

---

# **AUTOREFERAT**

---

**dr n. wet. Roman Marcin Wójcik**

---

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2014

## 1. Imię i Nazwisko

Roman Marcin Wójcik

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe (nazwa, miejsce i rok ich uzyskania):

- 2.1. **1994** – tytuł: lekarz weterynarii - Wydział Weterynaryjny, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.
- 2.2. **1996** – dyplomy ukończenia Studium Doskonalenia Pedagogicznego dla Nauczycieli Akademickich, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie.
- 2.3. **2001** – stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych - Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ wybranych immunomodulatorów na kształtowanie się odporności poszczepiennej u indyków”.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 3.1. **1995 - 1999** Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, asystent.
- 3.2. **1999 - 2003** Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent.
- 3.3. **2003 - 2008** Zespół Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Katedra Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt.
- 3.4. **2008 - do dnia dzisiejszego** Katedra Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt.

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

- 4.1. Jednotematyczny cykl publikacji pod wspólnym tytułem:  
„Działanie immunostymulujące oraz immunokorygujące oligosacharydów *Saccharomyces cerevisiae* na wybrane komórkowe i humoralne parametry odporności zwierząt”
- 4.2. Lista publikacji składająca się na cykl (Impact factor według Thomson Reuters Journal Citation Reports oraz punkty MNiSW zgodnie z obowiązującymi w roku ukazania się publikacji).

Lp	PUBLIKACJE	Punktacja MNiSW	Impact factor
1	<b>Wójcik R.:</b> Effect of Biolex Beta-HP on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats intoxicated by cyclophosphamide. Pol J Vet Sci 2010, 13: 181-188.  WoS <sub>CRS</sub> = 3	MNiSW <sub>2010</sub> = 20 (Lista A)	IF <sub>2010</sub> = 0,507
2	<b>Wójcik R.:</b> Effect of brewer's yeast ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) extract on selected parameters of humoral and cellular immunity in lambs. Bull Vet Inst Pulawy 2010, 54: 181-187.  WoS <sub>CRS</sub> = 5	MNiSW <sub>2010</sub> = 20 (Lista A)	IF <sub>2010</sub> = 0,321
3	<b>Wójcik R.:</b> Reactivity of the immunological system of rats stimulated with Biolex-Beta HP after cyclophosphamide immunosuppression. Centr Eur J Immunol 2014, 39: 60-69.  WoS = 0	MNiSW <sub>2013</sub> = 15 (Lista A)	IF <sub>2013</sub> = 0,358
4	<b>Wójcik R.:</b> Effect of Biolex-MB40 on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in lambs. Pol J Vet Sci 2014, 17: 281-291.  WoS = 0	MNiSW <sub>2013</sub> = 20 (Lista A)	IF <sub>2013</sub> = 0,712
5	<b>Wójcik R.:</b> The effect of Leiber Beta-S on the selected parameters of immunity in calves. Acta Vet Brno 2014, 83: 113-118.  WoS = 0	MNiSW <sub>2013</sub> = 20 (Lista A)	IF <sub>2013</sub> = 0,448
6	<b>Wójcik R.:</b> Effect of Leiber Beta-S (1,3-1,6-β-D-Glucan) on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in calves. Acta Vet Brno 2014, 83: doi:10.2754/avb201483040000.  WoS = 0	MNiSW <sub>2013</sub> = 20 (Lista A)	IF <sub>2013</sub> = 0,448
<b>ŁĄCZNA PUNKTACJA 6 PUBLIKACJI</b>		<b>115</b>	<b>2,794</b>

## **Wyjaśnienia i legenda**

**WoS = 0** - prace, które są indeksowane w bazie Web of Science (Search), ale nie są cytowane

**WoSCRS** = liczba cytowań w bazie Web of Science (Cited Reference Search CRS)

### **Punktacja czasopism:**

**MNiSW** - punkty z listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (podano rok, wskazano listę: A lub B)

**IF = Impact Factor z bazy Journal Citation Reports (JCR):** w dolnym indeksie podano rok

**W przypadku IF za 2014 r. należy zrobić korektę, gdy ukaże się JCR za 2014 r. (czerwiec-lipiec 2015 r.)**

### 4.3. Wkład w autorstwo publikacji:

Udział własny w powstaniu tych publikacji szacuję na 100%. Polegał on na opracowaniu koncepcji badań, określeniu celu i metodyki badań (wybór zwierząt do badań, wybór metod laboratoryjnych), przygotowaniu i podawaniu preparatów immunostymulujących zwierzętom, pobraniu materiału do badań, wykonaniu wszystkich oznaczeń laboratoryjnych, zebraniu wyników badań, ich statystycznym opracowaniu i interpretacji oraz napisaniu artykułów.

