycznym, indukowaniu odpowiedzi w postaci uwalniania chemoatraktantów oraz wzmaganiu angiogenezy i gojenia się ran. Poszerzając aspekt udziału katelicydyn w procesach naprawczych Kittaka i wsp. podjęli próbę zastosowania ludzkiej katelicydyny LL-37 we wspomaganie wzrostu kostnego, na bazie potwierdzonego działania proangiogenicznego i osteoindukcyjnego. Katelicydyna ta wspomagając angiogenezę w miejscach ubytku kostnego indukuje regenerację kości, co może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób

zwyrodnieniowych kości w połączeniu ze znanym już oddziaływaniem bójącym na szerokie spektrum drobnoustrojów (Kittaka i wsp. 2013).

Pomimo powyższych uwarunkowań, stanowiących o potencjale dla wspomagania zrostu kostnego, dotychczas wpływ katelicydyn na aktywność wydzielniczą neutrofilii, jako kluczowych komórek w początkowej fazie reakcji zapalnej, a także monocytów i makrofagów o istotnym znaczeniu w procesach naprawczych i z możliwością sterowania ich funkcją (Leor i wsp., 2006) nie został szczegółowo wyjaśniony. Podstawę takich badań stanowią naturalnie pozyskiwane peptydy, a nie ich syntetyczne analogi. Dla szczegółowej analizy składu peptydowego otrzymanych próbek u gatunków polikatelicydynowych konieczne więc było opracowanie szybkiej, powtarzalnej, niedrogiej metody izolacji dużej ilości naturalnie pozyskiwanych peptydów z krwi (świń), a także wysokowydajnej metody izolacji u gatunków gdzie do dyspozycji mamy niewielką jej ilość (królików). Z kolei do identyfikacji i oceny struktury wyizolowanych peptydów najbardziej przydatna okazała się metoda MALDI TOF, szybka, wiarygodna i zapewniająca powtarzalność wyników, umożliwia ona detekcję zarówno aktywnych dojrzałych peptydów, jak i ich prekursorów oraz fragmentów o zmiennej aktywności (Hortin, 2006).

Kolejnym krokiem było maksymalne poprawienie wydajności i czułości metody detekcji peptydów z użyciem spektrometrii masowej, poprzez odpowiedni dobór wśród dostępnych matryc i proporcji matryca/próbka. Stąd pojawiła się konieczność takiego udoskonalenia tej metody, aby była ona przydatna nie tylko dla oceny peptydów antybakteryjnych, ale wszelkich niskocząsteczkowych peptydów pozyskiwanych z krwi i innego materiału pochodzenia biologicznego, które w medycynie, w tym weterynaryjnej pełnią funkcje markerów (Hortin, 2006).

Dysponując metodą izolacji i detekcji naturalnych NPP przystąpiłam do badania ich właściwości ze szczególnym uwzględnieniem interakcji zachodzących pomiędzy NPP a neutrofilami i makrofagami. Szczególnie skupiłam się na odpowiedzi neutrofilowej na stymulacje pro- i przeciwzapalne, a także na odpowiedzi monocytów i makrofagów na NPP w przebiegu implantacji biomateriałów do tkanki kostnej. W tym celu na początkowym etapie projektu badawczego założyłam i oceniłam hodowle neutrofilii, co pozwoliło mi poznać odpowiedzi sekrecyjne na zastosowane stymulatory, a także oznaczyć cytotoksyczność i wpływ na apoptozę oraz ocenić ekspresję katelicydyn uwalnianych z neutrofilii pod działaniem bodźców pro i przeciwzapalnych. Kolejnym etapem było rozszerzenie badań na

makrofagi i ocena aktywności tych komórek układu białokrwinkowego i ich odpowiedzi na stymulację katelicydynami w warunkach implantacji biomateriału.

Celem badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego było:

Opracowanie dla gatunków polikatelicydynowych metody izolacji aktywnych postaci katelicydyn z ekstraktu neutrofilowego i hodowli komórkowych, opracowanie metody ich identyfikacji i oceny ich właściwości bakteriobójczych i cytotoksycznych na przykładzie neutrofilii świń, a następnie dostosowanie metody pozyskiwania ekstraktów neutrofilowych od różnych gatunków zwierząt.

Wdrożenie i optymalizacja metody identyfikacji peptydów w próbkach biologicznych za pomocą spektrometrii mas MALDI TOF.

Zbadanie wpływu poszczególnych katelicydyn i ekstraktu neutrofilowego na wybrane komórki zapalne w procesie implantacji biomateriału do ubytku kostnego.

Analiza ekspresji katelicydyn *in vitro* w wyniku stymulacji pro – i przeciwzapalnej hodowli komórkowej neutrofilii świń.

Opracowanie metody izolacji katelicydyn z neutrofilii świń i ich identyfikacji oraz ocena ich właściwości antybakteryjnych

Świnie są ssakami o najbardziej różnorodnym zestawie katelicydyn, równocześnie u tego gatunku nie występują defensyny neutrofilowe, katelicydyny są więc jedynymi NPP obecnymi w neutrofilach. U świń wykryto następujące neutrofilowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe: bogate w prolinę i fenylenoalaninę profeniny PF 1 i 2; peptyd PR-39 i protegryny 1 do 5 (PG1-5) oraz peptydy mieloidalne (PMAP-23, PMAP-36, PMAP-37). (Sang i Blecha). Gatunek ten jest używany w modelach doświadczalnych wielu chorób, a NPP od świń i ich syntetyczne analogi były już wcześniej badane w kierunku potencjalnych zastosowań terapeutycznych, koncentrowano się jednak głównie na aspekcie przeciwdrobnoustrojowym w ich właściwościach (Hancock i Sahl). W tym znaczeniu

syntetyczne analogi peptydów świń nie znalazły szerszego zastosowania, natomiast szczegółowa wiedza o naturalnie otrzymywanych dojrzałych peptydach i aktywności ich fragmentów stanowić będzie podstawę zastosowań terapeutycznych, gdyż wszystkie składniki występujące w ekstrakcie mogą mieć większe znaczenie w reakcjach immunologicznych niż bakteriobójczych.

Celem pracy było opracowanie sposobu izolacji poszczególnych neutrofilowych katelicyn z krwi świń, a następnie metody ich identyfikacji i ocena ich właściwości bójczych oraz cytotoksyczności dla komórek ssaków. Powyższe peptydy wyizolowałam z neutrofilów z krwi świń, a pierwszym etapem było otrzymanie surowego ekstraktu neutrofilowego, który następnie rozdzieliłam na poszczególne frakcje za pomocą chromatografii żelowej ze względu na ich masę cząsteczkową, metodą umożliwiającą równoczesne izolowanie peptydów PF, PR-39 i PG zarówno do celów badawczych, jak i zastosowania terapeutycznego.

Potwierdzeniem skuteczności metody była analiza otrzymanych próbek za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Otrzymane frakcje zbadano następnie pod względem bakteriobójczości na szczepach *E. coli* (ATCC 25922). Po przeprowadzeniu analizy aktywności antybakteryjnej frakcji rozdzielonych z ekstraktu, frakcje aktywne poddano analizie spektrometrem masowym MALDI-TOF. Umożliwiła ona identyfikację w poszczególnych badanych frakcjach następujących katelicyn: Profeniny 1 i 2 o masach cząsteczkowych 8683 Da i 8807 Da, wykazujących aktywność przeciwko *E. coli* w stężeniu 20 µg/ml, katelicyny PR-39 o masie cząsteczkowej 4716 Da i aktywności przeciwbakteryjnej w stężeniu 20 µg/ml oraz protegryn 1-3 o masach odpowiednio 2154,5 Da, 1955,6 Da i 2055,5 Da i stwierdzonej aktywności przeciwbakteryjnej na poziomie stężenia 10 µg/ml. Metoda izolacji peptydów z ekstraktu neutrofilowego połączona z detekcją otrzymanych produktów metodą MALDI TOF pozwoliła na wykrycie wszystkich obecnych w ekstrakcie postaci peptydów, które następnie za pomocą bazy danych UniProt database (www.uniprot.org), rozpoznałam jako katelicyny świń i opisałam. W dodatkowo przeprowadzonych badaniach w kierunku cytotoksyczności dla komórek ssaków nie zaobserwowano zmian morfologicznych ani procesów wskazujących na degenerację kultur tkankowych FLF-3 ani hepatocytów szczurzych podczas dziesięciodniowej obserwacji w stężeniach do 20 µg/ml dla profenin i PR-39 i 10 µg/ml dla protegryn.

Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność wprowadzonej metody izolacji peptydów, będącej modyfikacją metody Anderson i wsp. dla izolacji i identyfikacji katelicydyn u innego polikatelicydynowego gatunku- owcy domowej i metody zastosowanej przez Treffers i wsp. do izolacji i identyfikacji katelicydyn sarny. Wskazałam również na przydatność metody MALDI TOF do identyfikacji peptydów za pomocą masy cząsteczkowej w mieszaninie pochodzącej z ekstraktu neutrofilowego, wstępnie rozdzielonej za pomocą chromatografii żelowej.

Ze względu na szeroką dostępność krwi świń, która jest odpadem rzeźnianym, izolacja i otrzymywanie peptydów antybakteryjnych z tego produktu stanowi pole do rozwoju zastosowań terapeutycznych (Yu i wsp., 2010). Dzięki opracowanej przeze mnie metodzie izolacji ekstraktu peptydów antybakteryjnych możliwe były wszelkie dalsze badania ich składu, właściwości i potencjału dla zastosowań terapeutycznych. Uzyskane wyniki stanowiły także podstawę kolejnych badań m. in. nad udoskonaleniem techniki MALDI TOF dla oceny peptydów i jej zastosowań do ilościowych oznaczeń peptydów w próbce biologicznej (Smolira i wsp., 2015). Chodziło również o rozszerzenie jej użycia na inne gatunki polikatelicydynowe, a także na inne próbki biologiczne tj. hodowle komórkowe, osocze krwi, koncentraty płytek krwi.

Osiągnięte wyniki zostały opublikowane w pracy: **Wessely-Szponder J.**, Majer-Dziedzic B., Smolira A. 2010. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils. *Journal of Microbiological Methods* 83, 8-12.

Powyzsza praca i jej wyniki stanowiły bazę wyjściową do dalszych badań.

Opracowanie udoskonalonej metody identyfikacji niskocząsteczkowych peptydów antybakteryjnych z użyciem spektrometrii mas MALDI TOF

Detekcja niskocząsteczkowych kationowych peptydów w próbkach biologicznych poddawanych tylko wstępnemu oczyszczeniu napotyka szereg trudności. Peptydy o masie mniejszej niż 7000 Da trudno uwidocznic za pomocą innych technik, np. znajdują się poza zakresem rozdziału dwukierunkowej elektroforezy. Dlatego też metoda MALDI TOF wydaje się być obiecującą w identyfikacji peptydów niskocząsteczkowych (w zakresie masowym 1000-7000 Da) w próbkach biologicznych szczególnie w izolatach z krwi, tkanek i hodowli komórkowych (Hortin, 2006). Opracowana metoda pozwala na identyfikację poszczególnych

peptydów w mieszaninie biologicznej po wstępnym rozdziale bez szczegółowej separacji, jak to jest konieczne przy innych metodach, stwarza szerokie możliwości jej praktycznego zastosowania, szczególnie przy ocenie zawartości pozyskiwanych preparatów krwiopochodnych u różnych gatunków, w sytuacji gdy analizy serologiczne wymagają stosowania specyficznych monoklonalnych przeciwciał. Ponadto metoda ta jest bardzo czuła, a w wielu przypadkach pozyskiwania materiału od zwierząt laboratoryjnych mamy do czynienia z niewielką ilością otrzymanego materiału (Gruszecka i wsp., 2008).

