

## **AUTOREFERAT**

**dr n. wet. Joanna Małaczewska**

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2015

**1. Imię i nazwisko:** Joanna Małaczewska

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

2.1. lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, rok 1999

2.2. doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, rok 2003, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ dimeru lizozymu (KLP-602) i methisoprinolu na namnażanie się wybranych wirusów w hodowlach komórek i w zarodkach kurzych”

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

3.1. 01.04.1999 – 18.06.2003 – Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (od 1.09.1999 Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie), doktorant

3.2. 15.10.2003 – 19.12.2003 – Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, starszy technik

3.3. 20.12.2003 – 29.12.2004 – Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent

3.4. 30.12.2004 – do chwili obecnej – Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt

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

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji, pod wspólnym tytułem:

**WPLYW KOMERCYJNYCH NANOKOLOIDÓW SREBRA I ZŁOTA NA  
WYBRANE PARAMETRY UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO MYSZY**

## 4.2. Lista publikacji składających się na cykl

| Lp.  | Artykuł   | IF    | Punkty MNiSW |
|--|---|-------|--------------|
| 1.   | <b>Małaczewska J:</b> Effect of silver nanoparticles on splenocyte activity and selected cytokine levels in the mouse serum. Bull Vet Inst Pulawy, 2011, 55 (2), 317-322.   | 0,414 | 20           |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100%         |   |       |              |
| 2.   | <b>Małaczewska J:</b> The effect of silver nanoparticles on splenocyte activity and selected cytokine levels in the mouse serum at early stage of experimental endotoxemia. Pol J Vet Sci, 2011, 14 (4), 597-604. | 0,565 | 20           |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100%         |   |       |              |
| 3.   | <b>Małaczewska J:</b> The splenocyte proliferative response and cytokine secretion in mice after 28-day oral administration of silver nanocolloid. Pol J Vet Sci, 2014, 17 (1), 27-35.                            | 0,712 | 20           |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie rycin, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100%         |   |       |              |
| 4.   | <b>Małaczewska J:</b> The <i>in vitro</i> effect of commercially available noble metal nanocolloids on the splenocyte proliferative response and cytokine production in mice. Pol J Vet Sci, 2014, 17 (1), 37-45. | 0,712 | 20           |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie rycin i tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100% |   |       |              |
| 5.   | <b>Małaczewska J:</b> Effect of 28-day oral administration of silver nanocolloid on the peripheral blood leukocytes in mice. Pol J Vet Sci, 2014, 17 (2), 263-273.  | 0,712 | 20           |

|  |  |              |            |
|--|--|--------------|------------|
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie rycin i tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100% |  |              |            |
| <b>6.</b>  | <b>Małaczewska J:</b> Wpływ nanocząstek metali szlachetnych na układ immunologiczny zwierząt. <i>Med Weter</i> , 2014, 70 (4), 204-208.  | 0,196        | 15         |
| Wkład własny: przegląd dostępnej literatury, dotyczącej tematu, napisanie publikacji – 100%  |  |              |            |
| <b>7.</b>  | <b>Małaczewska J:</b> The splenocyte proliferative response and cytokine secretion in mice after oral administration of commercial gold nanocolloid. <i>Pol J Vet Sci</i> , 2015, 18 (1), 181-189. | 0,712        | 20         |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie rycin i tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100% |  |              |            |
| <b>8.</b>  | <b>Małaczewska J:</b> Effect of oral administration of gold nanocolloid on the peripheral blood leukocytes in mice. <i>Pol J Vet Sci</i> , 2015, 18 (2), DOI 10.1515/pjvs-2015-0036.               | 0,712        | 20         |
| Wkład własny: opracowanie koncepcji badań, określenie celu i metodyki badań, wykonanie wszystkich badań laboratoryjnych, analiza statystyczna uzyskanych wyników i ich interpretacja, przygotowanie rycin i tabel, napisanie publikacji i jej korekta po recenzji – 100% |  |              |            |
| <b>Razem</b>   |  | <b>4,735</b> | <b>155</b> |

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

## Wprowadzenie

Nanotechnologia to prężnie rozwijający się dział nauki o materiałach, zajmujący się tworzeniem i praktycznym wykorzystaniem struktur nie przekraczających wielkością 100 nm. Dzięki małym rozmiarom, zwiększającym stosunek ich powierzchni do objętości, nanocząstki (NPs) zyskują wyższą, w porównaniu z materiałami masowymi, reaktywność i nowe, unikatowe cechy fizyko-chemiczne, przyczyniające się do poszerzenia palety ich zastosowań (Nel i wsp. 2006). Nanocząstki srebra, w związku z ich właściwościami dezynfekującymi, używane są do ochrony różnego rodzaju powierzchni przed kolonizacją bakteryjną, tak w

medycynie, jak i życiu codziennym. Natomiast nanocząstki złota, przez wzgląd na swoje właściwości chemiczne, optyczne i elektromagnetyczne, znajdują liczne zastosowania biomedyczne, m.in. jako biosensory w obrazowaniu komórek nowotworowych, terapii fototermicznej i systemach naczelnego dostarczania leków (Fröhlich i Roblegg 2012, Kim i wsp. 2008, Pelkonen i wsp. 2003, Zhang i wsp. 2010). Popularyzacja nanomateriałów zwiększa ryzyko niezamierzonej ekspozycji organizmu na ich działanie. Co więcej, powszechnie od pewnego czasu dostępne, koloidalne roztwory nanocząstek srebra i złota, zalecane są w medycynie niekonwencjonalnej, nie tylko do zewnętrznej aplikacji, ale także jako suplementy diety, mające korzystnie wpływać m.in. na układ immunologiczny. Entuzjazm tych destynacji bierze źródło z dość powszechnego przekonania o niskiej reaktywności i wysokiej zgodności biologicznej metali szlachetnych, opartego na obserwacjach poczynionych w stosunku do tradycyjnych, masowych form tych pierwiastków. Tymczasem niewielkie rozmiary ułatwiają nanocząstkom penetrację barier biologicznych, a nasilone właściwości oksydacyjne i katalityczne wpływają na ich interakcje z systemami biologicznymi. Wszystko to składa się na, niezbyt gruntownie do tej pory przebadaną, potencjalną toksyczność nanomateriałów.

Ryzyko zdrowotne, po ekspozycji organizmu na nanocząstki, w dużej mierze zależy od stopnia ich absorpcji, na który wpływają dawka, droga wniknięcia i właściwości cząstek, a także ich metabolizmu, wydalania i odpowiedzi immunologicznej organizmu. Wyniki badań przeprowadzonych na gryzoniach dowodzą, że niezależnie od drogi wprowadzenia, nanocząstki srebra i złota szybko dostają się do krwioobiegu i ulegają systemowej dystrybucji, a ich eliminacja z organizmu jest wolna. Głównymi miejscami akumulacji NPs są narządy z rozbudowanym układem siateczkowo-śródbłonkowym, takie jak wątroba i śledziona, co związane jest z ich funkcją „czyścicieli” krwi obwodowej z obcych cząstek. Zarówno w narządach limfoidalnych, jak i w innych tkankach, nanocząstki srebra i złota gromadzą się głównie we wnętrzu komórek fagocytujących. Unieruchomione w fagolizosomach, nie mogą zostać zniszczone przez komórki, chronicznie je stymulując. Mediatory zapalne, uwalniane przez aktywowane makrofagi narządowe, mogą z kolei wpływać na inne populacje komórek i wywoływać systemową odpowiedź immunologiczną (Balasubramanian i wsp. 2010, Chen i wsp. 2009, Hillyer i Albrecht 2001, Jovanović i Palić 2012, Kim i wsp. 2008, Lankveld i wsp. 2010, Park i wsp. 2010, Pelkonen i wsp. 2003, Sonavane i wsp. 2008, Stebounova i wsp. 2011, Takenaka i wsp. 2000, 2001). Jednak nie tylko fagocyty narządowe mogą stanowić potencjalny cel oddziaływania nanocząstek. Ponieważ ich transport do narządów docelowych odbywa się drogą krwi, możliwe są również interakcje NPs z krwinkami i/lub ich wpływ na hematopoezę. Zmiany parametrów hematologicznych i obecność nanocząstek we wnętrzu leukocytów i

komórek szpiku gryzoni otrzymujących Ag i AuNPs zdają się potwierdzać te przypuszczenia (De Jong i wsp. 2013, Ji i wsp. 2007, Kim i wsp. 2008, Zhang i wsp. 2010).

Tymczasem badań, dotyczących wpływu nanocząstek metali szlachetnych na układ immunologiczny lub jego składowe, wykonano do tej pory stosunkowo niewiele. Większość z nich przeprowadzono w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem tej samej, ustabilizowanej linii mysich makrofagów (RAW 264.7), a pomimo tego ich autorzy uzyskiwali często odmienne lub wręcz sprzeczne wyniki. Jedynym faktem, co do którego badacze są zgodni, jest zdolność makrofagów do szybkiego pochłaniania nanocząstek srebra i złota. Brak jednak zgodności, co do efektu, jaki wywiera na fagocyty pochłonięcie nanocząstek. Część prac wskazuje na nieimmunogenność nanocząstek srebra i złota, inne dowodzą ich działania przeciwzapalnego, manifestującego się hamowaniem produkcji reaktywnych form tlenu i azotu oraz cytokin prozapalnych przez pobudzone makrofagi (Pissuwan i wsp. 2013, Shin i wsp. 2007, Shukla i wsp. 2005, Sumbayev i wsp. 2013, Tsai i wsp. 2012, Yen i wsp. 2009, Zhang i wsp. 2011). Są wreszcie i doniesienia o aktywacji komórek i działaniu prozapalnym nanocząstek, przy czym częściej działanie takie wykazywało nanosrebro, niż nanozłoto (Greulich i wsp. 2011, Lee i wsp. 2012, Leroy i wsp. 2011, Martínez-Gutierrez i wsp. 2012, Park i wsp. 2010, Takenaka i wsp. 2000, Yang i wsp. 2012, Yen i wsp. 2009). Modelem rzadko wykorzystywanym w badaniach nanocząstek, choć lepiej oddającym realną reaktywność komórek układu immunologicznego od ustabilizowanych linii komórkowych, są pierwotne hodowle komórek, pozyskanych bezpośrednio z organizmu. Nawet jednak w ich przypadku, wyniki badań immunotoksykologicznych *in vitro* nie muszą przekładać się na realny wpływ substancji na bardziej skomplikowany układ biologiczny, jakim jest żywy organizm. Szerzej zagadnienia te zostały omówione w artykule przeglądowym, dotyczącym wpływu nanocząstek metali szlachetnych na układ immunologiczny zwierząt (**publikacja nr 6** cyklu habilitacyjnego).

Badania dedykowane ewaluacji właściwości immunotropowych nanocząstek metali szlachetnych na modelu zwierzęcym należą wprawdzie do rzadkości, wyraźnie jednak wskazują, że nie pozostają one obojętne dla układu odpornościowego. Wpływ nanozłota na odpowiedź immunologiczną zwierząt opisują tylko dwie prace. W badaniach Dykman i wsp. (2004) nanocząstki złota, podawane królikom, szczurom i myszom w iniekcji razem z haptenami lub kompletnymi antygenami, wywierały lepszy efekt adiuwacyjny, niż kompletny adiuwant Freund, pozwalając na uzyskanie wyższych mian bardziej aktywnych przeciwciał, przy mniejszej ilości antygeny, niezbędnej do uodpornienia. Ponadto u zwierząt otrzymujących nanozłoto obserwowano także wzrost aktywności fagocytarnej i bójczej fagocytów krwi obwodowej. Natomiast w badaniach Joseph i wsp. (2013) nanocząstki złota pokryte roślinnym

polisacharydem PST, po 14 dniach iniekcji dootrzewnowych, zwiększały aktywność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej i odsetki komórek CD3+, CD4+ i CD8+, oraz ilość komórek szpiku w kości udowej myszy. Wyniki te wskazują na właściwości immunostymulujące AuNPs, choć w przypadku drugiej z cytowanych prac nie wiadomo w jakim stopniu uzyskany efekt wywołany został przez same nanocząstki, a w jakim przez polisacharyd o potwierdzonych właściwościach immunotropowych. Z kolei trzy dostępne pozycje literatury, opisujące wpływ nanocząstek srebra, podawanego gryzoniom drogą alimentarną lub w iniekcji, dowodzą raczej ryzyka indukcji nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej przez nanosrebro. Park i wsp. (2010), u myszy otrzymujących cząstki drogą alimentarną przez okres 2-4 tygodni, zanotowali wzrost odsetka komórek B, NK i NKT oraz spadek stosunku limfocytów T CD4+/CD8+ we krwi, a zmianom tym towarzyszył zwiększony poziom IgE i cytokin w surowicy, z dominacją odpowiedzi typu Th2. Uzyskane wyniki wskazują, zdaniem autorów, na potencjalne ryzyko wywołania odpowiedzi alergicznej przez nanosrebro. Do podobnych wniosków doszli Xu i wsp. (2013) badając działanie adiuwacyjne nanocząstek srebra u myszy immunizowanych dootrzewnowo lub podskórnie owoalbuminą lub bydlęcą albuminą. Nanosrebro podawane w czasie immunizacji razem z białkami wywierało efekt porównywalny do działania klasycznych adiuwantów (CFA i Alum), głównie w zakresie odpowiedzi typu Th2, a obserwowany zwiększony stosunek IgG1/IgG2a i wzrost poziomu IgE mogły wiązać się z indukcją nadwrażliwości. Z kolei De Jong i wsp. (2013), u szczurów po dożylniej administracji nanosrebra, zanotowali niemal całkowitą supresję aktywności komórek NK w śledzionie, co może wskazywać na dysregulację immunologiczną, zwiększającą predyspozycje organizmu do schorzeń wirusowych i nowotworzenia.