### 4.4. Omówienie celu naukowego ww. prac, osiągniętych wyników, znaczenia przeprowadzonych badań.

## **WSTĘP**

Immunomodulacja, jako efekt stosowania różnego rodzaju środków i metod wpływających na funkcję układu immunologicznego organizmu, może wyrażać się w postaci: immunosupresji lub immunostymulacji.

Immunosupresja jest to przejściowa lub stała dysfunkcja odpowiedzi immunologicznej organizmu, wynikająca z uszkodzenia układu odpornościowego, która prowadzi do zwiększenia wrażliwości na choroby (pojawianie się różnych zakażeń oportunistycznych) oraz nieskuteczności szczepień profilaktycznych. Dotyczyć może mechanizmów odporności nieswoistej np.: procesu fagocytozy, wytwarzania cytokin, interferonu, aktywności lizozymu, ceruloplazminy i swoistej np.: poziomu przeciwciał, zdolności proliferacyjnej limfocytów itp. Immunosupresja, jako stan obniżenia reaktywności układu odpornościowego organizmu, może być zjawiskiem szkodliwym lub pożądanym, celowo wywoływanym. Pożądana

wykorzystywana jest w celu osłabienia nadmiernej reaktywności (np.: w chorobach alergicznych) oraz gdy układ immunologiczny działa prawidłowo, lecz w niekorzystnych odczynach immunologicznych (np.: chorobach z autoagresji) lub w celu przeciwdziałania odrzuceniu przeszczepu (niekiedy aż do stanu tolerancji immunologicznej). Immunosupresja, jako zjawisko szkodliwe, pojawia się w efekcie stale oddziałujących na organizmy, różnego pochodzenia, czynników środowiskowych, które prowadzą do licznych modyfikacji układu odpornościowego. Indukują ją czynniki fizyczne (stres, nieodpowiednia temperatura, zła wilgotność, wadliwa wentylacja, nadmierna ilość pyłów, zbyt duże zagęszczenie zwierząt), biologiczne (bakterie, grzyby, pasożyty i wirusy) oraz chemiczne (niedobory mikro- i makroelementów, niedobory witamin, zanieczyszczenia wody i paszy, szkodliwe gazy, środki dezynfekcyjne, metale ciężkie, antybiotyki, leki). Niebezpieczny jest fakt, że to ich negatywne działanie jest powolne i długotrwałe, co z reguły uchodzi uwadze lekarzy praktyków lub przypisywane bywa innym czynnikom. Mogą one działać indywidualnie, bądź łącznie, mając bezpośredni wpływ na spadek kondycji zdrowotnej, gorsze przyrosty masy ciała, wzrost zachorowalności na choroby zakaźne, alergiczne, autoimmunologiczne, w skrajnych przypadkach również nowotworowe i w konsekwencji wzrost śmiertelności, co pociąga za sobą straty ekonomiczne. Skłania to do poszukiwania dróg przeciwdziałania temu niekorzystnemu zjawisku i preparatów wzmacniających odpowiedź immunologiczną, czyli immunostymulatorów. Ponadto tendencja ucieczki od stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt i pojawiająca się coraz większa na nie oporność, wymusza poszukiwania coraz to nowszych i skuteczniejszych metod profilaktycznych i nowych strategii leczenia zwierząt. Wydaje się, że jedną z alternatyw staje się tutaj immunostymulacja poprzez suplementację diety zwierząt różnego rodzaju preparatami. W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania tego typu preparatami, szczególnie pochodzenia naturalnego, które coraz częściej, z dobrym skutkiem, wykorzystywane są, nie tylko w medycynie ludzkiej, ale również w praktyce weterynaryjnej. Działanie immunostymulatorów polega na przyspieszeniu odpowiedzi immunologicznej, podniesieniu jej poziomu i wydłużeniu czasu jej trwania, co uzależnione jest od statusu immunologicznego gospodarza, sposobu podania oraz dawki immunostymulatora.