Jednakże pomimo oczywistych zalet metoda ta ma szereg ograniczeń. Limity detekcji są uzależnione od szeregu czynników, dla małych peptydów w optymalnych warunkach limit detekcji wynosi 1 nmol/l w 1 μ l. Właśnie z powodu niewielkich stężeń i małych objętościowo próbek pozyskiwanych np. od zwierząt laboratoryjnych wyzwaniem było maksymalne zwiększenie detekcji, aby tę bardzo czułą metodę można było wykorzystać również w zastosowaniach weterynaryjnych i medycznych. Stąd, jako osobie zainteresowanej poznaniem szczegółowego składu pozyskiwanych próbek ekstraktu neutrofilowego, nasunął mi się pomysł optymalizacji warunków preparatyki próbki oraz jej detekcji.

Do dalszych badań zainspirował mnie zwłaszcza fakt, że przy użyciu metody MALDI do detekcji kluczowe znaczenie ma właściwe początkowe przygotowanie próbki biologicznej do dalszej analizy. Podczas wstępnego etapu badań okazało się, że szczególnie ważny jest właściwy dobór matrycy, a także proporcji pomiędzy ilością matrycy i wielkością próbki, rozumianej jako zawarte w niej stężenie peptydów. Ze względu na to, że w tym wieloetapowym procesie na każdym etapie potrzebna jest optymalizacja, wymagana jest ścisła współpraca i komunikacja patofizjologa z fizykiem. Praca wykonana została we współpracy z Zakładem Spektrometrii Mas Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej. Dotyczy ona badań nad optymalizacją preparatyki próbki liofilizatu ekstraktu neutrofilowego, z zawartymi w niej NPP z neutrofilii świń (PR-39, PG1, PG2, PG3, PF2), do pomiaru metodą MALDI. Mój udział w pracy obejmował wyodrębnienie gatunku zwierzęcia, na którym przeprowadzimy badania, pozyskanie materiału, wyizolowanie katelicydyn i przygotowanie liofilizowanych próbek, zawierających odpowiednie porcje peptydów do analizy, identyfikację peptydów na podstawie otrzymanych mas cząsteczkowych, interpretację i ocenę wyników w celu dobrania optymalnych metod pomiaru. Do badań użyłam liofilizatu z ekstraktu neutrofilowego, przygotowanego przeze mnie na bazie opracowanej wcześniej metody, jako reprezentatywnej wieloskładnikowej aktywnej próbki

biologicznej, w której analiza składników oprócz walorów poznawczych, równocześnie odzwierciedla wszelkie napotkane problemy, które należy rozwiązać dla celów metodycznych.

Analizie poddano przydatność kilku matryc z kwasów aromatycznych pod kątem uzyskania maksymalnej czułości detekcji badanych katelicydyn. Określono również wpływ ilości matrycy użytej do pomiaru na wynik eksperymentu. Wyznacznikiem optymalnej ilości matrycy była maksymalna intensywność wierzchołka masowego pochodzącego od danej katelicydyny. W wykonywanych oznaczeniach wstępne badania na syntetycznym peptydzie potwierdziły, że optymalną matrycą jest kwas α -cyjano 4-hydroksycynamonowy (CCA), kolejne analizy były już przeprowadzane z użyciem przygotowanych przez mnie próbek biologicznych z ekstraktu neutrofilowego, zawierających peptydy antybakteryjne naturalnego pochodzenia. Badania wykazały, że proporcja próbka/matryca jest kluczowa dla sprawnej detekcji. Nieprawidłowa ilość matrycy skutkuje niemożnością detekcji wszystkich spodziewanych peptydów w badanym preparacie albo przeciwnie zarejestrowaniem nieprawidłowego odczytu, powiększonego o zbyt wielką ilość dodatkowych wierzchołków.

Jest to nowatorska praca, która miała na celu opracowanie przydatnej metodyki do wykorzystania w jakościowej ocenie próbek biologicznych (np. osocza) pod kątem zawartości w nich różnych rodzajów katelicydyn. Umożliwia ona szybkie i dokładne zanalizowanie badanej próbki biologicznej w kierunku zawartości różnych katelicydyn z użyciem nowoczesnego sprzętu i opracowanej przez nas specjalnie na te potrzeby procedury. Znajduje ona zastosowanie we wszystkich tych przypadkach, kiedy nie można korzystać ze standardowych komercyjnych płytek do gotowych analiz. Pomimo faktu, że małe masy cząsteczkowe analizowanych peptydów stanowią przeszkodę dla innych metod detekcji, dotychczasowa bibliografia dotycząca oceny próbek biologicznych w kierunku zawartości w nich peptydów antybakteryjnych z zastosowaniem metody MALDI TOF MS jest bardzo uboga. Dostępna literatura omawia głównie komercyjnie przygotowane próbki o optymalnej dla pomiarów zawartości składników, tak więc zaprezentowana przez nas praca stanowi znaczące osiągnięcie w tej dziedzinie, a uzyskane wyniki zostały opisane w artykule: Smolira A., **Wessely-Szponder J.** 2015. Importance of the matrix and the matrix/sample ratio in MALDI-TOF-MS analysis of cathelicidins obtained from porcine neutrophils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175 (4), 2050-65.

Wpływ ekstraktu neutrofilowego i katelicydyn izolowanych z neutrofile na komórki zapalne-neutrofile i makrofagi z krwi królików podczas implantacji biomateriału do ubytku kostnego

W ciągu kilku godzin od wystąpienia urazu krążące leukocyty osiągają miejsce uszkodzenia i zaczynają współuczestniczyć w reakcji obronnej organizmu. Szczególne znaczenie w procesach gojenia mają neutrofile i makrofagi, które w początkowej fazie reakcji zapalnej wystawione są na różne oddziaływania stymulatorów ze strony środowiska (Agier i wsp., 2015, Franz i wsp., 2011).

W pracy b. 3. wykonano badania nad siarczanem wapnia, jako biomateriałem kośćcozastępczym. Jest on uważany za materiał biozgodny, znany od ponad stu lat, jednakże nawet dopuszczone do obrotu implanty gipsowe mogą wywoływać niepożądane działania uboczne. Aby te działania wyeliminować, pomocne jest analizowanie interakcji z układem odpornościowym organizmu wykraczające poza standardowe oznaczenie biozgodności. Moje badania obejmowały ocenę efektu jaki wywiera implant z siarczanu wapnia na neutrofile pobrane w różnych odstępach czasu po implantacji tego biomateriału. Poszerzają więc one wiedzę o mechanizmach interakcji tego materiału z komórkami zapalnymi, którą można pozyskać oprócz tej po standardowej ocenie biozgodności implantu. Ze względu na fakt, że badanie wymaga niewielkiej ilości łatwo dostępnego materiału, którego otrzymanie nie stanowi ryzyka dla pacjenta i ze względu na duże walory poznawcze, powyższe analizy mogą być użyte jako wzbogacenie metod oceny bezpieczeństwa stosowania implantu, stanowiąc istotny czynnik w badaniach porównawczych dla implantów.

O ile odpowiedź makrofagowa na implanty *in vitro* została zbadana, o tyle neutrofile, jako komórki efektorowe nie były dotychczas szczegółowo analizowane. Ich pierwotną funkcją jest zwalczanie zagrożenia przez degranulację, wybuch tlenowy oraz fagocytozę zagrażających drobnoustrojów. Wiadomo jednak, że implantacja biomateriału generuje wczesną odpowiedź zapalną z udziałem neutrofile, która jest najbardziej nasiloną po 24 h rozwija się w ciągu 2-3 dni i ulega wygaszeniu do końca pierwszego tygodnia od zabiegu (Franz i wsp., 2011). Skutki interakcji z implantem w tym okresie okołoperacyjnym wymagają szczegółowej analizy.

Profenina 1 i 2 (Pf 1 i 2) są katelicydynami izolowanymi z neutrofile i tkanki płucnej świni. Należą do peptydów o wysokiej zawartości proliny (53%) i fenylenoalaniny (19%).

Mają działanie przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące, praktycznie nie generują one lekooporności, co jest szczególnie ważne z powodu nasilającego się zarówno w weterynarii jak i w medycynie zjawiska antybiotykooporności (Sang i Blecha, 2009). Z powyższych względów te katelicydyny mają istotne znaczenie w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych, a kolejnym celem naszych badań była analiza znaczenia izolowanych katelicydyn w komórkowej odpowiedzi zapalnej u królików w przebiegu implantacji biomateriału do ubytku kostnego w kości piszczelowej.

Królik jako sprawdzony model zwierzęcy doświadczeń ortopedycznych, infekcji ortopedycznych i wstrząsu septycznego został wybrany przeze mnie do badań wpływu profenin na aktywność obcogatunkowych neutrofilów. Badanie wykonano *in vitro* na neutrofilach izolowanych w przebiegu implantacji siarczanu wapnia. Określiłam aktywność sekrecyjną, przeżywalność i apoptozę neutrofilów króliczych stymulowanych różnymi stężeniami profenin neutrofilów świń, według opracowanej wcześniej przeze mnie modyfikacji metody pozyskiwania tych peptydów. W tym celu oceniłam uwalnianie elastazy i mieloperoksydazy (MPO), a także testem MTT (3-(4,5-dimetylo-2-tiazolyl)-2,5-difenylo-2H-tetrazolium) oszacowałam przeżywalność neutrofilów i oceniłam apoptozę pod wpływem różnych stężeń profenin pozyskanych z ekstraktu neutrofilowego.

Przeprowadzone badania dowiodły, że profeniny uzyskiwane z neutrofilów świń oprócz działania bakteriobójczego opisanego we wcześniejszej pracy b. 1., oddziałują na neutrofile królicze w przebiegu implantacji biomateriału do ubytku kostnego. Wykazują efekty immunomodulujące, których dynamika zmienia się w czasie. W neutrofilach izolowanych 30 minut po implantacji biomateriału uwalnianie elastazy zwiększyło się z $51,5 \pm 0,23$ do $57,01 \pm 0,49\%$ maksymalnego uwalniania w hodowlach stymulowanych przez profeniny w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ po 30 minutach inkubacji, podczas gdy po 24 h od implantacji największa odpowiedź była widoczna pod działaniem $20 \mu\text{g/ml}$ po 30 minutach inkubacji. Po 24 h inkubacji neutrofilów z różnymi stężeniami profenin maksymalne uwalnianie elastazy widoczne było przy stężeniu profenin $20 \mu\text{g/ml}$ czyli dwukrotnie wyższym niż po 30 minutach inkubacji, zarówno w neutrofilach izolowanych po 30 minutach, jak i po 24 h od implantacji biomateriału. Oznacza to, że na aktywność neutrofilową znacząco wpływa czas kontaktu z katelicydynami. Są one w odróżnieniu od wolnych rodników mediatorami długo utrzymującymi się w ognisku zapalnym i w gojących się ranach.