Korzystne, przeciwzapalne działanie nanocząstek srebra i złota wykazano jedynie w badaniach przeprowadzonych na zwierzęcych modelach ran, oparzeń i schorzeń zapalnych. Lokalna aplikacja nanocząstek obniżała poziom mediatorów zapalenia i markerów oksydacyjnego uszkodzenia tkanek w miejscu objętym procesem zapalnym, dzięki czemu uzyskiwano dobre efekty kliniczne (Bhol i Schechter 2005, Dohnert i wsp. 2012, Nadworny i wsp. 2008, Pedersen i wsp. 2009, Pereira i wsp. 2012, Sumbayev i wsp. 2013, Tian i wsp. 2007, Tsai i wsp. 2007, Victor i wsp. 2012, Wright i wsp. 2002). Jednak w przypadku zdrowych osobników, w miejscu swojego wprowadzenia, nanocząstki srebra wywierały efekt prozapalny, objawiający się naciekiem makrofagów i neutrofilii oraz wzmożoną syntezą cytokin prozapalnych (Liu i wsp. 2013, Stebounova i wsp. 2011, Xu i wsp. 2013).

Komercyjne nanokoloidy srebra i złota, cieszące się rosnącą popularnością na rynku parafarmaceutyków, a nie objęte żadną formą reglamentacji, nie były do tej pory badane pod

kątem swojego oddziaływania na układ immunologiczny, mimo iż, paradoksalnie, zalecane są jako suplementy diety stymulujące (nanosrebro) lub wyciszające (nanozłoto) odpowiedź immunologiczną. Jako ksenobiotyki, mogą one wpływać na układ odpornościowy zdrowego organizmu, obniżając jego funkcje albo prowadząc do nadmiernego pobudzenia, czego efektem może być większa zapadalność i cięższy przebieg schorzeń zakaźnych lub dysregulacja immunologiczna, skutkująca rozwojem alergii i chorób autoimmunologicznych (De Jong i Van Loveren 2007). Skąpe, często cząstkowe dane literaturowe, dotyczące właściwości immunotropowych nanocząstek metali szlachetnych, podobnie jak przeciwstawność wyników badań uzyskanych przez różnych autorów stanowią dodatkową zachętę do ich przebadania.

### **Cele badawcze**

Celem badań było określenie wpływu komercyjnych nanokolloidów srebra i złota na układ immunologiczny myszy. Dla osiągnięcia głównego celu badań, zrealizowano następujące cele pośrednie:

- określenie wpływu szerokiego zakresu stężeń nanokolloidów srebra i złota na żywotność, aktywność proliferacyjną i syntezę cytokin przez splenocyty mysie w warunkach *in vitro*
- zbadanie wpływu 7 i 14 dni oralnej administracji różnych stężeń nanokolloidu srebra na aktywność splenocytów i poziom cytokin w surowicy myszy nie poddanych, bądź poddanych eksperymentalnej endotoksemii
- określenie wpływu 28-dniowej oralnej administracji różnych stężeń nanokolloidu srebra na aktywność splenocytów i leukocytów krwi obwodowej oraz kształtowanie się odsetka poszczególnych populacji limfocytów we krwi zwierząt
- zbadanie wpływu różnych stężeń nanokolloidu złota, podawanego drogą alimentarną przez okres 7, 14 lub 28 dni, na aktywność splenocytów i leukocytów krwi obwodowej myszy oraz kształtowanie się odsetka poszczególnych populacji limfocytów we krwi

### **Materialy i metody**

Badania przeprowadzono łącznie na 298 myszach, z czego 48 zwierząt wykorzystano do pozyskania pierwotnych hodowli splenocytów do badań *in vitro*, a na pozostałych 250 przeprowadzono doświadczenia *in vivo*. Badania z użyciem nanokolloidu srebra prowadzono na 10-12 tygodniowych myszach szczepu NMRI, o średniej masie ciała około 30 g, natomiast późniejsze doświadczenie z użyciem nanozłota, na 8-10 tygodniowych myszach szczepu



Balb/c, o średniej masie ciała około 24 g. Zmiana ta spowodowana była reorganizacją zwierzętarni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UW-M w Olsztynie, z której pochodziły zwierzęta. Badanymi preparatami były komercyjne, niejonowe nanokoloidy srebra i złota firmy Nano-Tech Polska o stężeniu 50 ppm, stanowiące roztwór metalicznych nanocząstek wielkości do 5 nm (złoto) lub 10-20 nm (srebro) w wodzie demineralizowanej.

Ponieważ śledziona stanowi jeden z głównych celów oddziaływania nanocząstek po ich wprowadzeniu do organizmu drogą alimentarną, jako model doświadczalny w badaniach *in vitro* wykorzystano pierwotne hodowle splenocytów mysich, lepiej oddające reaktywność komórek organizmu od ustabilizowanych linii komórkowych. Splenocyty, pozyskane od zwierząt metodą wirowania w gradiencie, hodowano w obecności wzrastających stężeń nanokoloidów (0,15 – 10 ppm). Dobór stężeń podyktowany był danymi literaturowymi dotyczącymi tego zagadnienia, jak również wynikami własnych badań wstępnych, przeprowadzonych z użyciem nanokoloidu srebra tego samego producenta (Małaczewska 2010). Komórki kontrolne hodowano w medium bez dodatku nanocząstek. Po 48 godzinach określano wpływ nanocząstek na żywotność komórek w kolorymetrycznym teście redukcji MTT. Ten sam test został użyty do oceny proliferacji limfocytów śledzionowych pod wpływem mitogenów (ConA w przypadku limfocytów T, LPS – limfocytów B) po 72 godzinach hodowli. W supernatancie z 72-godzinnej hodowli splenocytów niestymulowanych lub stymulowanych mitogenami oznaczono również poziomy wybranych cytokin (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  – jako wczesne cytokiny prozapalne, IL-2 – jako główna cytokina limfocytów T, IL-6 – jako centralna cytokina plejotropowa, oraz IL-10 – jako najważniejsza cytokina przeciwzapalna), przy użyciu komercyjnych immunoenzymatycznych zestawów ELISA – Quantikine (R&D Systems). Odczytu wszystkich testów dokonano na czytniku absorbancji Sunrise (Tecan).

W badaniach *in vivo* zwierzęta podzielono na równe grupy, otrzymujące nanokoloidy w trzech różnych stężeniach (0,25; 2,5 lub 25 ppm) w wodzie do picia *ad libitum*, przez okresy 7, 14 lub 28 dni. Ten sposób administracji wybrano dla uniknięcia wpływu na układ immunologiczny długotrwałego stresu, którym byłoby codzienne podawanie badanych preparatów sondą. Uwzględniając ilość wody wypijanej przez zwierzęta przez cały okres doświadczalny, dzienna dawka nanocząstek przy najwyższym stężeniu wynosiła 4-5 mg/kg masy ciała, a dawki kolejne były odpowiednio 10- i 100-krotnie niższe. W związku z faktem, iż producent badanych koloidów proponuje ich dawkowanie w łyżeczkach (2 łyżeczki dziennie koloidu złota, 1-3 łyżeczek koloidu srebra), nie podając ograniczeń długości czasu administracji, masy ciała czy wieku osób zażywających, przy jednoczesnym zapewnieniu o ich całkowitym bezpieczeństwie dla zdrowia zwierząt i człowieka, przy doborze stężeń kierowano

się głównie danymi literaturowymi, jako najwyższe obierając stężenie mogące niekorzystnie wpływać na układ immunologiczny. Tym niemniej najniższa dawka koloidów (40-50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mc) odpowiadała dawce 400-500  $\mu\text{g}$  przyjmowanej przez człowieka o masie ciała 70 kg (z zastosowaniem współczynnika 7, uwzględniającego różnicę stosunku powierzchni do masy ciała), czyli 8-10 ml (około 2 łyżeczek) wyjściowej zawiesiny. W każdym układzie doświadczalnym prowadzono także badania na grupie kontrolnej zwierząt, nie otrzymującej nanocząstek w wodzie do picia. W dniach 7, 14 i 28 równe ilości zwierząt z każdej grupy poddawano narkozie wziewnej z użyciem preparatu AErrane (izofluran, Baxter), skrwawiano metodą punkcji serca i w jałowy sposób pobierano śledziony do dalszych badań.

W pierwszym doświadczeniu z użyciem nanokoloidu srebra, podawanego zwierzętom przez okres 7 lub 14 dni, w dniu poboru prób połowę zwierząt z każdej grupy poddawano eksperymentalnej endotoksemii przez dootrzewną iniekcję niskiej dawki lipopolisacharydu z *E. coli*, w celu określenia wpływu nanosrebra na odpowiedź cytokinową organizmu. W godzinę po wywołaniu endotoksemii pobierano materiał do badań. Po izolacji komórek ze śledziony metodą wirowania z użyciem dwóch różnych gradientów, oznaczano aktywność proliferacyjną limfocytów (jak wyżej) oraz aktywność komórek fagocytujących - w kolorymetrycznych testach RBA (respiratory burst activity, aktywność wybuchu tlenowego) i PKA (potential killing activity, aktywność bójcza). Poziomy cytokin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 oraz IL-12 p70) w surowicy zwierząt określano w testach ELISA (jak wyżej). Odczyty wszystkich testów prowadzono na czytniku absorbancji Sunrise (Tecan). Ponieważ jednak w takim układzie doświadczenia konieczne było użycie większej ilości zwierząt, a oznaczenie poziomu cytokin w surowicy wykluczało przeprowadzenie testów na leukocytach krwi obwodowej, w kolejnych eksperymentach badano odpowiedź cytokinową splenocytów, a krew obwodową zwierząt przeznaczono do oznaczeń cytometrycznych. Tradycyjnie w badaniach immunotoksykologicznych na gryzoniach śledzi się wprawdzie głównie wpływ ksenobiotyków na splenocyty zwierząt, jednak równoległe przeprowadzenie badań na komórkach pozyskanych z krwi i śledziony daje lepszy wgląd w mechanizm ich działania, ponieważ leukocyty krwi bywają bardziej wrażliwym wskaźnikiem wczesnej toksyczności, podczas gdy splenocyty, stanowiące główny cel immunotoksykantów pokarmowych, reagują zwykle później.

U myszy otrzymujących nanokoloid srebra przez okres 28 dni lub nanokoloid złota przez okresy 7, 14 i 28 dni, oznaczano odpowiedź proliferacyjną wyizolowanych limfocytów krwi obwodowej i splenocytów oraz syntezę wybranych cytokin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10 i IFN- $\gamma$ ) przez splenocyty (jak wyżej). Pełna krew obwodowa zwierząt posłużyła do immunofenotypowania i oznaczenia aktywności fagocytów. Odsetki poszczególnych populacji

limfocytów (B, T, NKT i NK) oraz subpopulacji limfocytów T (CD4+ i CD8+) we krwi obwodowej zwierząt oznaczano metodą cytometrii przepływową, przy użyciu przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami. Za marker komórek B przyjęto cząstkę CD19, komórek T – CD3, komórek NK i NKT – CD49b. Aktywność fagocytarną i nasilenie wybuchu tlenowego granulocytów i monocytów krwi obwodowej zwierząt oznaczano metodą cytometrii przepływową, z wykorzystaniem komercyjnych zestawów Phagotest i Phagoburst (Orpegen Pharma). Wszystkie oznaczenia cytometryczne wykonano na cytometrze FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences) z użyciem oprogramowania FACSDiva, wersja 6.1.3. (BD Biosciences). Analizy danych cytometrycznych dokonano w programie FlowJo (Tree Star Inc.).