Wśród immunostymulatorów można wyróżnić związki pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego. Do immunostymulatorów naturalnych zaliczane są związki pochodzenia bakteryjnego, substancje izolowane z grzybów i roślin. Stymulatorami bakteryjnymi mogą być całe komórki bakteryjne np. BCG, żywe bakterie z rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, zaliczane do grupy organizmów nazywanych probiotykami. Znane są również

ekstrakty i produkty bakteryjne o działaniu pobudzającym odporność, wśród których można wyróżnić OK 432 (Picibanil), uzyskiwany ze szczepów *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus hemolyticus* o niskiej wirulencji, lipopolisacharydy (LPS), wchodzące w skład ściany komórkowej bakterii gramujemnych oraz muramylodipeptyd (MDP) i jego analogi. Do ważniejszych immunostymulatorów izolowanych z grzybów należy zaliczyć glukany, mannanooligosacharydy oraz inne polisacharydy i ekstrakty z takich gatunków jak: *Agaricus blazei*, *Sparassis crisperi*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, czy *Lyophyllum decastes*. Osobną grupę immunostymulatorów stosowanych w leczeniu stanowią stymulatory endogenne, które odpowiadają za prawidłowy rozwój komórek układu immunologicznego. Do celów leczniczych coraz częściej wykorzystuje się preparaty tych związków otrzymywane metodami rekombinacji DNA. Do grupy immunostymulatorów endogennych zaliczamy m.in. cytokiny, wśród których najczęściej stosowanymi są: IL-2 i interferony oraz czynniki stymulujące tworzenie koloni (CSF) m.in. figrastim (rekombinowany czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów – G-CSF), czy molgramostim (rekombinowany GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów i granulocytów). Stosowane są również preparaty zawierające w swym składzie grasicze hormony np.: grasiczy czynnik humoralny (THF), grasiczy czynnik X (TFX), tymomodulina, surowiczy czynnik grasiczy (FSF). Kolejną grupę związków stanowią immunostymulatory syntetyczne. Należą tu takie związki jak lewamizol, inozyna pranobeks, cymetydyna, poli I:C, metizoprynol, retinoidy, czy izoprynozyna (Johnson 1991, Werner i Jolles 1996, Tzianabos 2000, Borchers i wsp. 2004, Wiśniewski i wsp. 2004, Biedrzycka 2006, Myśliwski i wsp. 2006, Akremiene i wsp. 2007).

W badaniach własnych stan immunosupresji indukowano nie zakażeniem, którego skutki nie zawsze są łatwe do przewidzenia, lecz preparatem chemicznym pozbawionym tej wady. Spośród związków o immunosupresyjnym działaniu wybrano cyklofosfamid, ponieważ pozwala w krótkim czasie uzyskać pewny i powtarzalny efekt. Cyklofosfamid oddziałuje na komórki poprzez alkilowanie DNA, ale także RNA i enzymów o strukturze białkowej. Na tego typu działanie szczególną wrażliwość wykazują szybko dzielące się komórki (a przez to szybko replikujące się), stąd zdolność cyklofosfamidu do ich zabijania. Jednak cyklofosfamid nie tylko wpływa na komórki dzielące się, ale także może upośledzać funkcje intermitotyczne komórek. Ze względu na fakt, że działanie to nie ma charakteru wybiórczego, uszkodzone mogą zostać również komórki szybko proliferujące prawidłowych tkanek. Należą tu: komórki szpiku kostnego (zwłaszcza rozwijające się komórki krwi), pobudzone limfocyty (proliferujące i produkujące przeciwciała), komórki płodu, układu chłonnego, komórki