Nasilone uwalnianie elastazy ma istotne znaczenie w początkowej fazie procesu implantacji biomateriału do ubytku kostnego. Elastaza we wczesnym etapie gojenia poimplantacyjnego dostarcza wielu czynników chemotaktycznych w tym włókien kolagenowych i fragmentów włókniaka powstałych w wyniku rozszczepienia przez ten enzym większych struktur, jest więc w tym aspekcie naprawy tkanek niezbędna, stąd brak hamowania, a nawet wzrost jej początkowego uwalniania po implantacji biomateriału w odpowiedzi na stymulację profeninami stanowi pozytywny przejaw ich oddziaływań na badane komórki zapalne (Kaveh i wsp. 2010).

Uwalnianie MPO przez neutrofile zmniejszało się przy stężeniu profenin 10 $\mu\text{g/ml}$ stosowanym przez 30 minut i przez 24 godziny inkubacji w hodowlach komórek zarówno izolowanych po 30 minutach, jak i 24 h od implantacji biomateriału. Ten hamujący efekt malał przy wyższych stężeniach profenin (20 i 50 $\mu\text{g/ml}$), wskazując, że optymalna dawka nie przekracza w tym przypadku dawki terapeutycznej przeciwbakteryjnej (20 $\mu\text{g/ml}$). Ograniczenie uwalniania MPO zabezpiecza przed uszkodzeniami tkanek wywoływanymi przez nadmierną podaż tego enzymu, spowodowanymi między innymi działaniem oksydatywnym.

Badania żywotności neutrofilii poddanych *in vitro* oddziaływaniu naturalnych profenin wykazały, na podstawie aktywności mitochondrialnej spadek żywotności postępujący wraz z czasem inkubacji i wzrastającymi stężeniami profenin. Największy spadek żywotności uwidocznił się przy stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ po 24 godzinach inkubacji, wskazując, że dawka toksyczna przekracza znacząco dawkę terapeutyczną, potrzebną do wywołania efektu przeciwdrobnoustrojowego, jak też immunomodulującego. W powyższych stężeniach profeniny są *in vitro* bezpieczne dla neutrofilii.

W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że profenina w hodowlach 24 godzinnych i w wysokich stężeniach działa na neutrofile proapoptotycznie. Apoptoza jako proces, w którym komórki są fagocytowane bez uwalniania zawartości ziarnistości, jest równocześnie sposobem regulacji procesu zapalnego, zwiększenie ilości apoptotycznych komórek współuczestniczy w wygaszaniu reakcji zapalnej i zapobieganiu uszkodzeniom tkanek (Aarabiou i wsp., 2006, Agier i wsp. 2015).

Wykonane doświadczenia dostarczają wiedzy na temat odpowiedzi neutrofilii, jako komórek zapalnych na stymulację profeninami (naturalnymi peptydami antybakteryjnymi) neutrofilii królików poddanych implantacji biomateriału do ubytku kostnego i są pierwszym

opracowaniem dotyczącym łącznego wpływu implantu gipsowego i różnych stężeń profenin na neutrofile królicze w dwóch punktach czasowych po implantacji biomateriału. Zastosowane peptydy - profeniny mogą być rozważane jako preparat zapobiegający infekcjom i stymulujący komórki efektorowe odpowiedzi zapalnej w zabiegach ortopedycznych. Z powyższych względów peptydy te mogą być rozważane jako preparat do miejscowego wspomaganie zrostu kostnego podczas implantacji biomateriału.

W kolejnych badaniach, będących kontynuacją i rozszerzeniem poprzednich, celem była analiza udziału izolowanych katelicydyn: PR-39 i protegryn oraz niskocząsteczkowego ekstraktu neutrofilowego, pozyskanego z krwi świń, w komórkowej odpowiedzi zapalnej u królików w przebiegu implantacji biomateriału do ubytku kostnego.

W tym celu z krwi świń wyizolowałam peptydy antybakteryjne PR-39 i mieszaninę protegryn (1-3), oprócz tego przygotowałam z surowego ekstraktu niskocząsteczkową frakcję neutrofilową, zawierającą mieszaninę peptydów o masach od 1 do 5 kDa (jak wykazała przeprowadzona analiza z użyciem MALDI TOF), a następnie oceniłam wpływ powyższych preparatów na neutrofile królicze po implantacji siarczanu wapnia do ubytku w kości piszczelowej. Badanie *in vitro* na izolowanych neutrofilach króliczych polegało na ocenie aktywności sekrecyjnej neutrofilii stymulowanych różnymi katelicydynami pozyskanymi z neutrofilii świń. W tym celu oceniłam uwalnianie elastazy, mieloperoksydazy (MPO) i zasadowej fosfatazy (ALP), a także generowanie wolnych rodników (tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego) przez neutrofile *in vitro*. Przeprowadzone badania wykazały, że wyodrębnione katelicydiny świń (protegryny i PR-39) hamowały zarówno uwalnianie elastazy, MPO, jak i wytwarzanie wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu, podczas gdy egzogeny ekstrakt komórkowy (mieszanina peptydów) działał prozapalnie, aktywując królicze neutrofile do wzmożonej sekrecji. Najwyższa odpowiedź dała się zauważyć po 30 minutach od zabiegu implantacji biomateriału i ulegała zmniejszeniu po upływie 24 godzin.

Osiągnięte wyniki dowodzą, że katelicydiny pozyskiwane z neutrofilii świń oprócz działania bakteriobójczego wykazują efekty immunomodulujące, oddziałując na neutrofile królicze w przebiegu implantacji biomateriału do ubytku kostnego. Wyizolowane peptydy modulują i częściowo wygaszają reakcję zapalną, podczas gdy niskocząsteczkowy ekstrakt stanowiący, jak potwierdzono badaniem MALDI TOF mieszaninę powyższych działających

synergistycznie peptydów, jako czynnik prozapalny nasila odpowiedź neutrofilową, zwłaszcza w okresie bezpośrednio po implantacji biomateriału.

Podsumowanie:

Przeprowadzone przeze mnie badania naświetlają znaczenie immunologicznych reakcji komórkowych podczas stosowania NPP w procesie wbudowywania implantów kostnych (siarczanu wapnia). Zarówno zastosowane izolowane peptydy (profeniny, PR-39 i protegryny), jak i ekstrakt neutrofilowy mogą być rozważane jako preparaty zapobiegające infekcjom i stymulujące komórki efektorowe do odpowiedzi zapalnej w zabiegach ortopedycznych. Należy mieć na uwadze, że o ile wyizolowane peptydy wygaszają reakcję zapalną, tłumiąc jej niepożądane przejawy, o tyle egzogenny ekstrakt neutrofilowy działa nie tylko bakteriobójczo, ale też prozapalnie, zapobiegając ewentualnym zakażeniom śródoperacyjnym.

Wyniki opublikowano w pracach:

Wessely-Szponder J., Bobowiec R., Szponder T. 2012. The influence of porcine prophenin on neutrophils isolated from rabbit blood during implantation of calcium sulphate graft material into bone tissue *World Rabbit Science* 20, No 3, 163-172.

Wessely-Szponder J., Szponder T., Bobowiec R., Smolira A. 2013. The influence of porcine cathelicidins on neutrophils isolated from rabbits in the course of bone graft implantation. *World Rabbit Science* 21, 175-183.

W odpowiedzi organizmu na implanty, wzbudzające „reakcję ciała obcego” (FBR), szczególnie istotną rolę odgrywają monocyty i wywodzące się od nich makrofagi tkankowe, ważne w procesach regeneracji, naprawy i remodelowania licznych tkanek. Jednakże przedłużające się lub zbyt nasilone procesy zapalne, skutkujące nadmierną akumulacją i aktywnością makrofagów, przyczyniają się do destrukcji tkanek (Agier i wsp. 2015). Dwutorowe działanie makrofagów związane z odpowiedzią na bodźce napływające ze środowiska, skutkuje przekierowaniem makrofagów do subpopulacji albo pro albo przeciwzapalnej (Das i wsp., 2015, Novak i Koh, 2013).

Tytanowe implanty są szeroko stosowane w implantologii stomatologicznej, trwają również badania nad modyfikacją ich powierzchni w celu uzyskania właściwości

antybakteryjnych i zapobiegania zakażeniom okołoinplantacyjnym. Wcześniej prowadzone były wprawdzie prace nad modyfikacją odpowiedzi makrofagowej w kontakcie z powierzchnią implantu, która może przyczyniać się do polaryzacji makrofagów, były to jednak badania *in vitro* (Ma i wsp., 2014, Moura i wsp. 2014). Ja natomiast zainteresowałam się problemem możliwego oddziaływania implantu tytanowego na krążące we krwi monocyty, z uwzględnieniem ich przyszłej modyfikacji do makrofagów m. in. w warunkach stymulacji ekstraktem neutrofilowym.

Celem badań była ocena wpływu ekstraktu antybakteryjnego pozyskanego z neutrofilii króliczych na makrofagi podczas implantacji tytanu do ubytku kostnego w kości piszczelowej królika. Makrofagi pochodzące z monocytów izolowanych z krwi królików poddałam wstępnej stymulacji prozapalnej z użyciem lipopolisacharydu (LPS w stężeniu 1 µg/ml) dla uzyskania subpopulacji M1 o właściwościach bójczych i prozapalnych albo stymulacji deksametazonem w ilości 100 nM aby pozyskać populację M2c o właściwościach naprawczych i wspomagających zrost kostny. Następnie do tak stymulowanych subpopulacji dodałam króliczy ekstrakt neutrofilowy i oceniłam zmiany morfologiczne oraz aktywność makrofagów na podstawie wytwarzania tlenu azotu i anionu nadtlenkowego, jako wskaźników aktywności prozapalnej oraz aktywność proteaz i arginazy, jako wskaźników fenotypu naprawczego, świadczącego o wygaszeniu działania prozapalnego.

Uzyskane wyniki wskazują, że ekstrakt neutrofilowy wykazuje zróżnicowane wielokierunkowe działanie, które może być rozpatrywane zarówno jako pro- jak i przeciwzapalne. W fazie zapalnej procesu naprawczego wzrost wytwarzania tlenu azotu jest ważny w zwalczaniu zakażenia, podobnie jak pozostałe formy działania przeciwdrobnoustrojowego. Natomiast w późniejszych fazach wygaszenie reakcji zapalnej wpływa korzystnie na proces gojenia. Również zmniejszenie wytwarzania anionu nadtlenkowego i uwalniania proteaz ma korzystny wpływ. Ponieważ aktywność arginazy nie uległa istotnym zmianom podczas stymulacji ekstraktem neutrofilowym, nie zaburza to znacząco tego elementu procesu gojenia.