Wyniki wszystkich badań przedstawiono jako średnie  $\pm$  SD. Analizy statystycznej dokonano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, natomiast istotność różnic między grupami weryfikowano przy pomocy testu Bonferroni, z użyciem oprogramowania GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Za statystycznie istotne uznano różnice przy  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  lub  $p < 0.001$ .

Szczegółowy opis metod został zawarty w poszczególnych pracach składających się na cykl, stanowiący osiągnięcie naukowe autorki (**publikacje 1-5, 7,8**).

## **Omówienie wyników**

### **Wpływ komercyjnych nanokolloidów srebra i złota na aktywność splenocytów mysich w warunkach *in vitro***

Nanokolloid srebra w stężeniach od 1,25 do 10 ppm znacząco obniżał żywotność komórek oraz ich aktywność - zdolność śledzionowych limfocytów T i B do proliferacji pod wpływem mitogenów oraz stymulowaną mitogenami syntezę cytokin przez splenocyty. Żadne z nietoksycznych stężeń koloidu srebra nie wpływało na syntezę cytokin, zarówno przez komórki niestymulowane, jak i stymulowane mitogenami. Obserwowano jednak wzmożoną proliferację limfocytów B, stymulowanych LPS, w obecności stężenia 0,3 ppm.

W przypadku nanokolloidu złota jedynym stężeniem powodującym niewielki spadek żywotności komórek (o 15,8 %) było stężenie najwyższe (10 ppm), przy którym obserwowano również spadek syntezy IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  oraz wzrost produkcji IL-6 przez komórki stymulowane mitogenami. Natomiast dość szeroki zakres nietoksycznych stężeń nanozłota (0,15 – 1,25 ppm) obniżał syntezę IL-2 przez splenocyty stymulowane ConA. Żadne ze stężeń koloidu złota nie wpływało na syntezę cytokin przez komórki niestymulowane mitogenami, a stężenie 0,3 ppm, podobnie jak w przypadku nanosrebra, nasilało proliferację limfocytów B.

Podsumowując:

- nanokoloid srebra cechował się wysoką cytotoksycznością w stosunku do splenocytów mysich, podczas gdy toksyczność nanokoloidu złota była bardzo niska, co potwierdza jego wyższą zgodność biologiczną
- spadek syntezy IL-2 w obecności niskich stężeń koloidu złota świadczy o jego wpływie na limfocyty T w warunkach *in vitro*
- stymulacja proliferacji splenocytów aktywowanych LPS przez niskie stężenie obu koloidów, przy jednoczesnym braku synergistycznego z LPS działania w zakresie syntezy cytokin, wskazuje na bezpośrednie interakcje nanocząstek z limfocytami B w warunkach *in vitro*

Szczegółowo zagadnienia te zostały omówione w **publikacji nr 4** omawianego cyklu prac

**Wpływ 7 i 14 dni oralnej administracji nanokoloidu srebra na aktywność splenocytów i poziom cytokin w surowicy myszy oraz wczesną odpowiedź immunologiczną zwierząt poddanych eksperymentalnej endotoksemii**

Tylko najniższe stężenie nanokoloidu srebra wpływało na układ immunologiczny zdrowych myszy po 7 dniach jego podawania. Wpływ ten przejawiał się stymulacją wybuchu tlenowego komórek fagocytujących oraz wzmożoną proliferacją limfocytów T, izolowanych ze śledziony zwierząt. Ponadto w surowicy myszy otrzymujących to stężenie koloidu mierzalny był poziom IL-6 (nieznacznie powyżej progu wykrywalności), podczas gdy w pozostałych grupach nie wykryto żadnej z oznaczanych cytokin.

Po kolejnym tygodniu podawania nanokoloidu, jego najniższa dawka, wcześniej stymulująca fagocyty śledzionowe, zaczęła wywierać działanie przeciwne – hamować aktywność bójczą i zdolność do wybuchu tlenowego, zaś aktywność proliferacyjna limfocytów tej grupy zwierząt wyrównała się z aktywnością komórek grupy kontrolnej. Wzmożoną proliferację limfocytów B izolowanych ze śledziony zanotowano natomiast u zwierząt otrzymujących środkową dawkę nanosrebra. Ponadto wszystkie stężenia nanokoloidu stymulowały syntezę IL-6, a dwie niższe dawki także IL-12.

U zwierząt poddanych eksperymentalnej endotoksemii, po 7-dniowej administracji nanosrebra, obserwowano synergistyczne działanie nanocząstek z lipopolisacharydem bakteryjnym, w zakresie wzmaganie aktywności komórek fagocytujących i syntezy wczesnych cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) oraz przeciwzapalnej IL-10. Środkowa dawka nanosrebra dodatkowo stymulowała proliferację śledzionowych komórek T i B.

Po kolejnym tygodniu podawania preparatu, wszystkie stężenia nanocząstek nadal wzmagały syntezę cytokin prozapalnych u zwierząt poddanych endotoksemii, ale wzmogoną produkcję przeciwzapalnej IL-10 obserwowano tylko w grupie otrzymującej najwyższą dawkę koloidu. Aktywność komórek fagocytujących zwierząt otrzymujących nanosrebro, zwłaszcza w środkowej dawce, spadła poniżej poziomu notowanego w grupie kontrolnej zwierząt, poddanej endotoksemii.

Reasumując:

- efekt działania nanokoloidu srebra, podawanego drogą alimentarną przez okres 1-2 tygodni, na układ immunologiczny myszy nie był proporcjonalny do jego dawki
- krótkoterminowa administracja niskiej dawki nanokoloidu zdrowym zwierzętom wywierała efekt immunostymulujący w stosunku do splenocytów mysich, lecz przedłużające się podawanie tej dawki obniżało aktywność narządowych komórek fagocytujących, co wskazuje na ich wyczerpanie czynnościowe, związane z długotrwałą stymulacją przez nanocząstki
- długoterminowa administracja nanokoloidu srebra zdrowym osobnikom, może zatem niekorzystnie wpływać na nieswoistą odpowiedź immunologiczną organizmu, stanowiącą pierwszą linię obrony w schorzeniach bakteryjnych
- niezależnie od dawki i czasu, nanokoloid srebra podawany drogą alimentarną, nasilał działanie prozapalne endotoksyn bakteryjnych, co wskazuje na ryzyko zaostrzenia objawów schorzeń zakaźnych/zapalnych, zwłaszcza systemowych, u osób przyjmujących go jako suplement diety

Powyższe kwestie zostały szczegółowo przedstawione w **publikacjach nr 1 i 2** cyklu

### **Wpływ 28-dniowej oralnej administracji nanokoloidu srebra na aktywność splenocytów i leukocytów krwi obwodowej myszy**

Wszystkie testowane stężenia nanokoloidu srebra wpływały w istotny sposób na aktywność splenocytów mysich, po 28 dniach ich podawania drogą alimentarną, przy czym efekt działania poszczególnych stężeń znacząco się różnił. Najniższe stężenie preparatu obniżało aktywność proliferacyjną limfocytów T, podczas gdy dwa wyższe silnie stymulowały śledzionowe limfocyty B do podziałów. Wszystkie dawki modulowały także syntezę cytokin przez splenocyty, zarówno niestymulowane, jak i stymulowane mitogenem. W tym przypadku jednak dwie niższe dawki preparatu działały podobnie, a najwyższa w odmienny sposób. Niższe stężenia stymulowały syntezę wszystkich oznaczanych cytokin (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) przez niestymulowane komórki, a po stymulacji splenocytów LPS

powodowały wzrost syntezy wczesnych cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ), równocześnie znacząco obniżając produkcję przeciwzapalnej IL-10. Tymczasem dawka najwyższa obniżała syntezę IL-6, nie wywierając wpływu na poziom pozostałych cytokin w komórkach niestymulowanych, a po aktywacji splenocytów obniżała syntezę cytokin prozapalnych, jednocześnie znacząco stymulując produkcję przeciwzapalnej IL-10.

Cały zakres badanych stężeń nanosrebra wywierał również istotny wpływ na leukocyty krwi obwodowej myszy. Dwie niższe dawki powodowały wzrost odsetka podwójnie pozytywnych limfocytów T CD4+CD8+ oraz spadek odsetka komórek NKT i NK. U zwierząt otrzymujących najwyższą dawkę obserwowano zaś wzrost indeksu CD4+/CD8+. Na odpowiedź proliferacyjną limfocytów wpływała tylko dawka najniższa, obniżając aktywność zarówno limfocytów T, jak i B. Natomiast wszystkie dawki oddziaływały na aktywność fagocytów krwi obwodowej, zwiększając nasilenie fagocytozy w granulocytach oraz odsetek granulocytów i monocytów ulegających wybuchowi tlenowemu po pochłonięciu bakterii.

Rekapitulując:

- efekt działania nanokoloidu srebra na splenocyty i leukocyty krwi obwodowej myszy, po jego 28-dniowej alimentarnej administracji, nie był proporcjonalny do dawki preparatu
- niższe dawki nanosrebra działały immunostymulująco na nieaktywowane i silnie prozapalnie na pobudzone splenocyty, zatem ich administracja może nasilać objawy schorzeń zapalnych
- najwyższa dawka koloidu srebra wywierała działanie przeciwzapalnie w stosunku do splenocytów mysich, wynikające z pobudzenia limfocytów do produkcji wysokich stężeń przeciwzapalnej IL-10
- silna stymulacja syntezy IL-10, korzystna w ostrych chorobach bakteryjnych, na dłuższą metę może utrudniać eliminację patogenów z organizmu, a nawet powodować dysregulację odpowiedzi immunologicznej, z obniżeniem odporności typu komórkowego, więc długotrwałe przyjmowanie wysokich dawek nanokoloidu srebra może być niekorzystne w przewlekłych schorzeniach zapalnych
- wszystkie stężenia nanosrebra pobudzały aktywność fagocytów krwi obwodowej, co jest zjawiskiem pożądanym we wczesnych etapach zakażeń bakteryjnych, jednak chroniczna stymulacja wybuchu tlenowego może prowadzić do nadmiernej odpowiedzi, skutkującej oksydacyjnym uszkodzeniem tkanek, w związku z czym długotrwałe przyjmowanie nanokoloidu srebra może mieć negatywne skutki w przewlekłych schorzeniach zapalnych
- zmiany fenotypowe populacji limfocytów T, NKT i NK po długotrwałym przyjmowaniu nanokoloidu srebra mogą wiązać się z ryzykiem nieprawidłowości w odpowiedzi typu

komórkowego, szczególnie w przypadku niskiego stężenia nanocząstek, hamującego dodatkowo aktywność proliferacyjną limfocytów T.

Dokładne omówienie powyższych zagadnień zawarto w **publikacjach nr 3 i 5** cyklu

### **Wpływ oralnej administracji nanokoloidu złota na aktywność splenocytów i leukocytów krwi obwodowej myszy**

Począwszy od 14 dnia podawania nanokoloidu złota, w grupie myszy otrzymującej jego średnią dawkę zaobserwowano wzmożoną odpowiedź proliferacyjną śledzionowych limfocytów T i B. Natomiast u myszy otrzymujących najwyższą dawkę preparatu, po 4 tygodniach, proliferacja splenocytów znacząco się obniżyła. Jedynie najniższa dawka koloidu nie wpływała na proliferację komórek przez cały okres doświadczenia. Wszystkie dawki nanozłota modulowały natomiast syntezę cytokin przez splenocyty niestymulowane mitogenami. Komórki zwierząt otrzymujących najwyższą dawkę już po 7 dniach wydzielały znacząco wyższe stężenia cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i IL-2), niż komórki grupy kontrolnej. Efekt taki utrzymał się do 14 dnia doświadczenia, a po 28 dniach, poziom IL-2 znacząco spadł, przy utrzymującym się wysokim poziomie pozostałych cytokin. Splenocyty myszy otrzymujących najniższą dawkę koloidu, reagowały w podobny sposób, jednak dopiero od 14 dnia doświadczenia. Natomiast w grupie otrzymującej środkową dawkę AuNPs obserwowano spadek syntezy wszystkich cytokin, w porównaniu z grupą kontrolną. Również odpowiedź cytokinowa splenocytów po stymulacji mitogenami była modulowana w różny sposób przez poszczególne dawki koloidu. Komórki grupy otrzymującej najniższą dawkę nanocząstek, po początkowym spadku syntezy IL-6 i IL-10 w 7 dniu doświadczenia, w 14 dniu reagowały nasiloną produkcją IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6, a od 28 dnia dodatkowo znaczącym obniżeniem syntezy IL-2. Najwyższa dawka AuNPs, mimo wzmagania syntezy cytokin prozapalnych w komórkach niestymulowanych, w początkowym okresie nie wpływała na odpowiedź cytokinową splenocytów stymulowanych mitogenami. W dniu 14 powodowała jedynie istotny wzrost poziomu przeciwzapalnej IL-10. Jednak po kolejnych dwóch tygodniach, komórki tej grupy reagowały już wzmożoną produkcją prozapalnych IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  oraz IL-6, jak również spadkiem syntezy IL-2, podobnie jak komórki grupy otrzymującej najniższą dawkę koloidu. Ponownie odpowiedź splenocytów zwierząt otrzymujących środkową dawkę preparatu, różniła się od pozostałych dwóch grup. Dawka ta wzmagala syntezę IL-2, obniżając poziomy wszystkich pozostałych cytokin.