mieszków włosowych, czy komórki nabłonka jelit. Cyklofosfamid powoduje osłabienie, zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej, a stopień tego działania zależy od dawki, jednak nawet jednorazowe podanie może spowodować czasowy spadek odporności. W efekcie przejawiać się to może hamowaniem funkcji komórek żernych, na różnych etapach procesu fagocytozy. Supresja tych komórek może być wynikiem hamowania syntezy cytokin, enzymów biorących udział w funkcjonowaniu fagocytów, czy w syntezie substancji zawartych w ziarnistościach komórek żernych, a także receptorów biorących udział w rozpoznawaniu drobnoustrojów oraz receptorów dla składników dopełniacza. Przyłączając grupy alkilowe do enzymów może upośledzać m.in. wybuch tlenowy poprzez zaburzanie syntezy reaktywnych form tlenu, na jednym lub kilku etapach, czy też zaburzać aktywność lizozymu lub/i hamować aktywność enzymów biorących udział w jego syntezie. Cyklofosfamid może również działać pośrednio na komórki żerne poprzez oddziaływanie na wytwarzanie limfokin przez limfocyty oraz na cytochrom P450, który to jest głównie odpowiedzialny za konwersję cyklofosfamidu do jego aktywnych metabolitów. Proces ten, intensywnie przebiegający (przy wyższych dawkach związku), może skutkować zaburzeniami w funkcjonowaniu hepatocytów, w tym zaburzenia w syntezie niektórych białek: albumin,  $\alpha$ -globulin (w tym ceruloplazminy) i będącego  $\gamma$ -globuliną białka C-reaktywnego (CRP). Bezpośredni wpływ cyklofosfamidu na limfocyty B uwidacznia się na różnych etapach cyklu komórkowego. Cyklofosfamid hamuje proliferację limfocytów B w odpowiedzi na mitogeny grasiczniezależne, upośledza różnicowanie się ich do komórek plazmatycznych oraz obniża sekrecję immunoglobulin. Pośrednie działanie polega na inhibicji limfocytów T. Większość antygenów jest grasiczozależna, co oznacza, że limfocyty B do produkcji przeciwciał w odpowiedzi na dany antygen, potrzebują drugiego sygnału ze strony limfocytów T. W ten sposób niekorzystne działanie cyklofosfamidu na limfocyty T przekłada się na limfocyty B (Aubrey 1970, Abreu i Abreu 1981, Zhu i wsp. 1987, Quakyi i wsp. 1997, Li i wsp. 1999, Ben-Efraim 2001, King i Perry 2001, Robinson i wsp. 2004, Bafna i Mishra 2006, Al-Ghazlat 2009).

W jednotematycznym cyklu publikacji do modulacji odpowiedzi immunologicznej użyto trzech różnych preparatów naturalnych, zawierających oligosacharydy *Saccharomyces cerevisiae*: Biolex Beta-HP (85% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu), Biolex-MB40 (10-15% MOS - mannanoligosacharydów i 25-30%  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu) oraz Leiber Beta-S (80% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu).

Mannanoligosacharydy (MOS), jak sugerują Seifert i Watzl (2007), częściowo wiążą się z receptorami węglowodanowymi komórek nabłonka jelit, a częściowo po wchłonięciu, z

komórkami układu odpornościowego, co skutkuje pobudzeniem lokalnej i ogólnej odpowiedzi immunologicznej. Istnieje prawdopodobieństwo obecności kilku dróg bezpośredniego wiązania MOS: poprzez receptory TLR (Harris i wsp. 2006), receptory dla mannanów (Netea i wsp. 2006), receptory rodziny galektyn (Almkvist i Karlsson 2004) i transbłonowe mucyny (MUC1 i MUC40) (Carraway i wsp. 2003). Dzięki temu wiązaniu, MOS szczególnie skutecznie ograniczają kolonizację jelita cienkiego i grubego przez patogeny charakteryzujące się obecnością fimbrii typu 1 (np. *Salmonella*, *Clostridium*, *Escherichia coli*), gdyż uniemożliwiają im wiązanie z mannozozależnymi receptorami enterocytów nabłonka ściany jelit. MOS mogą również wiązać bezpośrednio fimbrie (lektyny) bakterii chorobotwórczych, tworząc kompleksy, które są wydalane, jako niestrawione cząstki z kałem (Fernandez i wsp. 2002, Thomas i wsp. 2004, Yang i wsp. 2008). Na monocytach, makrofagach, neutrofilach i mikrogleju funkcję takiego receptora węglowodanowego, bezpośrednio wiążącego MOS, spełnia receptor dectin-1 (Brown 2006), co skutkuje pobudzeniem mechanizmów nieswoistej i swoistej odporności. Zaobserwowano, że MOS zwiększa poziom immunoglobulin w jelicie i osoczu krwi, jak również absorbuje mikotoksyny. Ponadto, mannany powiązane są w ścianie komórkowej z glikoproteinami, lipidami, chityną oraz wieloma innymi substancjami czynnymi biologicznie (Czop 1986, Carrow 1996, Compton i wsp. 1996, Tzianabos i Cisneros 1996, Brown i Gordon 2001).