Odpowiedź makrofagów możemy w pewnym zakresie modyfikować przez dodanie ekstraktu neutrofilowego, sterując procesem gojenia. Inni autorzy (Ma i wsp., 2014) uzyskali pewną polaryzację makrofagów za pomocą oddziaływania powierzchniowego implantu. Moje badania polegające na stymulacji makrofagów ekstraktem neutrofilowym stanowią oryginalne własne podejście, dotychczas nie rozpatrywane w odniesieniu do wzmagania procesu gojenia

w miejscu wprowadzanego implantu. Wykazałam, że wcześniejszy kontakt z tytanowym implantem nie wpływa na odpowiedź makrofagową w porównaniu do makrofagów królików przed implantacją. Uzyskane wyniki przedstawiono w pracy: **Wessely-Szponder J.**, Szponder T., Bobowiec R. 2017. Different activation of monocyte-derived macrophages by antimicrobial peptides at a titanium tibial implantation in rabbits. *Research in Veterinary Science* 115, 201-210.

Analiza ekspresji katelicydyn po stymulacji pro – i przeciwzapalnej hodowli neutrofilii izolowanych z krwi świń

Opracowana metoda izolacji katelicydyn z neutrofilii z krwi znalazła zastosowanie w pozyskiwaniu katelicydyn z hodowli komórkowej neutrofilii poddanych stymulacji pro i przeciwzapalnej. Opierając się na wcześniej wypracowanej metodyce dysponowałam układem doświadczalnym pozwalającym na izolację badanych katelicydyn z hodowli komórkowych. Na tej podstawie oceniłam wpływ pentoksyfiliny (PTX), jako preparatu ograniczającego odpowiedź prozapalną neutrofilii na uwalnianie przez nie dojrzałych, aktywnych postaci katelicydyn u świń.

Neutrofile są jednym z głównych składników obrony organizmu przeciwko drobnoustrojom. Wytwarzane przez nie peptydy przeciwdrobnoustrojowe - katelicydyny wykazują właściwości bójcze w stosunku do szerokiego spektrum mikroorganizmów, ponadto odgrywają istotną rolę w procesach gojenia się tkanek, a także oddziałują na neutrofile, makrofagi i komórki podścieliska, co pozwala zwalczać infekcję i promować procesy naprawy. Z drugiej jednak strony neutrofile stanowią istotny czynnik w przebiegu uszkodzeń tkanek w procesach zapalnych. Nadmierna aktywność tych komórek zapalnych, skutkująca uwalnianiem enzymów i wolnych rodników degradujących macierz zewnątrzkomórkową, leży u podłoża wielu zaburzeń chorobowych (Deree i wsp., 2006).

Katelicydyny są magazynowane w ziarnistościach wtórnych neutrofilii w postaci nieaktywnych propeptydów. Aktywacji ulegają one w wyniku odszczepienia najpierw N-końcowego peptydu sygnałowego, a następnie fragmentu katelinowego od C-końcowego fragmentu zmiennego stanowiącego dojrzały aktywny peptyd. Odszczepienie to odbywa się z udziałem endogennych proteaz serynowych, u świń jest to elastaza, magazynowana w

ziarnistościach pierwotnych (Cole i wsp., 2001). Tak więc aktywność tych katelicydyn, jak stwierdzono w badaniach Scapielloi wsp. warunkowana jest obecnością elastazy.

Celem pracy była ocena wykorzystania pentoksyfiliny, jako czynnika, który może hamować niektóre funkcje neutrofilów, zapobiegając uszkodzeniom tkanek podczas nadmiernej aktywności tych komórek w przebiegu reakcji zapalnej. PTX jako pochodna metyloksantyny jest niespecyficznym inhibitorem fosfodiesterazy, zmniejsza aktywność TNF α i innych mediatorów prozapalnych i jako taka ogranicza nadmierną niepożądaną aktywność neutrofilów leżącą u podłoża szeregu chorób i stanów patologicznych, w tym posocznicy (Deree i wsp., 2006).

W pracy oceniłam wpływ PTX na degranulację neutrofilów na podstawie uwalniania enzymów: elastazy, mieloperoksydazy (MPO) i zasadowej fosfatazy (ALP) oraz na wytwarzanie tlenku azotu i anionorodnika ponadtlenkowego w hodowlach stymulowanych wcześniej przez antygeny bakteryjne: peptyd formylowy (fMLP, 1 μ g/ml) lub lipopolisacharyd (LPS, 1 μ g/ml) dla uzyskania odpowiedzi prozapalnej. W przeprowadzonych badaniach stwierdziłam, że PTX poczynając od stężenia 1 μ g/ml hamuje szereg neutrofilowych funkcji prozapalnych: w zakresie uwalniania elastazy, MPO, w neutrofilach uprzednio stymulowanych antygenami bakterii Gram-ujemnych (LPS) lub Gram-dodatnich (fMLP). Uwalnianie ALP najsilniej było hamowane przez PTX w stężeniu 1 μ g/ml i efekt ten utrzymywał się aż do stężenia 100 μ g/ml. Nie zaobserwowałam zahamowania wytwarzania anionu ponadtlenkowego, a obniżenie wytwarzania tlenku azotu wystąpiło tylko przy stężeniu 100 μ g/ml w hodowlach uprzednio stymulowanych fMLP. Moje badania wykazały, że PTX istotnie ogranicza aktywność neutrofilów świń w zakresie uwalniania enzymów, a w mniejszym stopniu wpływa na generowanie wolnych rodników.

W kolejnym etapie badań, w związku z wykazanim doświadczalnie, ograniczeniem uwalniania elastazy, oceniono jak wpływa to na inne istotne funkcje neutrofilowe, mianowicie uwalnianie katelicydyn w ich dojrzałej postaci. Mając na względzie, że elastaza jest enzymem warunkującym powstanie dojrzałych aktywnych form katelicydyn, jedynych NPP obecnych w neutrofilach u świń, ich zahamowanie stanowiło by o poważnych konsekwencjach dla mechanizmów odpowiedzi komórkowej, dla których konieczne jest powstawanie aktywnych katelicydyn. Dlatego u świń, jako gatunku modelowego w badaniach farmakologicznych zależność między aktywnością elastazy a ekspresją katelicydyn wymagała wyjaśnienia.

Zastosowana do badań metoda MALDI TOF umożliwiła detekcję niewielkich ilości katelicydyn po uprzednim wyizolowaniu ich przez mnie z hodowli komórkowych, jak i potwierdzenie na podstawie mas cząsteczkowych, że mamy do czynienia z dojrzałymi formami tych peptydów (fragmenty C końcowe). W przeprowadzonych z użyciem metody MALDI TOF MS badaniach wykazano, iż pomimo ograniczenia uwalniania elastazy po zastosowaniu PTX w stężeniach w zakresie od 1 µg/ml do 1000 µg/ml, wytwarzanie katelicydyn nie zostało zahamowane. Dowodzi to, iż pomimo zahamowania nadmiernej zapalnej aktywności neutrofilów wytwarzanie peptydów antybakteryjnych nie zostaje zakłócone i ten ważny etap wrodzonej reakcji obronnej organizmu nie ulega zaburzeniu. Ten inhibitor fosfodiesteraz może więc być stosowany do hamowania farmakologicznego nadmiernej aktywności neutrofilowej bez zaburzenia funkcji obronnych organizmu warunkowanych przez te katelicydyny, które dla swojej aktywności potrzebują elastazy.

W pracy zastosowano metodę izolacji katelicydyn z hodowli komórkowych, wcześniej wprowadzoną do pozyskiwania tych peptydów z ekstraktu neutrofilowego, a następnie identyfikacji otrzymanych produktów na podstawie ich masy cząsteczkowej. Jest to szczególnie pomocne przy małej ilości otrzymanego materiału biologicznego i niskich stężeniach badanych substancji. Wyniki opublikowano w pracy: **Wessely-Szponder J., Smolira A.** 2016. Response of antimicrobial peptides from porcine neutrophils to pentoxifylline and antigens from Gram negative and Gram positive bacteria. *Research in Veterinary Science*, 104, 160-165.

Wnioski na podstawie prac stanowiących osiągnięcie naukowe:

Opracowana przez mnie modyfikacja metody separacji peptydów pozwala na równoczesną izolację wszystkich obecnych w neutrofilach katelicydyn, a także pozyskiwanie tych peptydów z hodowli komórkowych.

Wykazałam, że metoda MALDI TOF jest użyteczna do identyfikacji otrzymywanych peptydów antybakteryjnych zarówno z ekstraktów neutrofilowych, jak i hodowli komórkowych, tak więc pozwala na jakościową ocenę składu peptydowego frakcji pochodzących od różnych gatunków.

Ekstrakt komórkowy otrzymany z neutrofilii świń stymuluje prozapalnie neutrofile królicze. Wzmacnia uwalnianie enzymów (elastazy, MPO, ALP) i wytwarzanie wolnych rodników, wspomagając antybakteryjne działanie w przebiegu implantacji biomateriału.

Wyizolowane naturalne katelicydyny świń (profeniny, PR-39, jak i protegryny) zmniejszają uwalnianie MPO i ALP, ograniczają też generowanie wolnych rodników z neutrofilii króliczych w przebiegu implantacji biomateriału. Natomiast uwalnianie elastazy, niezbędnej na wczesnym etapie rozwoju reakcji zapalnej, nie jest hamowane.

Wpływ ekstraktu neutrofilowego na polaryzację makrofagów zarówno pro- jak i przeciwzapalną, zapewnia ich optymalne zastosowanie we wspomaganie zrostu kostnego i współuczestniczy ze znanym już działaniem przeciwdrobnoustrojowym, mającym znaczenie w ograniczeniu stosowania antybiotyków.

Zabieg wszczepienia do ubytku kostnego implantu tytanowego nie aktywuje krążących monocytów, w sposób, który zmieniałby morfologię i funkcję pochodzących z nich makrofagów.

Zastosowanie pentoksyfiliny, jako czynnika hamującego aktywność neutrofilii, nie ogranicza ekspresji dojrzałych postaci katelicydyn w hodowlach neutrofilowych.

Podsumowanie:

W wykonanych doświadczeniach użyłam preparatów potencjalnie leczniczych, w formie katelicydyn oraz surowego ekstraktu neutrofilowego, wyizolowanych metodą własną. Pomimo możliwych zastosowań, modulowanie odpowiedzi zapalnej za pośrednictwem aktywności neutrofilii oraz przez ukierunkowanie makrofagów do funkcji zapalnej albo naprawczej za pomocą neutrofilowych peptydów przeciwbakteryjnych (NPP), nie były dotychczas ani wykonywane ani rozważane w aspekcie przydatności klinicznej. Przeprowadzone przeze mnie badania dotyczące interakcji z biomateriałami i możliwości sterowania reakcją zapalną, stanowią podstawę *in vitro* dla wprowadzenia terapeutycznych zastosowań katelicydyn do wspomaganie zrostu kostnego u badanych gatunków modelowych;

świń i królików. Powyższa wiedza będzie przydatna w wykorzystaniu NPP dla wspomaganie zrostu kostnego po implantacji biomateriału, gdyż oprócz działania antybakteryjnego, stwarza możliwość oddziaływania na reakcję zapalną za pośrednictwem aktywności neutrofilowej i makrofagowej.