Wpływ nanokoloidu złota na leukocyty krwi obwodowej zwierząt był nieco słabiej wyrażony. Przez cały okres doświadczenia nie obserwowano żadnych różnic między grupami

w odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów, a do 14 dnia doświadczenia również w odsetkach poszczególnych populacji limfocytów krwi obwodowej. Dopiero po 28 dniach administracji środkowa dawka nanozłota powodowała u zwierząt istotny wzrost odsetka limfocytów B i podwójnie pozytywnych limfocytów T CD4+CD8+. Dwie skrajne dawki preparatu nie wpływały na skład fenotypowy limfocytów krwi obwodowej przez cały okres obserwacji. Najsilniej zaznaczał się wpływ nanozłota na aktywność fagocytów krwi obwodowej, szczególnie po krótkim okresie jego administracji, w grupie otrzymującej najniższą dawkę. Zwiększała ona odsetek komórek fagocytujących i nasilenie fagocytozy w poszczególnych komórkach, jak również odsetek komórek ulegających wybuchowi tlenowemu, zarówno w obrębie granulocytów, jak i monocytów. W granulocytach wzrastało również nasilenie wybuchu tlenowego w poszczególnych komórkach. Jednak po kolejnym tygodniu doświadczenia obserwowano w tej grupie już tylko zwiększony odsetek granulocytów fagocytujących, a po 28 dniach wszystkie badane parametry nie odbiegały od notowanych w kontrolnej grupie zwierząt. W przypadku grup otrzymujących wyższe dawki nanozłota zanotowano tylko wzrost odsetka granulocytów ulegających wybuchowi tlenowemu po 7 dniach, a pozostałe parametry nie ulegały istotnym zmianom przez cały okres eksperymentu.

Podsumowując:

- działanie nanokoloidu złota na układ immunologiczny myszy nie było proporcjonalne do jego stężenia
- nanokoloid złota, podawany myszom drogą alimentarną, wywierał silniejszy wpływ na komórki izolowane ze śledziony zwierząt, niż na leukocyty ich krwi obwodowej, co jest typowe dla ksenobiotyków pokarmowych
- wpływ nanozłota na aktywność splenocytów ulegał nasileniu i pewnym modyfikacjom wraz z wydłużaniem czasu jego administracji
- tradycyjne preparaty na bazie złota jonowego stosowane są w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów jako leki przeciwzapalne; w przypadku badanego koloidu jedynie jego środkowa dawka wywierała efekt przeciwzapalny w stosunku do pobudzonych splenocytów mysich, podczas gdy dwie skrajne działały prozapalnie, zatem istotny jest staranny dobór dawki nanocząstek, przy ich ewentualnym stosowaniu terapeutycznym
- znaczący wpływ wszystkich stężeń koloidu złota na syntezę IL-2 świadczy nie tylko o jego potencjalnym oddziaływaniu na swoistą odpowiedź typu komórkowego, ale także na mechanizmy regulacji immunologicznej, stanowiące istotną funkcję biologiczną tej cytokiny



- ponieważ zmianom w syntezie IL-2 nie towarzyszył analogiczny wpływ na poziom IFN- $\gamma$ , nanozłoto nie działało na efektorowe limfocyty Th1, lecz na którąś z niewyspecjalizowanych populacji komórek T (naiwne, pre-Th1 lub prekursorowe komórki Thpp)
- przejściowy wpływ nanokoloidu na aktywność fagocytów krwi obwodowej zwierząt zdaje się świadczyć o możliwości przystosowania się tych komórek do przedłużającej się obecności nanocząstek w organizmie
- jednak zmiany fenotypowe limfocytów, obserwowane dopiero po 28 dniach podawania koloidu, mogą być dowodem wyczerpania mechanizmów kompensacyjnych i dysregulacji układu immunologicznego w wyniku chronicznego kontaktu z nanocząstkami złota

Szczegółowa analiza powyższych wyników została zawarta w **publikacjach 7 i 8** cyklu

### **Wnioski**

- Komercyjny nanokoloid złota cechuje wyższa zgodność biologiczna od nanokoloidu srebra. Świadczy o tym jego niska cytotoksyczność wobec komórek układu immunologicznego w warunkach *in vitro*, a także później występujący, słabiej wyrażony i podlegający częściowej rewersji wpływ na układ immunologiczny zwierząt.
- Sposób oddziaływania obu koloidów na splenocyty mysie w warunkach *in vitro* znacząco różni się od ich wpływu na komórki immunokompetentne zwierząt otrzymujących je drogą oralną, zatem badania *in vitro* nie odzwierciedlają realnego wpływu nanokoloidów srebra i złota na układ immunologiczny.
- Obydwa typy nanocząstek wykazują właściwości immunotropowe, a ich wpływ na układ immunologiczny zwierząt narasta i ulega modyfikacjom wraz z wydłużaniem czasu administracji, przy czym różne stężenia tego samego koloidu mogą wywierać przeciwny wpływ na aktywność komórek immunokompetentnych.
- Niekontrolowane przyjmowanie nanokoloidów srebra i złota, jako suplementów diety, wiąże się z ryzykiem zaburzenia prawidłowej odpowiedzi immunologicznej u osób zdrowych, zaś u chorych zaostrzenia przebiegu schorzeń zapalnych/zakaźnych.
- Komercyjne nanokoloidy srebra i złota mogłyby znaleźć zastosowanie w modulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu, w przebiegu określonych schorzeń, jednak dopiero po niezwykle precyzyjnym doborze dawek i okresów administracji.

## **Piśmiennictwo**

- Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong CN, Yu LE, Ong WY (2010) Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials*, 31: 2034-2042.
- Bhol KC, Schechter PJ (2005) Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol* 152: 1235-1242.
- Chen YS, Hung YC, Liau I, Huang GS (2009) Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, 4: 858-864.
- De Jong WH, Van Der Ven LTM, Sleijffers A, Park MVDZ, Jansen EHJM, Van Loveren H, Vandebriel RJ (2013) Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials* 34: 8333-8343.
- De Jong WH, Van Loveren H (2007) Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. *Methods*, 41: 3-8.
- Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno AI, De Souza CT, Paula MM, Luciano TF (2012) Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. *Int J Nanomedicine*, 7: 1651-1657.
- Dykman LA, Sumaroka MV, Staroverov SA, Zaitseva IS, Bogatyrev VA (2004) Immunogenic properties of the colloidal gold. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 1: 86-91.
- Fröhlich E, Roblegg E (2012) Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*, 291: 10-17.
- Greulich C, Diendorf J, Gessmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, Schildhauer TA, Epple M, Köller M (2011) Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomater* 7: 3505-3514.
- Hillyer JF, Albrecht RM (2001) Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*, 90: 1927-1936.
- Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, Shin JH, Sung JH, Song KS, Yu IJ (2007) Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhal Toxicol* 19: 857-871.
- Joseph MM, Aravind SR, Varghese S, Mini S, Sreelekha TT (2013) PST-Gold nanoparticle as an effective anticancer agent with immunomodulatory properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 104: 32-39.
- Jovanović B, Palić D (2012) Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish - review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat Toxicol* 118-119: 141-151.
- Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, Yu IJ (2008) Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley Rats. *Inhal Toxicol* 20: 575-583.
- Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de Jong A, Noorlander CW, Van Eijkeren JC, Geertsma RE, De Jong WH (2010) The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* 31: 8350-8361.

- Lee JY, Park W, Yi DK (2012) Immunostimulatory effects of gold nanorod and silica-coated gold nanorod on RAW 264.7 mouse macrophages. *Toxicol Lett*, 209: 51-57.
- Leroy P, Sapin-Minet A, Pitarch A, Boudier A, Tournebize J, Schneider R (2011) Interactions between gold nanoparticles and macrophages: activation or inhibition? *Nitric Oxide*, 25: 54-56.
- Liu H, Yang D, Yang H, Zhang H, Zhang W, Fang Y, Lin Z, Tian L, Lin B, Yan J, Xi Z (2013) Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three sterilization nanoparticles: silver, zinc oxide and titanium dioxide. *J Hazard Mater* 248-249: 478-486.
- Małaczewska J (2010) The *in vitro* effect of silver nanoparticles on the viability and proliferative response of mice peripheral blood mononuclear cells and splenocytes. *Med Weter* 66: 847-851.
- Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Vanden Hoek A, Sánchez EM, Reiner NE, Gaynor EC, Pryzdial EL, Conway EM, Orrantia E, Ruiz F, Av-Gay Y, Bach H (2012) Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine* 8: 328-336.
- Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE (2008) Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine* 4: 241-251.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622-627.
- Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K (2010) Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol* 30: 162-168.
- Pedersen MO, Larsen A, Pedersen DS, Stoltenberg M, Penkowa M (2009) Metallic gold reduces TNF alpha expression, oxidative DNA damage and pro-apoptotic signals after experimental brain injury. *Brain Res*, 1271: 103-113.
- Pelkonen KH, Heinonen-Tanski H, Hänninen OO (2003) Accumulation of silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology* 186: 151-157.
- Pereira DV, Petronilho F, Pereira HR, Vuolo F, Mina F, Possato JC, Vitto MF, de Souza DR, da Silva L, da Silva Paula MM, de Souza CT, Dal-Pizzol F (2012) Effects of gold nanoparticles on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53: 8036-8041.
- Pissuwan D, Kumagai Y, Smith NI (2013) Effect of surface-modified gold nanorods on the inflammatory cytokine response in macrophage cells. *Part Part Syst Charact*, 30: 427-433.
- Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS (2007) The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 7: 1813-1818.
- Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhone RR, Sastry M (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21: 10644-10654.
- Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 66: 274-280.
- Stebounova LV, Adamcakova-Dodd A, Kim JS, Park H, O'Shaughnessy PT, Grassian VH, Thorne PS (2011) Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. *Part Fibre Toxicol* 8:5.

*Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego*

- Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, Bonsall DR, Varani L, Rossi F, Calzolari L (2013) Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 $\beta$ -induced pro-inflammatory responses. *Small*, 9: 472-477.
- Takenaka S, Karg E, Möller W, Roth C, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J (2000) A morphologic study on the fate of ultrafine silver particles: distribution pattern of phagocytized metallic silver in vitro and in vivo. *Inhal Toxicol* 12: 291-299.
- Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect* 109: 547-551.
- Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PKH (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, 2: 129-136.
- Tsai CY, Lu SL, Hu CW, Yeh CS, Lee GB, Lei HY (2012) Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *J Immunol*, 188: 68-76.
- Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, Chen DH, Chou CH, Wang CR, Wu CL (2007) Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis Rheum*, 56: 544-554.
- Victor EG, Silveira PC, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, Pinho RA, da Silva L, Streck EL, Paula MM (2012) Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotech*, 10: 11.
- Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE (2002) Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effect of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen* 10: 141-151.
- Xu Y, Tang H, Liu JH, Wang H, Liu Y (2013) Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol Lett* 219: 42-48.
- Yang EJ, Kim S, Kim JS, Choi IH (2012) Inflammasome formation and IL-1 $\beta$  release by human blood monocytes in response to silver nanoparticles. *Biomaterials* 33: 6858-6867.
- Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 5: 1553-1561.
- Zhang Q, Hitchins VM, Schrand AM, Hussain SM, Goering PL (2011) Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology*, 5: 284-295.
- Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, Meng AM, Liu PX, Zhang LA, Fan FY (2010) Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int J Nanomedicine*, 5: 771-781.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Oprócz prac wchodzących w skład wyżej opisanego osiągnięcia naukowego, jestem autorem lub współautorem 47 artykułów (44 opublikowano w czasopismach z listy JCR, pozostałe 3 w innych czasopismach krajowych), w tym 42 prac oryginalnych i 5 artykułów przeglądowych. Mój pozostały dorobek naukowy stanowi 7 rozdziałów w monografiach w języku polskim oraz 56 komunikatów naukowych, prezentowanych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

### 5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Po ukończeniu studiów w 1999 roku, zostałam przyjęta na studia doktoranckie w Katedrze Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, kierowanej przez prof. dr hab. Andrzeja Krzysztofa Siwickiego. Pierwsze kroki w laboratorium stawiałam pod przewodnictwem mojego opiekuna naukowego i przyszłego promotora mojej rozprawy doktorskiej – dr hab. Zofii Rotkiewicz, prof. UWM. Po opanowaniu niezbędnych technik laboratoryjnych, zaczęłam uczestniczyć w badaniach Katedry, które w owym czasie skupiały się głównie na ocenie wpływu różnych naturalnych (preparat TFX-Polfa, pałeczki kwasu mlekowego, gronkowcowa leukocydyna Panton-Valentine) i syntetycznych substancji (lewamizol, propiscin) o działaniu immunomodulującym na aktywność komórek immunokompetentnych *in vitro* i odpowiedź immunologiczną różnych gatunków zwierząt (psy, świnie, ryby). Mój dorobek naukowy z tego okresu stanowią 1 artykuł przeglądowy, 2 prace oryginalne i 11 doniesień konferencyjnych:

Artykuł przeglądowy:

1. Siwicki AK, Szweda W, Platt-Samoraj A, **Małaczewska J**: Zmienność i ewolucja wirusa pryszczycy. *Med Weter*, 2002, 58 (12), 938-942.

Prace oryginalne:

1. Siwicki AK, Morand M, Kazuń K, Keck N, Głąbski E, **Małaczewska J**: Application of anti-stress products in aquaculture: influence of propiscin on the effectiveness of an anti-*Yersinia Ruckeri* vaccine in rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss* (Wal.). *Arch Pol Fish*, 2002, 10 (2), 143-152.
2. Siwicki AK, Pozet F, Morand M, Kazuń B, Trapkowska S, **Małaczewska J**: Influence of methisoprinol on the replication of rhabdoviruses isolated from carp and catfish: *in vitro* study. *Pol J Vet Sci*, 2003, 6 (1), 47-50.

Doniesienia konferencyjne:

1. Świąćicka-Grabowska G, Budrewicz B, Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**: Wpływ Karate 025 EC pestycydu z grupy pyretroidów na namnażanie się wirusa choroby Aujeszkyego w hodowlach komórek.

- Konferencja „Toksykologiczne i farmakologiczne aspekty działania ksenobiotyków”, Olsztyn, 7-8 września 2000, 87.
2. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**, Święcicka-Grabowska G, Siwicki AK: Wpływ dimeru lizozymu (KLP-602) na namnażanie się szczepu TK 900 wirusa choroby Aujeszky'ego w hodowli komórek zarodka kurzego. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Sectio DD Medicina Veterinaria*, XI Kongres PTNW, Lublin, 21-23 września 2000, 355.
  3. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**: Wpływ lewamizolu na reaktywność limfocytów T u świń. Konferencja „Mikrobiologia na przełomie wieków”, Olsztyn, 18.12.2000, 117.
  4. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**: Wpływ podawania lewamizolu na poziom populacji limfocytów T i B u świń. Konferencja „Mikrobiologia na przełomie wieków”, Olsztyn, 18.12.2000, 118.
  5. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**: Wpływ lewamizolu i preparatu „TFX-Polfa” na wybrane wskaźniki nieswoistej odporności humoralnej u świń. Konferencja „Mikrobiologia na przełomie wieków”, Olsztyn, 18.12.2000, 119.
  6. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**: Wpływ preparatu „TFX-Polfa” na reaktywność limfocytów T u świń. Konferencja „Mikrobiologia na przełomie wieków”, Olsztyn, 18.12.2000, 120.
  7. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**, Rotkiewicz T: Aktywność fagocytarna leukocytów prosiąt otrzymujących pałeczki kwasu mlekowego w stosunku do *E. coli*. Konferencja „Immunologia weterynaryjna. Wybrane zagadnienia.”, Olsztyn, 13-14 września 2001, 147-148.
  8. Rotkiewicz Z, **Małaczewska J**, Rotkiewicz T: Phagocytic activity of leukocytes towards *E. coli* in piglets receiving lactic acid rods. 3<sup>rd</sup> Congress of Veterinary Immunologists 13-14.09.2001, Olsztyn, *Pol J Vet Sci*, 2001, 4 (3), 145.
  9. Siwicki AK, Morand M, Kazuń K, Keck N, Głabski E, **Małaczewska J**: Effects of Propiscin on the cellular and humoral immune response induced by anti-*Yersinia ruckeri* vaccine. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Olsztyn, 18-21 września 2002, *Centr Eur J Immunol*, 2002, 27, Suppl 1, 112.
  10. Siwicki AK, Bownik A, Szmigielski S, Prevost G, **Małaczewska J**, Mikulska-Skupień E: Effects of leukocidin panton – valentine on proliferative response of blood lymphocytes stimulated by different mitogens: *in vitro* study in dogs. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Olsztyn, 18-21 września 2002, *Centr Eur J Immunol*, 2002, 27, Suppl 1, 113.
  11. Siwicki AK, Bownik A, Szmigielski S, Prevost G, **Małaczewska J**: Influence of staphylococcal leukocidin panton – valentine on blood phagocytes activity: *in vitro* study in dogs. XI Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Olsztyn, 18-21 września 2002, *Centr Eur J Immunol*, 2002, 27, Suppl 1, 114.

Natomiast kierunek badań obrany wówczas przeze mnie i stanowiący podstawę mojej późniejszej rozprawy doktorskiej, dotyczył oceny potencjalnej aktywności przeciwwirusowej dimeru lizozymu (preparat KLP-602) i izoprynozyiny (Methisoprinol), w warunkach *in vitro*. W przypadku obu substancji potwierdzono ich wielokierunkowe działanie immunomodulujące, obie też stosowano z powodzeniem w skojarzonej terapii niektórych schorzeń wirusowych. Nie było jednak pewne, czy ich działanie w tym wypadku jest wyłącznie efektem pobudzenia

układu immunologicznego do walki z infekcją, czy też wynikiem oddziaływania na sam wirus, bądź któryś z etapów jego replikacji w komórce. Z tego powodu zdecydowałam się na przeprowadzenie badań przeciwwirusowego działania preparatów wobec zwierzęcych wirusów DNA i RNA, z użyciem hodowli komórkowych i zarodków kurzych, jako podłoży biologicznych. Zwieńczeniem tego etapu mojej działalności naukowej była dysertacja doktorska pt. „Wpływ dimeru lizozymu (KLP-602) i methisoprinolu na namnażanie się wybranych wirusów w hodowlach komórek i w zarodkach kurzych”, której publiczna obrona odbyła się 18.VI.2003 na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Praca została wyróżniona Nagrodą Rektora UW-M w Olsztynie III stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej.

## **5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych**

Na mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora, z wyłączeniem prac zaliczonych w poczet osiągnięcia habilitacyjnego, składają się 44 publikacje (40 prac oryginalnych i 4 przegląadowe), 7 rozdziałów w monografiach i 45 doniesień konferencyjnych.

Wyniki badań stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej opublikowane zostały w 6 pracach oryginalnych:

1. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z, Siwicki AK: Effect of Methisoprinol and KLP-602 on the development of immunocompetent organs and selected biochemical indices of the allantoic fluid of chicken embryos. *Pol J Vet Sci*, 2003, 6 (3) Suppl, 21-24.
2. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z: Effect of Methisoprinol on virus replication in cell cultures. *Pol J Vet Sci*, 2004, 7 (2), 97-102.
3. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z: Effect of KLP-602 on virus replication in cell cultures. *Pol J Vet Sci*, 2004, 7 (2), 103-108.
4. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z, Siwicki AK: Effect of Methisoprinol, KLP-602 and NDV infection on the selected biochemical indices of the allantoic fluid of chicken embryos. *Pol J Vet Sci*, 2004, 7 (3) Suppl, 81-84.
5. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z: Biological properties of Roakin strain of NDV and TK900 strain of ADV after serial passages in CECC in the presence of Methisoprinol and KLP-606. *Pol J Vet Sci*, 2005, 8 (1), 23-28.
6. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z: Effect of Methisoprinol and KLP-602 on virus replication in chicken embryos. *Pol J Vet Sci*, 2005, 8 (4), 289-294.

Po uzyskaniu stopnia doktora zdecydowałam się na przeprofilowanie mojej działalności naukowej w kierunku immunologii. Jedyne badania z pogranicza wirusologii i immunologii, w które się od tej pory włączyłam, dotyczyły wpływu herpeswirusa śródmiąższowego zapalenia

nerek i martwicy skrzeli (CYHV-3) na układ immunologiczny ryb. CYHV-3, wcześniej opisany jako herpeswirus karpia koi (KHV), jest czynnikiem etiologicznym wysoce zakaźnej choroby karpia hodowlanego i karpia koi, powodującym masowe śnięcia zakażonych ryb. Istotnym elementem patogenezy schorzenia jest temperatura wody, z optimum między 18, a 22°C. W naszych badaniach wirus, pochodzący z polskich gospodarstw rybackich, został poddany propagacji w linii komórkowej KFC (koi fin cells), zidentyfikowany metodą PCR, a następnie użyty w doświadczeniach, przeprowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wykazaliśmy, że CYHV-3 charakteryzuje się silnym działaniem immunosupresyjnym, objawiającym się obniżeniem aktywności lizozymu, spadkiem syntezy cytokin (IL-1-like i IL-6-like protein) po stymulacji mitogenami lub antygenami, obniżeniem aktywności bójczej i zdolności do wybuchu tlenowego fagocytów oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów karpia. Immunosupresji nie obserwowano natomiast w przypadku innych gatunków słodkowodnych ryb hodowlanych, jak sum europejski, czy lin. W warunkach *in vitro* spadek aktywności komórek pod wpływem wirusa miał miejsce w temperaturze między 16 a 20°C, podczas gdy w wyższych temperaturach obserwowano jej pobudzenie, co potwierdza zależność wirusa od temperatury otoczenia. Wyniki naszych badań opublikowane zostały w 1 pracy oryginalnej i 9 doniesieniach konferencyjnych:

Prace oryginalne:

1. Siwicki AK, Lepa A, **Małaczewska J**, Kazuń B, Kazuń K, Terech-Majewska E: Isolation and identification of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) in fingerling common carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch Pol Fish, 2006, 14 (2), 157-167.

Doniesienia konferencyjne:

1. Siwicki AK, Trapkowska S, Terech-Majewska E, **Małaczewska J**, Kazuń B, Kotler M: Wpływ herpeswirusa śródmiąższowego zapalenia nerek i martwicy skrzeli (CNGV) na aktywność makrofagów i limfocytów karpia (*Cyprinus carpio*) – badania *in vitro*. Med Weter, 2005, 61, Supl „Międzynarodowa Konferencja znaczenie mechanizmów patogenetycznych w terapii i profilaktyce chorób”, 24.
2. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Lepa A: Influence of CyHV-3 on macrophage and lymphocyte activity in carp (*Cyprinus carpio*) – an *in vitro* study. International Workshop on CyHV-3 (KHV). Cyprinid herpes viruses: Basic and applied aspects. 17-18 February 2008, Caesarea, Israel, 30.
3. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Kazuń B, Wójcik R: Pathogenesis of CyHV-3: in vitro effect on phagocyte activity and cytokine-like protein production in carp (*Cyprinus carpio*), tench (*Tinca tinca*) and sheatfish (*Silurus glanis*). International Workshop on CyHV-3 (KHV). Cyprinid herpes viruses: Basic and applied aspects. 17-18 February 2008, Caesarea, Israel, 33.
4. Siwicki AK, Terech-Majewska E, **Małaczewska J**, Kazuń B: Wpływ wirusa CYHV-3 śródmiąższowego zapalenia nerek i martwicy skrzeli na komórkowe mechanizmy obronne u narybku karpia (*Cyprinus*



- carpio*) – badania *in vitro*. XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008, 182.
5. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Lepa A, Kazuń B, Kazuń K, Głąbski E, Wójcik R: Effect of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) on innate immunity in carp, tench and sheatfish. Pathology Today 27th Congress ESVP-ECVP Olsztyn-Kraków, 2009, opublikowane w: J Comp Pathol 2009, 141 (4), 309.
  6. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Kazuń B, Wójcik R, Kazuń K, Lepa A: Influence of CyHV-3 on the nonspecific defense mechanisms in common carp (*Cyprinus carpio*) and other species – in vitro and in vivo study. Aquatic Animal Health Management and Diseases 1<sup>st</sup> Congress, 27-28 January 2009, Teheran, Iran, 130.
  7. Siwicki AK, Lepa A, **Małaczewska J**: *In vitro* influence of CYHV-3 on the macrophage and lymphocyte activity in common carp (*Cyprinus carpio*). Diseases of Fish and Shellfish – 14-th EAAP International Conference Prague, September 14-19, 2009, 294.
  8. Schulz P, **Małaczewska J**, Siwicki AK, Kaczorek E, Wójcik R, Terech-Majewska E: Pathogenesis of *Cyprinid herpesvirus-3* (CYHV-3): in vitro effect on lysozyme activity and cytokine-like protein production in carp (*Cyprinus carpio*), european catfish (*Silururs glanis*) and tench (*Tinca tinca*). 2<sup>nd</sup> Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 27<sup>th</sup> – 30 th August 2014, Berlin, Germany, P123, 162, opublikowane w: J Comp Pathol 2015, 152 (1), 92.
  9. Schulz P, **Małaczewska J**, Kaczorek E, Wójcik R, Siwicki AK: Immunopathogenesis of herpesviruses: influence of *Cyprinid herpesvirus-3* on immunocompetence cells activity – *in vitro* comparative study in fish. 2<sup>nd</sup> Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 27<sup>th</sup> – 30 th August 2014, Berlin, Germany, P124, 162, opublikowane w: J Comp Pathol 2015, 152 (1), 92.