$\beta$ -glukany stymulują szeroki zakres odpowiedzi immunologicznej, między innymi: uwalnianie cytokin (Abel i Czop 1992; Pelizon i wsp. 2005), wytwarzanie reaktywnych form tlenu (Gallin i wsp. 1992), wytwarzanie NO (Ohno i wsp. 1996) oraz uwalnianie metabolitów kwasu arachidonowego (Czop i Austen 1985). Według Borchers i wsp. (2004)  $\beta$ -glukany wiązane są przez receptory: dectin-1, CR3 (complement receptor 3) – określany również, jako integryna CD11b/CD18, lactosylceramide (CDw17) oraz jak wykazali Ozinsky i wsp. (2000) i Akremiene i wsp. (2007) przez TLR-2 (toll-like receptor 2) i prawdopodobnie TLR-4, zlokalizowane na makrofagach, komórkach dendrytycznych i limfocytach. Na powierzchni tych komórek aktywują one kaskadę reakcji zmierzającą do aktywacji jądrowego czynnika  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), czego efektem jest wzrost produkcji cytokin prozapalnych: tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$ 2 (Rasmussen i Seljelid 1991, Abel i Czop 1992, Che i wsp. 2012). Wydaje się, że szczególne znaczenie ma tutaj IL-12, która odgrywa centralną rolę w promowaniu odpowiedzi limfocytów T pomocniczych typu 1 (Th1), a więc odporności komórkowej i jest silnym induktorem IFN- $\gamma$  i IL-2 uwalnianych przez limfocyty Th1 (Lackovic i wsp. 1970, Gately i wsp. 1998, Ranta i wsp. 2013). Z kolei IFN- $\gamma$  i IL-2 stymuluje makrofagi do aktywacji i różnicowania w subpopulacje



klasycznie aktywowanych makrofagów, charakteryzujących się nie tylko lepszą zdolnością pochłaniania bakterii, ale również większą zdolnością produkcji reaktywnych związków tlenowych (ROS) i innych substancji toksycznych oraz uwalniania białek antybakteryjnych np. defensyn (Ganz 1987, Mosmann i Coffman 1989, Vetvicka i wsp. 2008). W efekcie końcowym dochodzi do aktywacji neutrofilii, eozynofili, makrofagów oraz limfocytów T i B, a także układu dopełniacza. Prowadzi to do wzmożonej fagocytozy i produkcji przeciwciał, co skutkuje lepszym przygotowaniem organizmu do obrony przed różnego rodzaju czynnikami patogennymi.

Dotychczas przeprowadzone badania, dotyczące immunomodulującego działania różnych oligosacharydów, obejmowały głównie takie gatunki zwierząt jak: konie, krowy, świnie, koty, psy, czy ryby i w bardzo małym zakresie owce i jagnięta. Ponadto niewiele jest badań dotyczących wykorzystania jednocześnie mannanoligosacharydów i  $\beta$ -glukanów w żywieniu zwierząt i oceny ich wpływu na układ immunologiczny (Rafstie i wsp. 2010, Gu i wsp. 2011, Sadeghi i wsp. 2013), a w przypadku jagniąt i cieląt, brak jest takich badań. Wciąż wiele jest niewiadomych na temat działania tych oligosacharydów na układ immunologiczny u różnych gatunków zwierząt.