Piśmiennictwo:

1. Aarbiou J., Tjabringa G.S., Verhoosel R.M., Ninaber D.K., White S.R., Peltenburg L.T.C., Rabe K.F., Hiemstra P.S. 2006. Mechanism of cell death induced by neutrophil antimicrobial peptides α -defensins and LL-37. *Inflamm. Res.* 55, 119-127.
2. Agier J., Efenberger M., Brzezińska-Błaszczyk E. 2015. Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Centr. Eur. J. Immunol.* 40, 225-235.
3. Anderson R., Yu P-L., 2003. Isolation and characterisation of proline/arginine-rich cathelicidin peptides from ovine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 312, 1139-1146
4. Anonymus. Guidelines for the Prudent Use of Antimicrobials in Veterinary Medicine http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_en.pdf (accessed 14 March 2016). Official Journal of the European Union C299/04, Brussels, Belgium, 2015.
5. Bowdish D., Davidson D., Scott M., Hancock R. 2005. Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob. Agents Chem.*, 49: 1727-1732.
6. Brandenburg L-O., Merres J., Albrecht L-J., Varoga D., Pufe T. 2012. Antimicrobial peptides: Multifunctional drugs for different applications. *Polymers* 4, 539-560.
7. Brown K.L., Hancock R. 2001. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol*, 18, 24-30.
8. Ceccarelli A, Cole A, Park A, Tank S, Yoshioka, Ganz T. 2001. Therapeutic effect of a pig-derived peptide antibiotic on porcine wound infections. *Comparative Medicine* 51, 75-79.
9. Cole A., Shi J., Ceccarelli A., Kim Y-H., Park A., Ganz T. 2001. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. *Blood.* 97, 297-304.

10. Das A., Sinha M., Datta S., Abas M., Chaffee S., Sen C.K., Roy S. 2015. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am. J. Pathol.* 185, 2596-2606.
11. Deree J., Lall R., Melbostad H., Grant M., Hoyt D., Coimbra R. 2006. Neutrophil degranulation and the effects of phosphodiesterase inhibition. *J Surg Res.* 133,22-28.
12. Elad S., Epstein J.B., Raber-Durlacher J., Donnelly P., Strahilevitz J. 2012 The antimicrobial effect of Isegran HCl oral solution in patients receiving stomatotoxic chemotherapy: analysis from a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized, phase III clinical trial. *J Oral Pathol Med.* 41(3),229-34.
13. Franz S., Rammelt S., Scharnweber D., Simon J. 2011. Immune responses to implants- A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32: 6692-6709.
14. Gruszecka A., Szymańska-Chargot M., Smolira A., Michalak L. 2008. Role of the target materials on a laser desorption/ionization mass spectra. *Rapid Comm Mass Spectrom* 22: 925-929.
15. Hancock REW., Sahl H-G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotech.* 24, 1551-1557.
16. Hortin G. 2006. The MALDI-TOF Mass Spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin. Chem.* 52, 1223-1237.
17. Kaveh K., Ibrahim R., Bakar M., Ibrahim T. 2010. Bone grafting and bone graft substitutes. *J Anim. Vet. Adv.*, 9: 1055-1067.
18. Kittaka M., Shiba H., Kajiya M., Fujita T., Iwata T., Rathvisal K., Ouhara K., Takeda K., Fujita T., Komatsuzawa H., Kurihara H. 2013. The antimicrobial peptide LL37 promotes bone regeneration in a rat calvarial bone defect. *Peptides* 46, 136-142.
19. Leor J., Rozen L., Zulloff-Shani A., Feinberg M.S., Amsalem Y., Barbash I.M., Kachel E., Holbova R., Mardor Y., Daniels D., Ocherashvilli A., Orestein A., Danon D. 2006. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation.* 114, I-94-I-100.
20. Ma Q.-Li., Zhao L.-Z., Liu R.-R., Jin B-Q., Song W., Wang Y., Zhang Y.-S., Chen L.-H., Zhang Y.-M. 2014. Improved implant osseointegration of a nanostructured titanium surface via mediation of macrophage polarization. *Biomaterials* 35, 9853-9867.

21. McPhee J.B., Hancock R.E.W. 2005. Function and therapeutic potential of host defence peptides *J. Pep. Sci.*11, 677-687.
22. Moura C.C.G., Zanetta-Barbosa D., Dechichi P., Carvalho V.F., Soares B.P. 2014. Effects of titanium surfaces on the developmental profile of monocytes/macrophages. *Bras. Dent. J.*25, 96-103.
23. Novak M., Koh T. 2013. Macrophage phenotypes during tissue repair *J. Leuk. Biol.* 93, 875-881
24. Ramanathan B., Davis E., Ross Ch., Blecha F. 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microb. Infect.*4, 361-372.
25. Sang Y., Blecha F. 2009. Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions. *Develop Comp Immunol.* 33, 334-343.
26. Scapinello S., Brooks A.S., MacInnes J.I, Hammermueller J., Clark M.E., Caswell J.I. 2011. Bactericidal activity of porcine neutrophil secretions. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 139, 113-118.
27. Shi J., and Ganz, T., 1998. The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect Immun.* 66, 3611-3617.
28. Smolira A., Hałas S., Wessely-Szponder J. 2015. Quantification of the PR-39 cathelicidin compound in porcine blood by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29, 1811–1816.
29. Treffers Ch., Chen L., Anderson RC., Yu P-L. 2005. Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 165-169.
30. Yu P-L., Linden D.S., Anderson R. 2010. Antimicrobial peptides isolated from the blood of farm animals. *Animal Production Science* 50, 660-669.
31. Zanetti M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of innate immunity. *J Leukoc Biol* 74: 39-48.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

A) Aktywność naukowa

Mój dorobek naukowy nie wchodzący w skład głównego osiągnięcia naukowego obejmuje 33 publikacje, w tym 13 oryginalnych prac znajdujących się w bazie JCR. Jestem również współautorką 20 doniesień zjazdowych prezentowanych na kongresach i konferencjach krajowych i zagranicznych. Spośród powyższych publikacji 9 prac (1 indeksowana w JCR) i 4 komunikaty zjazdowe powstało przed doktoratem.

A) 1. Aktywność naukowa przed doktoratem

Na początku mojej pracy w Katedrze Patofizjologii rozpoczęłam badania skaz krwotocznych u zwierząt ze szczególnym uwzględnieniem choroby von Willebranda u psów. Z tego zakresu pochodzą 4 publikacje (IF=0,188, 7 pkt). Ponadto zajmowałam się aktywnością proliferacyjną limfocytów (1 praca, 4 pkt.), wpływem PMSC na wytwarzanie estrogenu przez komórki warstwy ziarnistej jajnika (1 praca, 4 pkt.) oraz neutrofilową aktywnością sekrecyjną (3 prace, 12 pkt), a główny kierunek moich badań dotyczył aktywności neutrofilii bydłęcych w przebiegu zespołu oddechowego (BRD).

Łącznie 9 prac IF=0,188, 27 pkt.

Badania ostatnich lat wykazały, że nadzwyczaj ważnymi endogennymi czynnikami, biorącymi udział w patogenezie uszkodzeń płuc w przebiegu zespołu oddechowego u bydła (BRD) są neutrofile, których produkty (takie jak: elastaza, mieloperozydaza, zasadowa fosfataza, tlenek azotu, anionorodnik ponadtlenkowy), jeśli są wytwarzane w nadmiarze, powodują nieodwracalne uszkodzenia płuc, prowadząc kolejno do spadku przyrostów masy, obniżenia produktywności i nie rzadko padnięć młodego bydła. Celem prowadzonych badań było stwierdzenie czy istnieje związek pomiędzy aktywnością sekrecyjną neutrofilii wyizolowanych z krwi jałówek zdrowych i chorych na BRD a stopniem nasilenia objawów chorobowych. Przed rozpoczęciem przeze mnie powyższych badań, w Polsce nie oceniano czynników aktywujących neutrofile bydła do wzmożonej czynności wydzielniczej,

współdecydującej o ciężkim przebiegu infekcji układu oddechowego i jej możliwych konsekwencjach patologicznych.

Aby osiągnąć wytyczony cel opracowałam modyfikację metody oceny aktywności sekrecyjnej neutrofilii (w oparciu o uwalnianie elastazy, MPO, AKP oraz wytwarzanie tlenu azotu), dostosowując ją do specyfiki gatunkowej bydła, a następnie metodą tą posługiwałam się we wszelkich dalszych oznaczeniach. Markery aktywności neutrofilowej zostały dobrane tak, aby odzwierciedlały one stopień nasilenia objawów w infekcjach układu oddechowego u bydła, będąc równocześnie markerami uszkodzeń płuc. W toku pracy określiłam związek pomiędzy uwalnianiem badanych enzymów i wolnych rodników a stanem klinicznym zwierząt i stopniem nasilenia objawów BRD.

Przeprowadzone badania wykazały istotnie wyższą odpowiedź sekrecyjną neutrofilii u jałówek chorych na BRD, skorelowaną ze stopniem nasilenia objawów klinicznych. Ponadto stwierdziłam istnienie ujemnej korelacji pomiędzy wiekiem a wydzielaniem *in vitro* elastazy przez neutrofile od chorych jałówek. Metoda ta jest użyteczna w badaniach nad BRD u bydła, a uzyskane parametry mogą być wykorzystane w ocenie neutrofilowych właściwości uszkodzających, szczególnie w przypadku uszkodzeń płuc. Praca powstała we współpracy z Dipartimento di Anatomia Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Università di Pisa, uzyskane wyniki opublikowałam w: **Wessely-Szponder J.**, Bobowiec R., Martelli F., Wójcik M., Kosior-Korzecka U. 2004. Assessment of neutrophil components as markers of lung injury in the course of respiratory tract infections in heifers. Polish Journal of Veterinary Sciences, 7,157-161 i komunikacie konferencyjnym (Załącznik 4 B1).

W kolejnym etapie zbadano wpływ antybiotyku jonoforowego, monenzyny, na aktywność neutrofilii i żywotność tych komórek w przebiegu zespołu oddechowego u jałówek. W doświadczeniu zastosowano monenzynę w dawkach od 0 do 50 μM w celu określenia odpowiedzi neutrofilowej w hodowlach stymulowanych octanem forbolu (PMA). W powyższych analizach oznaczyłam uwalnianie elastazy, MPO, ALP oraz wytwarzanie tlenu azotu w kolejnych punktach czasowych: po 0,5, 5 i 24 godzinach inkubacji w warunkach 37°C i 5% CO₂. Następnie oceniono wpływ monenzyny na żywotność badanych komórek, posługując się testem MTT. Powyższe badania wykazały, że monenzyna już w dawkach 1 μM podwyższała aktywność wydzielniczą neutrofilii przyczyniając się do nasilenia procesu chorobowego. Natomiast wygaszenie tej odpowiedzi po 24 h związane było z ograniczeniem żywotności populacji neutrofilii. Uzyskane wyniki wskazują, że podawanie monenzyny

u bydła w przebiegu BRD może dodatkowo nasilić objawy choroby. Wyniki opublikowano w pracy: Cybulski W., **Wessely-Szponder J.**, Radko L., Bobowiec R., Wernicki A. 2006. Wpływ monenzyny na aktywność i żywotność neutrofilii jałówek z objawami zespołu oddechowego. *Medycyna Wet.* 62(8), 951-954 i komunikacie konferencyjnym (Załącznik 4 B 2).