Stricte immunologiczne badania, w które byłam przez ostatnie lata zaangażowana, dotyczyły oceny wpływu różnych substancji o działaniu immunotropowym, na aktywność komórek układu immunologicznego różnych gatunków zwierząt w warunkach *in vitro*, bądź reaktywność układu odpornościowego, po ich podaniu zwierzętom drogą alimentarną.

Pierwszą grupą substancji, których wpływ na aktywność leukocytów oznaczaliśmy w warunkach *in vitro*, były leukocydyny gronkowca złocistego. Badania te, prowadzone we współpracy z prof. Gilles Prevost z Uniwersytetu Ludwika Pasteura w Strasburgu, prof. dr hab. Stanisławem Szmigielskim z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie oraz dr Adamem Bownikiem z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego stanowiły kontynuację prac, w których uczestniczyłam przed obroną doktoratu. Leukocydyny są dwuskładnikowymi toksynami, produkowanymi przyżyciowo przez różne szczepy gronkowca złocistego, odpowiedzialnymi za lizę zarówno mono-, jak i polimorfonuklearnych leukocytów, stanowiącymi istotny składnik wirulencji tego patogenu. Niewiele jednak wiadomo o wpływie leukocydyn na funkcje układu immunologicznego. We wcześniejszych badaniach, zgodnie z przewidywaniami, wysokie stężenia leukocydyny Panton-Valentine (PVL) znacząco obniżały

proliferację limfocytów T i B, jak również zdolność do wybuchu tlenowego i aktywność bójczą fagocytów krwi obwodowej psów. Nieoczekiwanie jednak, przy niskich, sublitycznych stężeniach tej toksyny obserwowano lekki efekt stymulujący w zakresie badanych parametrów. Badana później leukocydyna szczepu Newman *S. aureus* (podjednostki LukE, LukD) wywierała podobny wpływ na aktywność fagocytów (hamowanie przy wysokich stężeniach, stymulacja przy sublitycznych), ale wszystkie jej koncentracje obniżały proliferację psich limfocytów, szczególnie komórek B. Uzyskane wyniki potwierdzają immunosupresyjne działanie gronkowca złocistego i wskazują, że nawet niskie stężenia toksyn, produkowanych przez niektóre jego szczepy, mogą hamować pewne funkcje układu odpornościowego, co jest niezwykle istotne dla patogenezy schorzeń gronkowcowych. Rezultaty badań przedstawiono w dwóch pracach oryginalnych:

1. Siwicki AK, Bownik A, Prevost G, Szmigielski S, **Małaczewska J**, Mikulska-Skupień E: In vitro effect of staphylococcal leukocidins (Luk E, Luk D) on the proliferative responses of dog blood lymphocytes (*Canis familiaris*). Bull Vet Inst Pulawy, 2003, 47, 395-401.
2. Siwicki AK, Bownik A, Prevost G, Szmigielski S, **Małaczewska J**, Mikulska-Skupień E: In vitro influence of staphylococcal leukocidins (LukE, LukD) on the activity of blood phagocytes in dogs. Wien Tierärztl Monat, 2004, 91, 58-62.

W kolejnych latach uczestniczyłam w badaniach prowadzonych we współpracy z prof. dr hab. Ewą Skopińską-Różewską z Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, których celem była ocena właściwości immunotropowych preparatu Immunostim Plus, produkcji Herbapol Lublin, zawierającego wyciągi z owocu cytryńca chińskiego (*Schizandra chinensis*) i korzenia żeńszenia syberyjskiego (*Eleutherococcus senticosus*), roślin stosowanych w tradycyjnej medycynie wschodniej. Doświadczenia *in vivo*, przeprowadzone na myszach, szczurach i świniach otrzymujących badany preparat drogą alimentarną, wykazały jego właściwości immunostymulujące, zarówno w zakresie odporności nieswoistej, jak i swoistej odpowiedzi immunologicznej. U zwierząt otrzymujących lek obserwowaliśmy stymulację aktywności fagocytarnej i bójczej granulocytów i monocytów krwi obwodowej, wzrost aktywności lizozymu w surowicy, nasilenie spontanicznej migracji splenocytów, wzrost syntezy przeciwciał po stymulacji SRBC, wzmożenie aktywności proliferacyjnej limfocytów oraz nasilenie miejscowej odpowiedzi przeszczepu przeciwko biorcy (graft-versus-host response) w śródskórnym teście LIA. Ponadto Immunostim Plus korygował upośledzoną aktywność komórek fagocytujących u szczurów intoksykowanych kadmem oraz hamował powstawanie nowych naczyń krwionośnych u myszy w śródskórnym teście angiogenezy z komórkami mięsaka L-1. Wyniki naszych badań wskazują, że preparat ten może znaleźć zastosowanie jako

immunostymulator, nie tylko u osobników zdrowych, ale również w stanach upośledzenia odporności nieswoistej, a jako potencjalny inhibitor angiogenezy także w przebiegu innych procesów patofizjologicznych, w tym nowotworzenia. Rezultaty badań opublikowane zostały w 4 pracach oryginalnych i rozdziale monografii:

Prace oryginalne:

1. Siwicki AK, Skopińska-Różewska E, Nartowska J, **Małaczewska J**, Wójcik R, Sommer E, Trapkowska S, Filewska M, Skurzak H: The effect of Immunostim Plus – a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on granulocytes activity and tumour angiogenesis in mice. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2004, 48, 489-492.
2. Siwicki AK, Zielonka Ł, Skopińska-Różewska E, Gajęcki M, **Małaczewska J**, Wójcik R, Trapkowska S: The influence of Immunostim Plus – a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on blood phagocytes and lysozyme activity in pigs. *Pol J Food Nutr Sci* 2004, 54 (13) SI 2, 55-57.
3. Wójcik R, **Małaczewska J**, Jedlińska-Krakowska M, Jakubowski K, Siwicki AK: Wpływ preparatu Immunostim-Plus na aktywność fagocytarną i metabolizm tlenowy leukocytów krwi szczurów intoksykowanych kadmem. *Med Weter*, 2006, 62 (10), 1179-1182.
4. Skopińska-Różewska E, Siwicki AK, Wójcik R, **Małaczewska J**, Trapkowska S, Nartowska J, Bałan BJ, Wasutyński A: Immunostimulatory effect of Immunostim Plus – a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on lymphocyte-dependent cellular immunity in mice. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2006, 50, 461-465.

Rozdział monografii:

1. Siwicki AK, Skopińska-Różewska E, Nartowska J, Augustynowicz J, Wójcik R, **Małaczewska J**, Trapkowska S, Sommer E, Demkow U, Filewska M, Makula J, Lewicka-Tarchalska M, Skurzak H, Bany J, Mierzwińska-Nastalska E: Aktywność immunotropowa mieszaniny wyciągów korzenia żeńszenia syberyjskiego i owocu cytryńca chińskiego, Praca zbiorowa pod redakcją Siwicki AK, Skopińska-Różewska E, Świdorski F: Immunomodulacja – nowe możliwości w ochronie zdrowia. *Studio Przygotowawcze Wydawnictw Edycja*, Olsztyn 2004, 39-50. ISBN 83-88545-21-3.

Kolejnymi immunomodulatorami naturalnego pochodzenia, którymi zajmowaliśmy się w ostatnich latach są laktoferyna,  $\beta$ -glukany i kwas  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowy (HMB). Laktoferyna – endogenna glikoproteina z rodziny transferyn, obecna w licznych narządach, wydzielinach i ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych ssaków, oprócz udziału w transporcie żelaza, zaangażowana jest w nieswoistą odporność humoralną organizmu. W organizmach innych gromad zwierząt niż ssaki, laktoferyna nie występuje, a jej funkcje pełnione są przez inne białka z rodziny transferyn – owotransferynę (ptaki) lub transferynę. Białko to, izolowane na skalę przemysłową z serwatki i odtłuszczonego mleka krowiego, od lat znajduje zastosowanie jako immunomodulator w ludzkiej medycynie, ale także jako suplement

diety człowieka i, w mniejszym stopniu, zwierząt towarzyszących. Fakt ten, w połączeniu z ustawicznym poszukiwaniem naturalnych immunomodulatorów, które mogłyby znaleźć zastosowanie w chowie wielkotowarowym, stanowił dla nas zachętę do podjęcia badań nad wpływem bydlęcej laktoferyny na aktywność komórek immunokompetentnych, izolowanych od różnych gatunków zwierząt hodowlanych, w warunkach *in vitro*. Badania prowadzono na leukocytach krwi obwodowej cieląt, jagniąt i kurcząt oraz komórkach izolowanych z narządów limfatycznych (śledziona i nerki główowej) trzech gatunków ryb – pstrąga tęczowego, węgorza europejskiego i suma pospolitego. We wszystkich przypadkach, również u drobiu i ryb, obserwowaliśmy stymulację wybuchu tlenowego komórek fagocytycznych, przy dużo słabiej wyrażonym wpływie laktoferyny na aktywność bójczą fagocytów, jak również wzmożoną aktywność proliferacyjną limfocytów, a szczególnie komórek T. Uzyskane wyniki stanowiły wystarczającą zachętę do podjęcia badań nad możliwością zastosowania laktoferyny jako dodatku paszowego, hamulcem okazał się jednak koszt zakupu większych ilości wysoce oczyszczonego i dobrze scharakteryzowanego białka do badań od koncernów chemicznych. Ponieważ kwestie ekonomiczne mają niebagatelne znaczenie w przemysłowym chowie zwierząt, badania zakończono na tym wstępnym etapie. Na fali zainteresowania laktoferyną powstały w 2008 roku dwie prace magisterskie na Wydziale Biologii i Biotechnologii U-WM, których byłam promotorem (załącznik 3). Ponadto opublikowano 3 prace przeglądowe, 2 oryginalne i 3 doniesienia konferencyjne:

Artykuły przeglądowe:

1. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z, Siwicki AK: Laktoferyna – mechanizmy działania przeciwwirusowego. *Med Weter*, 2006, 62 (10), 1104-1107.
2. **Małaczewska J**, Rotkiewicz Z: Laktoferyna – białko multipotencjalne. *Medycyna Wet*, 2007, 63 (2), 136-139.
3. **Małaczewska J**, Wójcik R, Siwicki AK: Możliwości zastosowania laktoferyny jako immunostymulatora w hodowli ryb i skorupiaków. *Med Weter*, 2009, 65 (2), 95-98.

Prace oryginalne:

1. **Małaczewska J**, Wójcik R, Siwicki AK: Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów krwi obwodowej kurcząt – badania *in vitro*. *Med Weter*, 2008, 64 (12), 1430-1433.
2. **Małaczewska J**, Wójcik M, Wójcik R, Siwicki AK: The *in vitro* effect of bovine lactoferrin on the activity of organ leukocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), European eel (*Anguilla Anguilla*) and wels catfish (*Silurus glanis*). *Pol J Vet Sci*, 2010, 13, 83-88.