## CELE BADAWCZE

Powyższe dane stanowiły główne przesłanki, zachęcające do oceny immunokorygującego i immunostymulującego działania wybranych, naturalnych preparatów, zawierających oligosacharydy *Saccharomyces cerevisiae* ( $\beta$ -1,3/1,6-D-glukany i/lub mannanoligosacharydy) u różnych gatunków zwierząt.

Badania zostały przeprowadzone w trzech etapach:

1. **DOŚWIADCZENIE I** - ocena immunokorygującego działania preparatu o wysokiej czystości - Biolex Beta-HP, zawierającego 85% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu, na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej szczurów po eksperymentalnie indukowanej immunosupresji za pośrednictwem czynnika chemicznego – cyklofosfamidu.
2. **DOŚWIADCZENIE II** - ocena immunostymulującego działania preparatu Biolex-MB40, zawierającego 10-15% mannanoligosacharydów oraz 25-30%  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanów na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej jagniąt.

3. **DOŚWIADCZENIE III** - ocena immunostymulującego działania preparatu Leiber Beta-S, zawierającego 80% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej cieląt.

## MATERIAŁ I METODY

### DOŚWIADCZENIE I

Badania przeprowadzono na 40 osobnikach (20 samic i 20 samców) 14-tygodniowych szczurów rasy Wistar. Początkowo szczury podzielono na 2 grupy (kontrolna i badana), każda po 10 samców i 10 samic, trzymane w osobnych klatkach. Wszystkie zwierzęta były karmione granulowaną paszą dla gryzoni Murigran i pojone *ad libitum*. 20 szczurom z grupy badanej podawano przez 3 kolejne dni (dzień 1-3) cyklofosamid w ilości 50 mg/kg masy ciała/dobę, jako roztwór o stężeniu 75g/l w PBS w iniekcji domięśniowej. W 8 dniu doświadczenia 10 szczurów z grupy kontrolnej (5 samice i 5 samców) oraz 10 szczurów z grupy badanej (5 samice i 5 samców) zostało uśpionych przy pomocy Narcotanu, a następnie bezpośrednio z serca, pobrano od nich krew na heparynę i surowicę w celu oznaczenia i porównania wybranych parametrów nieswoistej odporności komórkowej metodami spektrofotometrycznymi: aktywności proliferacyjnej limfocytów MTT (3-[4,5-dimetylo-2-tiazolilo]-2,5-difenylo-2H-tetrazolinowy bromek) stymulowanych lipopolisacharydem (LPS) i konkanawaliną A (ConA), aktywności metabolicznej fagocytów RBA (Respiratory Burst Activity) i zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania PKA (Potential Killing Activity) oraz metodami cytometrycznymi: aktywności fagocytarnej (Phatogest) i metabolizmu tlenowego (Phagoburst) granulocytów i monocytów krwi obwodowej. Ponadto oznaczono i porównano wybrane parametry biochemiczne i nieswoistej odporności humoralnej metodami spektrofotometrycznymi: poziom białka całkowitego i jednej z jego frakcji, gammaglobulin, aktywność lizozymu oraz aktywność ceruloplazminy w surowicy krwi szczurów. Pozostałe 10 szczurów z grupy badanej oraz 10 z grupy kontrolnej otrzymywało, począwszy od 8 dnia, przez 14 kolejnych dni (dzień 8-21) Biolex–Beta HP w dawce 50 mg/kg masy ciała/dobę, jako dodatek do paszy. W 22 dniu doświadczenia wszystkie szczury z wyżej wspomnianych grup zostały uśpione przy pomocy Narcotanu i również bezpośrednio z serca, pobrano od nich krew na heparynę i surowicę, w celu oznaczenia i

porównania analogicznych parametrów immunologicznych, jak u wcześniej uśpionych zwierząt.

W układzie doświadczenia nie utworzono grupy poddanej działaniu cyklofosfamidu i badanej po 22 dniach doświadczenia, gdyż we wcześniejszych pilotażowych, badaniach własnych, które zostały opublikowane (Wójcik and Dąbkowska 2010), również w okresie 8-22 dnia doświadczenia obserwowano supresyjne działanie cyklofosfamidu w stosunku do wszystkich aktualnie ocenianych parametrów immunologicznych w porównaniu z grupą kontrolą bez cyklofosfamidu i ulegały one tylko nieznacznym wahaniom w tym okresie.