W ramach badań nad odpowiedzią neutrofilową na różnego typu stymulacje prozapalne oceniono wpływ *Mannheimia haemolytica* na aktywność neutrofilii jałówek w przebiegu BRD. W powyższej pracy zbadałam wpływ LPS z *E. coli* i leukotoksyny z *M. haemolytica* (LKT) w stężeniach 25-300 µg/ml na odpowiedź wydzielniczą neutrofilii na podstawie uwalniania elastazy, MPO, ALP, a także wytwarzania wolnych rodników anionu nadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu (NO). Ponadto określiłam cytotoksyczność LKT, wykonując test aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Neutrofile eksponowane na obie toksyny wykazywały zwiększoną degranulację, szczególnie przy najwyższych stężeniach toksyn. Wykazana odpowiedź *in vitro* stanowi odzwierciedlenie odpowiedzi endogennej na toksyny bakteryjne podczas BRD. Enzymy wydzielane w nadmiarze przez neutrofile uszkodzają tkankę płucną w przebiegu tej choroby. Podwyższone uwalnianie enzymów częściowo wynika ze zwiększonej aktywności neutrofilii, a częściowo z ich nekrozy i lizy, co powoduje pozakomórkowe uwalnianie enzymów w odpowiedzi na wysokie dawki LKT. Wyniki opublikowane zostały w pracy: **Wessely-Szponder J.**, Urban-Chmiel R., Wernicki A., Bobowiec R. 2005. Effect of leukotoxin of *Mannheimia haemolytica* and LPS of *E. coli* on secretory response of bovine neutrophils *in vitro*. *Pol. J. Vet. Sci.* 8, 99-105.

Kolejne podjęte zadanie badawcze miało na celu ustalenie czy istnieje związek pomiędzy aktywnością sekrecyjną neutrofilii wyizolowanych z krwi jałówek zdrowych i chorych na ostrą i przewlekłą postać BRD a zmiennymi stężeniami TNF α i IL-8 w warunkach *in vitro*. Oceniałam również znaczenie cytokin w wytwarzaniu kwasu 5-okso-eikozatetraenowego (5-okso-ETE), jako potencjalnego czynnika decydującego o ukierunkowaniu neutrofilii do odpowiedzi sekrecyjnej. W końcowym etapie określiłam związek między wydzielaniem badanych enzymów i wolnych rodników w grupie jałówek z ostrą i przewlekłą postacią BRD a stanem klinicznym zwierząt i stopniem nasilenia objawów występującej choroby.

Badania nad rolą neutrofilii, jako endogennego czynnika w rozwoju zespołu oddechowego u bydła wykazały, że aktywność prozapalna, która może się przyczynić do nieodwracalnych uszkodzeń płuc, zależała od postaci choroby i stopnia nasilenia objawów,

największa była w ostrej BRD i zmniejszała się podczas zdrowienia. Ponadto stwierdziłam, że pod wpływem TNF α następowała wzmożona aktywność sekrecyjna neutrofilii, odzwierciedlająca się w zwiększonym uwalnianiu elastazy, MPO, ALP, jak również w wytwarzaniu anionorodnika nadadtlenkowego. Z kolei wzrastające stężenia IL-8 nasilały uwalnianie elastazy i ALP, zarówno w ostrej, jak i przewlekłej postaci BRD, ale nie wpływały na uwalnianie MPO ani generowanie O₂⁻. Wytwarzanie NO zmieniało się w zależności od stężenia, czasu trwania inkubacji komórek i grupy jałówek, neutrofile od jałówek chorych na BRD były pobudzane przez stężenia TNF α w zakresie 0,05-0,5 ng/ml. TNF α hamował wytwarzanie 5-okso-ETE, szczególnie w obu grupach jałówek chorych. Natomiast zwiększenie stężenia IL-8 stymulowało wydzielanie 5-okso-ETE przez neutrofile, najsilniej w ostrej postaci BRD, a najslabiej w grupie jałówek zdrowych. Wyniki stanowiły temat pracy doktorskiej i zostały opublikowane w:

Wessely-Szponder J. 2008. The influence of TNF and IL-8 on secretory action of neutrophils isolated from heifers in the course of BRD. *Acta Veterinaria Hungarica* 56, 187-196 i komunikatach konferencyjnych (Zał. 4 B 5 i 6).

A) 2. Główne kierunki badań

Główne kierunki badań realizowanych przeze mnie w Zakładzie Patofizjologii, obejmują tematy związane przede wszystkim z aktywnością sekrecyjną neutrofilii oraz reakcjami komórek z polimorficznym jądrem i makrofagów na stymulacje środowiskowe. Interesował mnie także udział powyższych komórek w reakcji zapalnej wywołanej implantacją biomateriału albo transformacją nowotworową. Szczegółowe omówienie osiągnięć z tego zakresu przedstawiam w chronologicznym porządku od rozpoczęcia ich realizacji.

1. Zaburzenia krzepnięcia krwi i reakcji zapalnej w różnych stanach patologicznych

Procesy krzepnięcia i reakcja zapalna są ze sobą ściśle powiązane, jako dwa mechanizmy obrony ustroju przed infekcją. Celem przeprowadzonego doświadczenia była ocena podwójnej roli trombiny, jako czynnika zarówno w procesach krzepnięcia jak i w reakcji zapalnej w odniesieniu do chorób układu rozrodczego u bydła mlecznego (*mastitis* i *metritis*) oraz aktywności neutrofilowej na podstawie uwalniania elastazy, MPO, a także laktoferyny, jednego z białek o kluczowym znaczeniu w odpowiedzi obronnej organizmu.

Laktoferyna (Lf) należy do grupy transferyn, jest białkiem o masie 80 kDa i potwierdzonej aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwwirusowej, magazynowanym w ziarnistościach wtórnych neutrofilii. Stężenie LF we krwi zdrowych krów było niewielkie (poniżej 0,1 mg/ml osocza), wzrastało w przebiegu *mastitis* i *metritis*, wykazując dynamiczne zmiany w połączeniu z objawami chorobowymi. Również stężenie fibrynogenu, białka ostrej fazy ściśle powiązanego z procesami krzepnięcia, ulegało istotnemu podwyższeniu w pierwszej fazie *mastitis* i *metritis*, szczególnie w przebiegu *mastitis*, z następowym obniżeniem wraz z procesem zdrowienia. Dodatnia korelacja pomiędzy wytwarzaniem trombiny a uwalnianiem elastazy i MPO potwierdziła trombinową aktywację odpowiedzi sekrecyjnej neutrofilii.

Przeprowadzone badania wykazały uszkodzające powiązania układu krzepnięcia i reakcji zapalnej, które u bydła mlecznego prowadzić mogą do poważnych zaburzeń w przebiegu *mastitis* i *metritis*, aż do wystąpienia zespołu rozsianego krzepnięcia śródnaczyniowego (DIC) i zespołu uszkodzeń wielonarządowych (MODS) włącznie. Wyniki opublikowano w pracy: Bobowiec R, **Wessely-Szponder J.**, Hóla P. 2009. Crosstalk between coagulation and inflammation in mastitis and metritis in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica* 57, 2, 283-293 i w komunikacie w Zał. 4 B 7.

Kolejny projekt, dotyczył badań nad istotnymi w weterynarii zaburzeniami rozwojowymi u psów: chorobą Legg-Calve-Perthesa (LCD) i osteochondrozą (OC) z przyczynowym udziałem wybranych czynników krzepnięcia. Są to jednostki chorobowe, podczas których dochodzi do patologicznych zmian w stawach i poważnych zaburzeń w poruszaniu się u wielu ras psów. W obu powyższych chorobach osoczowe stężenia białka C i fibrynogenu uznane zostały za potencjalne markery diagnostyczne. Wykonane badania wykazały, że poziom białka C, jako czynnika przeciwkrzepliwego i fibrynolitycznego, był niższy w obu badanych grupach chorych psów w porównaniu do osobników zdrowych. Natomiast poziom fibrynogenu był znacząco wyższy u psów z osteochondrozą. W świetle przeprowadzonych badań stężenia białka C i fibrynogenu, można uznać za potencjalne markery chorób rozwojowych układu kostnego u psów. Wyniki zostały opublikowane w pracy: Szponder T., **Wessely-Szponder J.** 2010. Plasma level of Protein C, fibrinogen concentration and platelet number in dogs with Legg-Calve-Perthes disease and osteochondrosis. Preliminary studies. *J Bull Vet Inst Pulawy* 54, 433-436.

2. Neutrofilowe i makrofagowe odpowiedzi na stymulacje środowiskowe

2.a) Wpływ znieczulenia na aktywność wydzielniczą neutrofilii króliczych

Kolejnym etapem badań było dążenie do naświetlenia jak środki znieczulające wpływają na aktywność neutrofilową w aspekcie powikłań pooperacyjnych wynikających z zaburzenia przebiegu reakcji zapalnej.

Neutrofile jako wiodące komórki we wczesnej reakcji zapalnej stanowią istotny element odpowiedzi organizmu po urazie lub zabiegu operacyjnym. Aby ustalić w jaki sposób dwa zastosowane schematy znieczuleń infuzyjnych u królików, to jest: ketamina/midazolam/propofol i ketamina/propofol wpływają na funkcje neutrofilii w okresie do 24 godzin od zabiegu operacyjnego, zbadalam aktywność neutrofilii *in vitro* pod względem uwalniania elastazy, MPO, ALP oraz wytwarzania tlenu azotu i anionorodnika ponadtlkowego po 30 minutach od początku znieczulenia i po 24 godzinach. Okazało się, że oba zastosowane typy znieczuleń powodowały obniżenie uwalniania elastazy, MPO, ALP po 30 minutach od początku znieczulenia, a efekt ten ustępował po 24 godzinach od zabiegu operacyjnego, podobna odpowiedź obserwowana była dla NO. Praca powstała we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Zwierząt. Wyniki opublikowano w: **Wessely-Szponder J.** Szponder T. 2010. Comparison of the effects of two anaesthetic combinations in rabbits on some neutrophil functions *in vitro*. *World Rabbit Science* 18:169-177.