Doniesienia:

1. **Małaczewska J**, Wójcik M, Siwicki AK: Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów narządowych pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008, materiały kongresowe, 428.
2. **Małaczewska J**, Jarząbek T, Siwicki AK: Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów krwi obwodowej cieląt *in vitro*. XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008, materiały kongresowe, 452.
3. **Małaczewska J**, Wójcik M, Jarząbek T, Rotkiewicz Z, Siwicki AK: The *in vitro* effect of bovine lactoferrin on the viability and mitogenic response of selected animals species leucocytes. XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk, 16-18. VI. 2011, materiały zjazdowe (S49).

Z kolei  $\beta$ -glukany, pozostające od dłuższego czasu w sferze zainteresowań Katedry, są od lat dostępne na rynku w postaci handlowych preparatów, zalecanych jako suplementy, tak w ludzkiej medycynie, jak i w produkcji zwierzęcej. Związki te są polisacharydami ściany komórkowej bakterii, grzybów, alg i roślin, jednak w immunomodulacji zastosowanie znajduje głównie  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukan, izolowany z drożdży szlachetnych (*Saccharomyces cerevisiae*). Badania nasze, prowadzone we współpracy z prof. dr hab. Stanisławem Milewskim, z Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UW-M w Olsztynie, skupiały się na ocenie wpływu handlowych preparatów, zawierających ten związek (Biolex-Beta HP, Biolex MB-40, Inter Yeast S) na parametry immunologiczne i użytkowe owiec, u których do tej pory nie prowadzono takich oznaczeń. U jagniąt otrzymujących glukany z paszą przez okres 1-2 miesięcy obserwowano wyższą masę ciała, większe przyrosty dobowe, szybsze tempo wzrostu i lepiej wykształconą tkankę mięśniową niż u sztuk kontrolnych. Poprawa cech użyteczności mięsnej zwierząt wynikała prawdopodobnie z regulacji metabolizmu tłuszczów przez beta-glukan, co potwierdzają badania innych autorów. W zakresie parametrów immunologicznych obserwowaliśmy natomiast zwiększenie aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz wzrost poziomu gammaglobulin w surowicy zwierząt, a ponadto zwiększoną aktywność komórek fagocytujących i nasiloną aktywność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej, co z kolei potwierdza właściwości immunostymulujące glukanów. Co więcej, również u potomstwa owiec karmionych w czasie ciąży paszą z dodatkiem beta-glukanów, obserwowano korzystny wpływ na te same parametry immunologiczne przez cały okres eksperymentu, tj. do 70 dnia życia jagniąt. Doświadczenia przeprowadzone równolegle na szczurach potwierdziły korzystny wpływ stosowania beta-glukanów na te same parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej oraz na aktywność limfocytów, zaś u zwierząt supresorowanych kadmem zanotowano ich działanie immunokorekcyjne. Także satelitarne doświadczenie na narybku sandacza otrzymującym paszę z dodatkiem glukanów (preparat MacroGard) wykazało

stymulację parametrów odporności nieswoistej i swoistej zwierząt. Uzyskane wyniki badań dowodzą nie tylko bezpieczeństwa stosowania beta-glukanów jako dodatku paszowego, ale również ich przydatności z punktu widzenia produktywności hodowli, prewencji schorzeń zakaźnych i korekcji upośledzonej odpowiedzi immunologicznej. Rezultaty badań zostały szczegółowo opisane w 9 pracach oryginalnych i 5 doniesieniach konferencyjnych, a przegląd danych literaturowych dotyczących zagadnienia został ujęty w rozdziale monografii:

Artykuły oryginalne:

1. Wójcik R, **Małaczewska J**, Trapkowska S, Siwicki AK: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne jagniąt. *Med Weter*, 2007, 63 (1), 84-86.
2. Milewski S, Wójcik R, **Małaczewska J**, Trapkowska S, Siwicki AK: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na cechy użytkowości mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt. *Med Weter*, 2007, 63 (3), 360-363.
3. Wójcik R, Milewski S, **Małaczewska J**, Tański Z, Brzostowski H, Siwicki AK: Defence mechanisms of the offspring ewes fed a diet supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during pregnancy and lactation. *Centr Eur J Immunol*, 2008, 33 (4), 197-201.
4. Wójcik R, Janowska E, **Małaczewska J**, Siwicki AK: Effect of  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan on the phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2009, 53, 241-246.
5. Siwicki AK, Zakęś Z, Terech-Majewska E, Kowalska A, **Małaczewska J**: Supplementing the feed of pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)] juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. *Aquaculture Res*, 2009, 40, 405-411.
6. **Małaczewska J**, Wójcik R, Jung L, Siwicki AK: Effect of Biolex  $\beta$ -HP on selected parameters of specific and non-specific humoral and cellular immunity in rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2010, 54, 75-80.
7. **Małaczewska J**, Milewski S: Immunomodulating effect of Inter Yeast S on the non-specific and specific cellular and humoral immunity in lambs. *Pol J Vet Sci*, 2010, 13, 163-170.
8. Milewski S, Sobiech P, Bednarek D, Wójcik R, **Małaczewska J**, Zaleska B, Siwicki AK: Effect of oligosaccharides supplementation on the meat performance traits and selected indicators of humoral immunity in lambs. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2010, 54, 175-179.
9. Milewski S, Wójcik R, Zaleska B, **Małaczewska J**, Tański Z, Siwicki AK: Effect of *Saccharomyces cerevisiae* dried yeast on the meat performance traits and selected indicators of humoral immunity in lambs. *Acta Vet Brno*, 2013, 82: 147-151.

Rozdział monografii:

1. Siwicki AK, Wójcik R, **Małaczewska J**, Szczucińska E, Zembrzuska M, Kaczorek E:  $\beta$ -glukany – naturalne immunomodulatory, Praca zbiorowa pod redakcją Skopińska-Różewska E, Siwicki AK: Wpływ czynników endogennych i egzogennych na układ odpornościowy. Wydawnictwo Edycja, Olsztyn 2012, 73-78. ISBN 978-83-88545-74-0.

Doniesienia konferencyjne:

1. Wójcik R, Milewski S, **Małaczewska J**, Tański Z, Brzostowski H, Siwicki AK: Defence mechanisms of the offspring of ewes fed a diet supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during pregnancy and lactation. EAAP - 59th Annual Meeting, Vilnius, Lithuania 2008, 24-27 August, Book of Abstracts, 14: 198.
2. Wójcik R, Dąbkowska A, **Małaczewska J**, Siwicki AK: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na wybrane parametry odporności nieswoistej komórkowej szczurów supresorowanych cyklofosfamidem. XIII Kongres PTNW „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008, 442-443.
3. Wójcik R, Janowska E, **Małaczewska J**, Siwicki AK: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na aktywność fagocytarną i metabolizm tlenowy granulocytów i monocytów krwi obwodowej szczurów. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Od nauki do praktyki”, Olsztyn, 18-20 września 2008, 455-456.
4. Wójcik R, **Małaczewska J**, Siwicki AK: Effect of Biolex MB 40 on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats. XIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, 16-18. VI. 2011, USO25.
5. Wójcik R, **Małaczewska J**, Siwicki AK, Miciński J, Zwierzchowski G: Immunotropowe oddziaływanie preparatu Biolex Beta-HP u cieląt. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 245.

Trzeci z naturalnych immunomodulatorów, który badaliśmy - HMB (kwas  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metylomasłowy) to endogenny hydroksykwasy, metabolit leucyny. Związek ten jest regulatorem metabolizmu, zwiększającym przyrosty tkanki mięśniowej, w związku z czym cieszy się dużą popularnością na rynku odżywek sportowych, ale też pewnym zainteresowaniem hodowców zwierząt rzeźnych. Kilka dostępnych pozycji literatury dowodzi również właściwości immunotropowych HMB. W związku z powyższym, we współpracy z dr hab. Janem Micińskim, prof. UWM z Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UW-M w Olsztynie, podjęliśmy badania nad wpływem suplementacji pasz przeżuwaczy (bydła i kóz) tą substancją na ich układ immunologiczny. U cieląt otrzymujących HMB przez okres do 60 dni zaobserwowaliśmy jego korzystny wpływ na aktywność lizozymu i ceruloplazminy oraz poziom gammaglobulin w surowicy, a także aktywność limfocytów i komórek fagocytujących krwi obwodowej. Wyniki badań opublikowane zostały do tej pory w 2 pracach oryginalnych i 1 doniesieniu konferencyjnym. Dalsze badania są w toku.

Prace oryginalne:

1. Wójcik R, **Małaczewska J**, Siwicki AK, Miciński J, Zwierzchowski G: The effect of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on the proliferative response of blood lymphocytes and the phagocytic activity of blood monocytes and granulocytes in calves. Pol J Vet Sci, 2013, 16, 567-569.

2. Wójcik R, **Małaczewska J**, Siwicki AK, Miciński J, Zwierzchowski G: The effect of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on selected parameters of humoral immunity in calves. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17, 357-359.

Doniesienie konferencyjne:

1. Wójcik R, **Małaczewska J**, Siwicki AK, Miciński J, Zwierzchowski G: Wpływ HMB na aktywność fagocytarną i metaboliczną leukocytów krwi cieląt. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 246.

W 2010 roku nawiązaliśmy współpracę z prof. dr hab. Waldemarem A. Turskim z Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, w zakresie oceny potencjalnych właściwości immunotropowych kwasu kynureninowego. Zachęcające wyniki wstępnych badań stały się przyczynkiem do wspólnego projektu badawczego (NN308578540), realizowanego w latach 2011-2014. Kwas kynureninowy (KYNA) jest metabolitem tryptofanu, powstającym na szlaku kynureninowym, znanym głównie jako endogenne neuroprotektant i antagonist receptorów NDMA i nACh w tkance nerwowej. Dopiero od 2006 roku wiadomo, że jest on również agonistą receptora GPR35, ulegającego ekspresji głównie w różnych populacjach komórek układu immunologicznego, co może świadczyć o właściwościach immunotropowych KYNA. Po wykazaniu niskiej cytotoksyczności kwasu kynureninowego w stosunku do kilku linii komórkowych, określiliśmy jego wpływ na aktywność komórek immunokompetentnych izolowanych od pstrąga tęczowego i myszy w warunkach *in vitro*. Potwierdziły one zdolność KYNA do interakcji z tymi komórkami, również u ryb, u których do tej pory nie badano ekspresji receptorów dla kwasu kynureninowego w układzie immunologicznym. Następnie, po wykazaniu dobrej tolerancji długoterminowej aplikacji KYNA u gryzoni, zbadaliśmy wpływ jego alimentarnej administracji, na aktywność układu odpornościowego myszy i pstrąga tęczowego. W przypadku pstrąga najsilniejszy efekt obserwowano po krótkim, 7-dniowym okresie podawania KYNA. Objawiał się on wzrostem aktywności komórek fagocytujących, a stymulacja nieswoistej odpowiedzi immunologicznej u ryb, w związku z jej dominującą rolą u zwierząt zmiennocieplnych, jest zawsze zjawiskiem korzystnym. Z drugiej jednak strony, po krótkim okresie podawania, kwas kynureninowy wpływał niekorzystnie na aktywność proliferacyjną limfocytów rybich, a efekt ten mijał dopiero po dłuższym czasie administracji, kiedy nie obserwowano już stymulacji komórek fagocytujących. Scharakteryzowanie sposobu oddziaływania KYNA na układ immunologiczny ryb wymaga zatem dalszych, szerszej zakrojonych badań. Bardziej zachęcające efekty uzyskaliśmy natomiast w przypadku myszy. Wpływ KYNA na aktywność limfocytów i syntezę cytokin przez splenocyty mysie nie był wprawdzie jednoznaczny, niezależnie jednak od długości okresu administracji, kwas



kynureninowy obniżał aktywność wybuchu tlenowego granulocytów i monocytów krwi obwodowej, co potwierdziło jego wcześniej opisane właściwości antyoksydacyjne. W obliczu uzyskanych wyników wydaje się, że u ssaków KYNA może znaleźć zastosowanie w przebiegu niektórych schorzeń zapalnych, jako immunomodulator, korygujący nadmierną odpowiedź komórek fagocytujących, skutkującą oksydatywnym uszkodzeniem tkanek. Uzyskane wyniki zostały do tej pory opublikowane w 4 pracach oryginalnych, 1 rozdziale monografii i 10 doniesieniach konferencyjnych:

Prace oryginalne:

1. **Małaczewska J**, Siwicki AK, Wójcik R, Kaczorek E, Turski WA: Effect of dietary administration of kynurenic acid on the activity of splenocytes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Centr Eur J Immunol*, 2013, 38 (4), 475-479.
2. **Małaczewska J**, Siwicki AK, Wójcik RM, Kaczorek E, Turski WA: Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood leukocytes in mice. *Centr Eur J Immunol*, 2014, 39 (1), 6-13.
3. **Małaczewska J**, Siwicki AK, Wójcik R, Turski WA, Kaczorek E: The *in vitro* effect of kynurenic acid on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocyte and splenocyte activity. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17 (3), 453-458.
4. Turski WA, **Małaczewska J**, Marciniak S, Bednarski J, Turski MP, Jabłoński M, Siwicki AK: On the toxicity of kynurenic acid *in vivo* and *in vitro*. *Pharmacological Reports*, 2014, 66, 1127-1133.