## **DOŚWIADCZENIE II**

Badania przeprowadzono na 32 jagniętach (16 samic i 16 samców) rasy Kamienieckiej w wieku  $30 \pm 3$  dni, podzielonych na 2 równe grupy po 16 sztuk: kontrolną oraz doświadczalną, analogiczne pod względem masy ciała, płci i typu urodzenia, a także wieku ich matek, dla wyeliminowania ewentualnych różnic w mleczności. Obie grupy jagnięt żywiono na jednakowym poziomie, zgodnie z normami dla jagnięt hodowlanych. Przez 60 dni eksperymentu jagnięta grupy kontrolnej karmiono mieszankę treściwą CJ® bez żadnych dodatków, a jagnięta grupy badanej oprócz mieszanki CJ®, w trakcie porannego karmienia, otrzymywały wraz z mlekiem do picia Biolex–MB40 w dawce 50 mg/kg m.c./dobę. W dniu rozpoczęcia doświadczenia (dzień 0) oraz w 15, 30 i 60 dnia eksperymentu, z żyły jarzmowej jagnięt, pobrano krew na heparynę i surowicę w celu oznaczenia i porównania wybranych parametrów nieswoistej odporności komórkowej metodami spektrofotometrycznymi: odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych LPS i ConA, aktywności metabolicznej fagocytów (RBA) i zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz metodami cytometrycznymi: aktywności fagocytarnej (Phatogest) i metabolizmu tlenowego (Phagoburst) granulocytów i monocytów krwi obwodowej. Ponadto oznaczono i porównano wybrane parametry biochemiczne i nieswoistej odporności humoralnej metodami spektrofotometrycznymi: poziom białka całkowitego, gammaglobulin, aktywność lizozymu oraz aktywność ceruloplazminy w surowicy krwi jagnięt.

## **DOŚWIADCZENIE III**

Badania przeprowadzono w prywatnym gospodarstwie rolnym w Księżym Dworze. Materiał badawczy stanowiło 14 cieląt rasy polskiej holsztyńsko–fryzyjskiej. Tuż po urodzeniu, w czasie nie dłuższym niż 1 godzina od wycielenia, cielęta otrzymywały pierwszą porcję siary. Siarę podawano w ilości 2 kg/szt/dzień przez okres 5 dni. Po zakończeniu okresu

siarowego, do 8 tygodnia życia, w żywieniu cieląt zastosowano preparat mlekozastępczy "Mlekowit" w ilości 4 litry/dzień/sztukę w 2 odpojeniach. 1-miesięczne cielęta włączano do badań, które trwały przez 60 kolejnych dni. W tym celu określono ich masy ciała i metodą analogów, zwierzęta podzielano na dwie grupy: kontrolną, której żywienie, bez suplementacji, odbywało się według zasad przyjętych w gospodarstwie oraz doświadczalną, której dietę suplementowano dodatkiem Leiber Beta-S (Leiber GmbH, Bramsche, Germany), rozprowadzanym w preparacie mlekozastępczym, w dawce 50 mg/kg masy ciała cieląt. Pasze stałe (kiszonka z kukurydzy, siano łąkowe oraz prestarter Jösera Kälberkost) zadawane były do woli począwszy od 1 tygodnia życia w małych, a następnie coraz większych ilościach. Cielęta miały zapewniony całodobowy dostęp do świeżej wody pitnej. Krew do badań (heparynizowana i na surowicę) pobierano od cieląt z żyły jarzmowej 4-krotnie, przed dodaniem Leiber Beta-S do paszy (dzień 0) oraz w 15, 30 i 60 dniu podawania tej substancji, w celu oznaczenia i porównania kształtowania się wybranych parametrów nieswoistej odporności komórkowej metodami spektrofotometrycznymi: odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych LPS i ConA, aktywności metabolicznej fagocytów (RBA) i zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz metodami cytometrycznymi: aktywności fagocytarnej (Phatogest) i metabolizmu tlenowego (Phagoburst) granulocytów i monocytów krwi obwodowej. Ponadto oznaczono i porównano wybrane parametry biochemiczne i nieswoistej odporności humoralnej metodami spektrofotometrycznymi: poziom białka całkowitego, gammaglobulin, aktywność lizozymu oraz aktywność ceruloplazminy w surowicy krwi jagniąt.