2.b.) Aktywność wydzielnicza neutrofilii w odniesieniu do zaburzeń reprodukcyjnych u różnych gatunków zwierząt

Kolejne badania dotyczyły wpływu cyklu rujowego u loch na aktywność neutrofilową *in vitro*. W przeprowadzonym doświadczeniu w celu określenia fazy cyklu rujowego dokonałam makroskopowej oceny jajników w badaniu poubojowym oraz oznaczyłam metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) osoczowe stężenia hormonów sterydowych: 17 β- estradiolu i progesteronu. Następnie oceniłam na podstawie uwalnianych markerów (elastazy, MPO, ALP, NO i O₂⁻) odpowiedź *in vitro* neutrofilii z pobranej krwi. Wykonane przeze mnie badania udowodniły, że w fazie lutealnej u loch zmniejszała się aktywność wydzielnicza neutrofilii, co przekładało się na obniżenie odporności w tej fazie cyklu rujowego i zwiększenie podatności na patogeny, podczas gdy wzrost stężenia estrogenów w fazie pęcherzykowej nasilał aktywność wydzielniczą, obniżając podatność na

zakażenia. Wyniki przedstawiono w publikacji: **Wessely-Szponder J.**, Bobowiec R. 2013. Elastase, myeloperoxidase, and alkaline phosphatase release and free radical generation in neutrophils isolated from blood of sows at different stages of oestrous cycle. *Bull Vet Inst Pulawy* 57, 65-68 i w komunikacie w Zał. 4 B 8.

W kolejnej pracy wskazałam na interakcje pomiędzy aktywnością neutrofilową *in vitro*, stresem oksydacyjnym, ocenianym na podstawie peroksydacji lipidów i odpowiedzią ostrej fazy w przebiegu pierwszej rui po porodzie (tzw. rui źrebięcej) u klaczy zimnokrwistych. Spośród powyższych markerów, zmienna aktywność neutrofilowa okazała się być czynnikiem warunkującym podatność klaczy na zakażenia układu rozrodczego (*endometritis*) i trudności z zażrebieniem w pierwszej rui po porodzie. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że u klaczy predysponowanych do *endometritis* początkowa aktywność neutrofilowa jest mniejsza niż u klaczy opornych i rośnie dopiero wraz z rozwijającym się procesem zapalnym. Nowatorskim aspektem pracy było zarówno przeprowadzenie etapu *in vivo* na klaczach zimnokrwistych (obejmujące ocenę ultrasonograficzną zmian macicznych i jajnikowych), jak i wykonane *in vitro* badania neutrofilowej aktywności sekrecyjnej. Powyższe badania przyczyniły się do poznania niektórych mechanizmów odpowiedzialnych za podatność na zakażenia podczas krycia w rui źrebięcej i wyjaśnienia przyczyn trudności z zażrebieniem u podatnych klaczy. Praca powstała we współpracy z Katedrą i Kliniką Rozrodu Zwierząt, a wyniki opublikowano w:

Wessely-Szponder J., Krakowski L., Bobowiec R., Tusińska E. 2014. Relation among neutrophil enzyme activity, lipid peroxidation, and acute-phase response in foal heat in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 1286–1293 i w komunikatach w Zał. 4 B 12 i 14.

2.c.) Przeciwdrobnoustrojowy peptyd neutrofilowy PR-39, jako produkt aktywności neutrofilowej-analiza ilościowa

Wstępne analizy jakościowe metodą MALDI TOF badanych ekstraktów neutrofilowych zapoczątkowały w dalszej kolejności ilościową ocenę zawartych składników, podjętą we współpracy z Pracownią Spektrometrii Mas Instytutu Fizyki UMCS. Jako pierwszy wybrałam peptyd PR-39 ze względu na jego szczególne właściwości i znaczenie. Peptyd PR-39 oprócz działania bakteriobójczego, pełni szereg ważnych funkcji: jest między innymi specyficznym chemoatraktantem dla neutrofilów, indukuje w komórkach mezenchymalnych ekspresję

proteoglikanów, ważnych dla mechanizmów naprawy tkanek, zapobiega rozwinięciu się wstrząsu septycznego przez wiązanie LPS. Hamuje również aktywność oksydazy NADPH w fagocytach, co wskazuje na ważną biologicznie rolę w regulacji ostrego zapalenia, tak aby nie stanowiło ono zagrożenia dla organizmu. Z powyższych względów możliwość oznaczenia jego stężenia w próbkach biologicznych przyczyni się do znaczących postępów w badaniach nad mechanizmami odpowiedzialnymi za proces zapalny.

Dla osiągnięcia wytyczonego celu zastosowano metodę dodawania standardu zewnętrznego (syntetyku PR-39) do badanej próbki. Na podstawie sporządzonej krzywej kalibracyjnej i po matematycznym odtworzeniu przebiegu poszczególnych etapów preparatyki MALDI oszacowano stężenie peptydu PR-39 w liofilizacie. Jest to nowatorska metoda analizy ilościowej peptydu PR-39 w próbkach biologicznych, nie wymagająca użycia trudno dostępnych przeciwciał. Stanowi ona kontynuację pracy b.1., umożliwiającej wstępną analizę jakościową badanej próbki biologicznej pod kątem analizy zawartości peptydu PR-39.

W pracach opartych na zastosowaniu ekstraktu neutrofilowego istotna jest nie tylko jakościowa ocena poszczególnych komponentów, ale też możliwość oznaczeń ilościowych. Katelicyny zwierzęce, jako specyficzne gatunkowo w oznaczeniach immunologicznych wymagają przeciwciał monoklonalnych, co stanowi znaczące utrudnienie i podwyższa koszt, gdyż w większości przypadków muszą one być robione na zamówienie. Stąd metoda ilościowej analizy peptydów z użyciem MALDI TOF stanowi znaczące osiągnięcie w tej dziedzinie i umożliwia dalszy rozwój zastosowań metod MALDI do oznaczeń kolejnych peptydów. Wyniki opublikowano w pracy: Smolira A., Hałas S., **Wessely-Szponder J.** 2015. Quantification of the PR-39 cathelicidin compound in porcine blood by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 29, 1811–1816.

2.d). Odpowiedź makrofagowa na stymulację prozapalną w przebiegu procesu nowotworowego

Z uwagi na fakt, że monocyty i makrofagi tkankowe uważane są za wiodące komórki w odpowiedzi zapalnej, w kolejnym etapie moje badania poszerzyłam o odpowiedź makrofagową na stymulację prozapalną. Kiedy monocyty wydostają się do przestrzeni pozanaczyniowej, ulegają aktywacji i różnicowaniu do dojrzałych makrofagów tkankowych. Transformacja ta wymaga szeregu zmian w ekspresji genów i funkcjonowaniu komórek, a proces ten odbywa się za pośrednictwem mediatorów obecnych w mikrośrodowisku.

Klasyczna aktywacja makrofagów powoduje powstanie komórek nazywanych M1, wykazujących odpowiedź prozapalną, obronną, przeciwnowotworową. Natomiast środowisko nowotworowe wytwarza szereg stymulatorów, powodując ukierunkowanie do makrofagów związanych z nowotworzeniem (Tumor Associated Macrophages-TAM), immunosupresyjnych i promujących nowotworzenie.

Doświadczenie przeprowadzono na makrofagach z krwi pozyskanej od ludzi z pierwotnym nowotworem wątrobowokomórkowym (*hepatocellular carcinoma* -HCC) oraz od szczurów z doświadczalnie wywołanym nowotworem (poddanych działaniu dietylnitrozoaminy-DEN). Pierwszym celem moich badań było poznanie funkcji makrofagów w tych stanach patologicznych, zarówno u ludzi, jak i u szczurów, jako modelu doświadczalnego. Następnie, ze względu na szczególną dwutorową rolę makrofagów w patogenezie procesu nowotworowego, kolejnym etapem było ukierunkowanie makrofagów do aktywności prozapalnej i równocześnie przeciwnowotworowej przez oddziaływanie na monocyty beta-glukanem (BCG), w stężeniach 5-20 µg/ml w ramach „treningu immunologicznego”. Uzyskana prozapalna polaryzacja makrofagów, oceniona na podstawie ich morfologii i funkcji, stanowi podstawę do dalszych badań nad treningiem immunologicznym tych komórek, a otrzymane wyniki będą przydatne we wprowadzaniu przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych. Badania wykonano we współpracy z Kliniką Gastroenterologii z Pracownią Endoskopową SPSK4 w Lublinie. Wyniki opublikowano w pracy: Wójcik M., **Wessely-Szponder J.**, Cichoż-Lach H., Celiński K., Bobowiec R. 2016. In vitro proinflammatory polarization of macrophages isolated from hepatocarcinogenic stage in humans and rats In vivo 30 (6) 853-862 i w komunikacie w Zał. 4 B 18.

2.e). Odpowiedź makrofagowa i neutrofilowa na stymulację ekstraktem neutrofilowym

W kolejnym doświadczeniu wraz ze współautorami opracowałam standaryzację metody otrzymywania żelu bogatopłytkowego (PRP) od królików, a także uzyskałam króliczy ekstrakt neutrofilowy, z przeznaczeniem do wykorzystania jako autogenne krwiopochodne czynniki o potencjale wspomagania procesów gojenia, szczególnie w odniesieniu do zrostu kostnego. Ponadto projekt obejmował ocenę aktywności neutrofilii i makrofagów po stymulacji ekstraktem neutrofilowym.

W badaniach nad jakościową oceną preparatów: ekstraktu neutrofilowego i PRP użyto spektrometrii mas (MALDI TOF). Na podstawie wcześniej opracowanej metody (b.1.) wyizolowałam króliczy ekstrakt neutrofilowy i oceniłam zawartości w nim peptydów antybakteryjnych. Królik jako gatunek polikatelicydynowy ma w ziarnistościach neutrofilowych następujące rodzaje NPP: białko antybakteryjne 15-kDa i katelicydynę 18 kDa; oprócz tego królicze neutrofile zawierają defensyny NP-1,2, 3a, 3b, 4 i 5. Wszystkie wymienione peptydy uwidoczniono w uzyskanych próbkach biologicznych. Z kolei ocena przygotowanego żelu bogatopłytkowego wykazała obecność w nim czynników wzrostowych PDGF, IGF i VEGF. W kolejnym etapie badań stymulacja hodowli makrofagów króliczych ekstraktem neutrofilowym ujawniła, że ma on działanie hamujące na wytwarzanie anionu nadtlenkowego, a także w neutrofilach ogranicza wybuch tlenowy i degranulację, tak więc zmniejsza odpowiedź w obu badanych subpopulacjach układu białokrwinkowego, zapobiegając nadmiernej reakcji zapalnej. Praca powstała we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii Zwierząt i Pracownią Spektrometrii Mas UMCS. Wyniki opublikowano w artykule: Szponder T. **Wessely-Szponder J.**, Smolira, A. 2017. Evaluation of platelet-rich plasma and neutrophil antimicrobial extract as two autologous blood-derived agents. *Tissue Eng. Regen. Med.*, Vol. 14 No3, 287-296 i w komunikacie w Zał. 4 B16.