Rozdział monografii:

1. Parada-Turska J, Nowicka-Stążka P, **Małaczewska J**, Siwicki A. Kwas kynureninowy w procesach zapalnych, Praca zbiorowa pod redakcją Skopińska-Różewska E, Siwicki AK: Wpływ czynników endogennych i egzogennych na układ odpornościowy. Wydawnictwo Edycja, Olsztyn 2012, 109-122. ISBN 978-83-88545-74-0.

Doniesienia konferencyjne:

1. **Małaczewska J**, Parada-Turska J, Turski W, Wójcik R, Siwicki AK: Ocena immunotoksycznego oddziaływania kwasu kynureninowego: badania porównawcze *in vitro*. VII Konferencja Naukowa: „Aktualne problemy immunologii doświadczalnej i klinicznej” - materiały konferencyjne, Olsztyn, 24-26 maja 2012, 25.
2. **Małaczewska J**, Turski W, Wójcik R, Siwicki AK: Wpływ kwasu kynureninowego na produkcję wybranych cytokin przez splenocyty mysie – badania *in vitro*. VII Konferencja Naukowa: „Aktualne problemy immunologii doświadczalnej i klinicznej” - materiały konferencyjne, Olsztyn, 24-26 maja 2012, 26.
3. **Małaczewska J**, Siwicki AK, Wójcik R, Turski W: Określenie cytotoksyczności kwasu kynureninowego. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 97.

4. **Małaczewska J**, Siwicki AK, Wójcik R, Turski W: Wpływ różnych stężeń kwasu kynureninowego na aktywność fagocytarną splenocytów oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów mysich – badania *in vitro*. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 624.
5. **Małaczewska J**, Turski W, Siwicki AK: Ocena toksyczności kwasu kynureninowego u myszy – badania *in vitro* i *in vivo*. VIII Konferencja Naukowa: „Aktualne problemy biologii medycznej”, Kazimierz Dolny, 16-18 maja 2013, 28.
6. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Terech-Majewska E, Kaczorek E, Turski WA: Influence of kynurenic acid (KYNA) on the macrophages and lymphocytes activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 16<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Tampere, Finlandia, September 2-6, 2013, EAAP Bulletin, P-065, 218.
7. **Małaczewska J**, Siwicki A, Turski W, Wójcik R, Kaczorek E: Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood phagocytes in mice. 15<sup>th</sup> Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> June 2014, Centr Eur J Immunol 2014, 39 Suppl I, 67.
8. Siwicki AK, **Małaczewska J**, Turski W, Wójcik R, Kaczorek E, Adamowski M: Immunomodulating activity of kynurenic acid on the cytokines production – *in vitro* and *in vivo* study. 15<sup>th</sup> Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> June 2014, Centr Eur J Immunol 2014, 39 Suppl I, 67.
9. Kaczorek E, Schulz P, Terech-Majewska E, **Małaczewska J**, Wójcik R, Szczucińska E, Zembruska M, Adamowski M, Siwicki AK, Turski W: Kształtowanie się wskaźnika wątrobowego u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) pod wpływem kwasu kynureninowego – KYNA. „Nowe kierunki i technologie w akwakulturze” InnovaFish, Olsztyn 08-10 lipca 2014, 88.
10. Szarek J, Terech-Majewska E, Kaczorek E, Siwicki AK, Babińska I, Strzyżewska E, Dublan K, **Małaczewska J**, Wójcik R, Schulz P: Morphological evaluation of the liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) after kynurenic acid (KYNA) exposition. 2<sup>nd</sup> Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 27<sup>th</sup> – 30<sup>th</sup> August 2014, Berlin, Germany, O28, 81, opublikowane w: J Comp Pathol 2015, 152 (1), 51.

W tym samym, 2010 roku, zainteresowałam się nanokoloidami metali szlachetnych, podbijającymi rynek parafarmaceutyków. Preparaty te, według deklaracji producenta, miały być w pełni bezpieczne dla organizmu, jednocześnie wykazując działanie biobójcze w stosunku do patogenów, prewencyjne przeciwko schorzeniom zakaźnym, przeciwzapalne i immunoregulujące. Tymczasem jedynymi wynikami badań, zamieszczonymi na stronie internetowej producenta, były dane dotyczące działania bakteriobójczego nanokoloidów srebra i złota. Przegląd skąpej literatury, dotyczącej zagadnienia, uświadomił mi konieczność poszerzenia i propagacji wiedzy na temat oddziaływania, coraz powszechniej stosowanych, również w życiu codziennym, nanomateriałów na organizmy żywe. W związku z powyższym, podjęłam dość szeroko zakrojone badania dotyczące oceny cytotoksyczności, potencjału wirusobójczego/dezynfekcyjnego w obszarze weterynarii i, wreszcie, wpływu nanokoloidów

metali szlachetnych na układ immunologiczny zwierząt. Cytotoksyczność koloidów srebra, złota i miedzi w stosunku do kilku wybranych linii komórkowych (CECC, NIH/3T3, GMK) oznaczałam równolegle w trzech standardowych testach spektrofotometrycznych – redukcji MTT, uwalniania LDH i pochłaniania czerwieni obojętnej (NRU), oceniających odpowiednio wpływ badanej substancji na mitochondria, błonę komórkową i lizosomy. Cytotoksyczność nanokoloidu srebra była dość wysoka - istotny spadek żywotności komórek obserwowałam już przy stężeniach poniżej 1 ppm (0,625-0,9 w zależności od linii komórkowej). Pozostałe koloidy były wprawdzie mniej toksyczne, jednak ich wyższe stężenia również uszkadzały komórki, a koloid złota, nieoczekiwanie okazał się bardziej toksyczny ( $EC_{50}$ : 11-13 ppm) od koloidu miedzi ( $EC_{50}$  powyżej 17 ppm). Jednocześnie w przypadku złota i miedzi obserwowałam pewien stopień adaptacji pierwotnej hodowli komórek zarodka kurzego, objawiający się częściową rewersją niekorzystnego efektu działania metali, wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji komórek. Zjawisko to nie miało miejsca w przypadku bardziej toksycznego srebra. Uzyskane wyniki wskazują, że wyższe stężenia, zwłaszcza koloidu srebra, nie są obojętne dla komórek organizmu, a najwyższa czułość testu redukcji MTT potwierdza, że mitochondria stanowią główny cel jego oddziaływania.

Żaden z testowanych przeze mnie nanokoloidów (srebro, złoto, miedź, platyna) nie wykazywał natomiast działania wirusobójczego w stosunku do wirusa ECBO, w stopniu wystarczającym do uznania go za preparat wirusobójczy aplikowalny w obszarze weterynarii, zgodnie z normą PN-EN 14675:2006.

Wstępne badania wpływu koloidów na komórki układu odpornościowego, izolowane od myszy i pstrąga tęczowego, potwierdziły ich właściwości immunotropowe, jak również dość wysoki poziom cytotoksyczności koloidu srebra, w porównaniu ze złotem i miedzią, co było przyczynkiem do szerszego przetestowania ich na modelu mysim. Fakt szybkiej jonizacji nanocząstek miedzi w kwaśnym środowisku żołądka gryzoni, skutkujący ich wysoką toksycznością po podaniu drogą alimentarną sprawił, że badania *in vivo* musiałam ograniczyć do koloidów srebra i złota, cieszących się zresztą większą popularnością na rynku. Uzyskane wyniki stały się podstawą osiągnięcia habilitacyjnego, szerzej opisanego w punkcie 4. autoreferatu. Poza publikacjami wchodzącymi w skład cyklu stanowiącego wzmiankowane osiągnięcie, pozostałe wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań komercyjnych nanokoloidów metali szlachetnych opisane zostały w 4 pracach oryginalnych i 4 doniesieniach konferencyjnych. Dokonałam również przeglądu literatury dotyczącej cytotoksyczności nanocząstek w 1 artykule.

## Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Artykuł przeglądowy:

1. **Małaczewska J:** Cytotoksyczność nanocząsteczek srebra. *Med Weter*, 2010, 66 (12), 833-838.

Prace oryginalne:

1. **Małaczewska J:** Wpływ nanocząsteczek srebra na żywotność i aktywność proliferacyjną jednojądrzastych leukocytów krwi obwodowej i splenocytów mysich – badania *in vitro*. *Med Weter*, 2010, 66 (12), 847-851.
2. **Małaczewska J, Siwicki AK:** The *in vitro* effect of commercially available noble metal nanocolloids on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocyte and splenocyte activity. *Pol J Vet Sci*, 2013, 16 (1), 77-84.
3. **Małaczewska J, Siwicki AK:** Commercial metal-based nanocolloids – lack of virucidal activity against ECBO virus. *Pol J Vet Sci*, 2014, 17 (3), 507-509.
4. **Małaczewska J, Siwicki AK:** Commercial metal-based nanocolloids – evaluation of cytotoxicity. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2015, 59, 115-122.

Doniesienia konferencyjne:

1. **Małaczewska J, Wójcik R, Siwicki AK:** Cytotoksyczność komercyjnych nanokoloidów metali szlachetnych w stosunku do komórek hodowli NIH/3T3. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 98.
2. **Małaczewska J, Wójcik R, Siwicki AK:** Wpływ komercyjnych nanokoloidów metali szlachetnych na aktywność proliferacyjną limfocytów pstrąga tęczowego. XIV Kongres PTNW „Nauka praktyce”, Wrocław, 13-15 września 2012, 701.
3. **Małaczewska J:** Wpływ komercyjnych nanokoloidów metali szlachetnych na aktywność splenocytów mysich – badania *in vitro*. VIII Konferencja Naukowa: „Aktualne problemy biologii medycznej”, Kazimierz Dolny, 16-18 maja 2013, 26.
4. **Małaczewska J:** Wpływ nanokoloidu srebra podawanego drogą alimentarną na aktywność splenocytów i produkcję cytokin po stymulacji lipopolisacharydem u myszy. VIII Konferencja Naukowa: „Aktualne problemy biologii medycznej”, Kazimierz Dolny, 16-18 maja 2013, 27.

Pozostałe publikacje wchodzące w skład mojego dorobku, a nie wymienione do tej pory, wymykają się powyższej klasyfikacji. Wszystkie dotyczą jednak wpływu różnych substancji (pestycydy i inne ksenobiotyki, leki przeciwzapalne, metisoprinol, probiotyki) na układ immunologiczny zwierząt oraz możliwości regulowania jego funkcji. Pełen wykaz publikacji, których jestem autorem lub współautorem oraz informacje o moich osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki znajdują się w załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

## 6. Podsumowanie dorobku naukowego

| Rodzaj publikacji  | liczba     | IF*            | Punkty*<br>MNiSW |
|--|------------|----------------|------------------|
| Oryginalne prace twórcze                                       | 49         | 19,727         | 693              |
| Artykuły przeglądowe   | 6          | 0,46           | 65               |
| Rozdziały w monografiach                                       | 7          | -              | 24               |
| Doniesienia konferencyjne                                      | 56         | -              | -                |
| <b>Łącznie</b>   | <b>118</b> | <b>20,187</b>  | <b>782</b>       |
| <b>(w tym prace wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej)</b> | <b>(8)</b> | <b>(4,735)</b> | <b>(155)</b>     |

\* - sumaryczny IF i liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem publikacji.

Prace, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem: **24** prace oryginalne, **5** artykułów przeglądowych, **13** doniesień konferencyjnych.

Liczba cytowań:

- a) według bazy Web of Science Core Collection: **69**, bez autocytowań **54**
- b) według bazy Scopus (Elsevier): **139**, bez autocytowań **110**

Indeks Hirscha:

- a) według bazy Web of Science Core Collection: **4**
- b) według bazy Scopus (Elsevier): **6**