Kontynuacją tego kierunku moich badań będzie ocena żelu bogatopłytkowego pozyskanego od owiec, gatunku uważanego za modelowy zarówno w badaniach ortopedycznych, jak i nad wspomaganie zrostu kostnego. Rozpoczęte badania prowadzone są dwutorowo: w kierunku oceny składu i właściwości pozyskanego PRP oraz w kierunku możliwych zastosowań terapeutycznych powyższego biomateriału. Czynniki wzrostowe zawarte w żelu bogatopłytkowym pełnią ważną rolę w procesach gojenia, ze szczególnym uwzględnieniem zrostu kostnego oraz postępowania przy trudno gojących się ranach. W aspekcie badawczym analiza jakościowa składników owczego PRP z użyciem MALDI TOF ułatwi standaryzację metody jego otrzymywania. Dostępny sprzęt pozwala na wykorzystanie miękkiej metody jonizacji MALDI do badań nad różnego rodzaju preparatami pochodzenia biologicznego, obejmujących opracowanie optymalnych warunków procesu przygotowywania próbek do pomiaru oraz identyfikację na podstawie masy cząsteczkowej wykrytych białek i peptydów. W aspekcie klinicznym zawarte w PRP czynniki wzrostowe i antybakteryjne ułatwią gojenie, również w trudnych przypadkach, rokując więc

wprowadzeniem nowych strategii terapeutycznych, opartych m. in. na łącznym stosowaniu PRP i ekstraktu neutrofilowego u różnych gatunków zwierząt.

Ponadto we współpracy z Kliniką Anestezjologii i Intensywnej SPSK 4 w Lublinie prowadzę badania na świniami jako modelu anestezjologicznym. Zamierzam poznać sekrecyjną odpowiedź neutrofilową w przebiegu znieczulenia wziewnego, doświadczalnych uszkodzeń płuc oraz podczas tzw. manewrów rekrutacyjnych zmierzających do przywrócenia zdolności wentylacyjnych zapadniętych pęcherzyków płucnych.

Z kolei we współpracy z Katedrą Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie w ramach kontynuacji badań nad odpowiedziami układu białokrwinkowego na implantację różnych testowanych biomateriałów stomatologicznych i chirurgicznych analizuję odpowiedzi neutrofilowe i makrofagowe na nowowprowadzane biomateriały.

3. Wpływ diety ketogennej na proliferacyjną i oksydacyjną odpowiedź komórek wątrobowych oraz osoczowe stężenie kwasów tłuszczowych u szczurów

Celem pracy była ocena wpływu diety ketogennej na proliferacyjną i oksydacyjną odpowiedź komórek wątrobowych: hepatocytów (Hep) i komórek gwiaździstych (HSC) w warunkach *in vitro*, a także porównanie profilu kwasów tłuszczowych oznaczonych metodą chromatografii gazowej (GC) w osoczu szczurów żywionych dietą ketogenną w stosunku do karmy standardowej. Wykazałam, że u szczurów żywionych karmą standardową dominował kwas palmitynowy, natomiast pod wpływem diety ketogennej wszystkie analizowane kwasy tłuszczowe osiągnęły wyższe stężenia, a dominowały kwasy linolenowy i palmitynowy. Akumulacja kwasów tłuszczowych indukowała wzmożoną odpowiedź oksydacyjną, zarówno ze strony hepatocytów, jak i komórek gwiaździstych, wyrażającą się nasileniem wytwarzania tlenu azotu i anionu nadtlenkowego, szczególnie w ostatnim dwunastym dniu hodowli. Z kolei odpowiedź proliferacyjna była zróżnicowana; nasilała się w komórkach gwiaździstych a zmniejszała w hepatocytach. Wyniki opisano w pracy: Wójcik M., **Wessely-Szponder J.**, Kosior-Korzecka U. 2014. Proliferative and oxidative response of hepatocytes (Hep) and hepatic stellate cells (HSC) isolated from rats exposed to ketogenic diet. Polish Journal of Veterinary Sciences 17(4),703-11.

4. Znaczenie odpowiedzi zapalnej w stresie transportowym u koni

Jak okazało się w najnowszych badaniach, podczas stresu transportowego wiele narządów, w tym mięśnie szkieletowe podlega nasilonym zmianom prozapalnym, co może indukować uwalnianie miokiny (szczególnie IL-6, IL-8 i adiponektyny). Celem badań było wykazanie w jakim stopniu aktywność mięśni szkieletowych, jako największego narządu w organizmie koni, wpływa na uwalnianie z nich miokiny oraz wykazanie związku między intensywnością i czasokresem wysiłku mięśni a markerami reakcji zapalnej i immunologicznej. W badaniach wzięto pod uwagę: miokiny IL-6, IL-8 oraz adiponektynę, poziom osoczowy fibrynogenu, jako białka ostrej fazy, poziom aldehydu dwumalonowego, jako wskaźnika stresu oksydacyjnego oraz fosfokinazy kreatynowej i aminotransferazy aspartamowej, jako markerów uszkodzeń mięśni szkieletowych. Badania przeprowadzono na koniach zimnokrwistych podzielonych na dwie kategorie wiekowe (6-18 miesięcy i 10-12 lat), transportowanych na odległość 50 km i 550 km.

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie zależności pomiędzy czasem trwania stresu transportowego a uwalnianiem z mięśni szkieletowych badanych miokiny (IL-6, IL-8 i adiponektyny). Jak się okazało bardziej nasilona odpowiedź zauważalna jest u zwierząt starszych. Ponadto wykryto zależność pomiędzy poziomem białek ostrej fazy, stresem oksydacyjnym a uszkodzeniami mięśniowymi u koni podczas stresu transportowego. Powyższe parametry dokumentują uogólnioną odpowiedź zapalną w przebiegu stresu transportowego i okazały się być równocześnie markerami tej odpowiedzi. Projekt zrealizowano we współpracy z Katedrą Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, wyniki opublikowano w pracach:

Wessely-Szponder J., Bełkot Z., Bobowiec R., Wójcik M., Kosior Korzecka U. 2014. Crosstalk between adiponectin and cytokines (IL-6 and IL-8) during transportation stress in horses *Medycyna Weter.* (70), 546-549.

Wessely-Szponder J., Bełkot Z., Bobowiec R., Kosior-Korzecka U., Wójcik M. 2015. Transport induced inflammatory responses in horses *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 18, No. 2 , 407–413.

A) 3. Podsumowanie dorobku badawczego

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact factor	Punkty
Prace oryginalne	33	17,29	497
Prace przeglądowe	6	0,188	7
Doniesienia zjazdowe	20	-	-
Łącznie	59	17,478	504
(w tym prace wchodzące w skład osiągnięcia)	(6)	(7,7)	(167)

Publikacje, w których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem to: **21** prac oryginalnych, **6** artykułów przeglądowych, **8** doniesień konferencyjnych.

B) Działalność dydaktyczna

Począwszy od 1995 roku do chwili obecnej prowadzę zajęcia dydaktyczne z przedmiotu Patofizjologia dla studentów III roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej. Współuczestniczyłam w przygotowywaniu programu zajęć dla tego przedmiotu.

Od 2003 r. do 2014 r. prowadziłam zajęcia z przedmiotu „Choroby zwierząt laboratoryjnych” dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.

Od 2011 r. do 2015 r. prowadziłam zajęcia z przedmiotu „Transformacje nowotworowe u zwierząt” dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (osoba odpowiedzialna za przedmiot) i jestem współtwórcą programu dla tego przedmiotu.

Od 2013 r. do chwili obecnej realizuję zajęcia z przedmiotu „Pathophysiology” i „Neoplastic Transformations” (osoba odpowiedzialna za przedmiot i autor programu dla tego przedmiotu) dla studentów anglojęzycznych w ramach programu Erasmus.

Od 2013 r. do chwili obecnej prowadzę zajęcia z przedmiotu „Kliniczny zarys chorób” dla studentów dziennych i zaocznych na kierunku Dietetyka z Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii i jestem współautorem programu dla tego przedmiotu.

W roku 2013/14 realizowałam zajęcia dla studium doktoranckiego z przedmiotu „Metody badawcze w naukach weterynaryjnych” i prowadziłam część wykładów z przedmiotu „Hodowle komórek zwierzęcych in vitro”.

W roku 2014/15 realizowałam zajęcia dla studium doktoranckiego (doktoranci anglojęzyczni): „Bioethical Aspects of Research and Diseases”.

Od 2007 do chwili obecnej byłam kierownikiem lub wykonawcą projektów prezentowanych w trakcie Lubelskiego Festiwalu Nauki (zał. 4 I 1-3).

Od roku 2007 sprawuję opiekę nad Kołem Studenckim Patofizjologów. Studenci wykonujący badania pod moim kierunkiem wielokrotnie zdobywali nagrody i wyróżnienia na Międzynarodowych Konferencjach Studenckich Kół Naukowych, są również współautorami publikacji naukowych (Załącznik 3, poz. D 17 i 18; Załącznik 4 Q).

C) Inna działalność

W 2009 r. nawiązałam współpracę z Zakładem Fizyki Molekularnej (obecnie Pracownia Spektrometrii Mas) Instytutu Fizyki na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej, umożliwiło to stworzenie zespołu badawczego dysponującego sprzętem i umiejętnościami pracowników trzech jednostek. Interdyscyplinarny zespół badawczy, w skład którego weszli pracownicy Zakładu Patofizjologii, Katedry i Kliniki Chirurgii Zwierząt z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej realizuje projekty badawcze związane z detekcją i analizą peptydów z próbek zwierzęcych, ze szczególnym uwzględnieniem: NPP z neutrofilowego ekstraktu z krwi świń i królików, z neutrofilowych hodowli komórkowych, płytkowych czynników wzrostowych z żelu bogatopłytkowego (PRP)

otrzymanego od owiec i królików. Zorganizowany zespół badawczy rozpoczął długoletni projekt nad możliwymi zastosowaniami spektrometrii mas do oceny próbek peptydowych, badania tych trzech jednostek pozwoliły nie tylko na wprowadzenie nowych metod w detekcji peptydów niskocząsteczkowych, ale również na poznanie właściwości aktywnych biologicznie peptydów i ich możliwej użyteczności klinicznej. Zdobyta wiedza będzie popularyzowana na specjalistycznych sympozjach, posiedzeniach towarzystw naukowych, w tym Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego oraz posłuży do opracowania monografii z możliwością włączenia do podręcznika akademickiego. Uzyskane wyniki będą też podstawą do opracowywania nowych strategii terapeutycznych.

Badania kierowanego przeze mnie zespołu zaowocowały szeregiem publikacji w czasopismach z zakresu nauk weterynaryjnych, biotechnologicznych oraz fizyki. Wyniki tej współpracy to 6 prac (Załącznik 3 I B 1, 3, 4, 5, II A 12 i 14) opublikowanych w zagranicznych czasopismach z listy JCR o łącznym IF=8,971 (142 pkt.) oraz 1 oddana do druku, ponadto 6 komunikatów (Załącznik 4 B: 9,10,11,13,15,16) i doniesień referowanych na konferencjach i spotkaniach naukowych. Opublikowane prace nagrodzono dwiema nagrodami zespołowymi, otrzymałam też jedną nagrodę indywidualną.

Pełny wykaz opublikowanych przeze mnie prac naukowych znajduje się w załączniku nr 3 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Szczegółowe informacje o dorobku dydaktycznym i popularyzatorskim, współpracy naukowej oraz innej działalności (wg Dz. U. Nr 196, poz. 1165) zebrałam i przedstawiłam w załączniku nr 4 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

Lublin, dnia

22.06.17. Joanna Wesoły-Sypowicz