#### **OCENA PARAMETRÓW NIESWOISTEJ ODPORNOŚCI KOMÓRKOWEJ:**

- Badanie aktywności metabolicznej fagocytów, oceniane stopniem wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego RBA (Respiratory Burst Activity) wg Chunga i Secombesa (1988), w modyfikacji Siwickiego i wsp. (2004).
- Badanie zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania PKA (Potential Killing Activity) wg Rooka i wsp. (1995), w modyfikacji Siwickiego i wsp. (2004).
- Badanie aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów krwi z wykorzystaniem Phagotest - komercyjny test do cytometrii przepływowej, przygotowany i wykonany zgodnie z zaleceniami producenta.

- Badanie metabolizmu tlenowego granulocytów i monocytów krwi szczurów z wykorzystaniem Phagoburst - komercyjny test do cytometrii przepływowej, przygotowany i wykonany zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **OCENA ODPOWIEDZI PROLIFERACYJNEJ LIMFOCYTÓW KRWI:**

- Badanie aktywności proliferacyjnej limfocytów po stymulacji mitogenami: konkanawaliną A (ConA) oraz lipopolisacharydem (LPS) metodą MTT (3-[4,5-dimetylo-2-tiazolilo]-2,5-difenylo-2H-tetrazolinowy bromek), opisaną przez Mosmanna (1983) w modyfikacji Wagnera i wsp. (1999).

#### **OCENA PARAMETRÓW NIESWOISTEJ ODPORNOŚCI HUMORALNEJ:**

- Badanie aktywności lizozymu w surowicy krwi metodą spektrofotometryczną wg Parry i wsp. (1965), w modyfikacji Siwickiego i Andersona (1993).
- Badanie aktywności ceruloplazminy w surowicy krwi metodą spektrofotometryczną wg Siwickiego i Studnickiej (1986),
- Badanie poziomu frakcji gammaglobulinowej w surowicy krwi metodą precypitacji, w modyfikacji Siwickiego i Andersona (1993).

#### **OCENA PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH:**

- Badanie poziomu białka całkowitego w surowicy metodą turbidymetryczną według Lowry'ego i wsp. (1951), w modyfikacji Siwickiego i Andersona (1993).

*Szczegółowy opis metodyczny wykonywanych badań umieszczono w publikacjach stanowiących szczególne osiągnięcie. (Publikacje 1-6)*

#### **ANALIZA STATYSTYCZNA:**

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej w programie GraphPad Prism 5.0. Istotność różnic między grupami weryfikowano testem Bonferroni oraz testem t-Studenta. Za statystycznie istotne przyjmowano wartości przy prawdopodobieństwie  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ .

## WYNIKI

### DOŚWIADCZENIE I

Intoksykacja szczurów cyklofosfamidem spowodowała statystycznie istotne obniżenie o 15% poziomu białka całkowitego we krwi tych zwierząt, w porównaniu z grupą kontrolną. Jednak w grupie zwierząt intoksykowanych, a następnie suplementowanych Biolex–Beta HP poziom białka całkowitego statystycznie istotnie wzrósł o 21% i kształtował się na podobnym poziomie, co w grupie kontrolnej oraz traktowanej tylko Biolex–Beta HP, nie wykazując statystycznie istotnych różnic między tymi grupami.

W zakresie badanych wskaźników odporności humoralnej w grupie szczurów intoksykowanych cyklofosfamidem obserwowano spadek: aktywności lizozymu o 33%, aktywności ceruloplazminy o 21% oraz poziomu gammaglobulin o 19% w surowicy krwi szczurów w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Suplementacja diety preparatem Biolex–Beta HP w grupie zwierząt intoksykowanych przyczyniła się do poprawy wspomnianych parametrów. Obserwowano statystycznie istotny wzrost aktywności lizozymu, która wzrosła ponad dwukrotnie w porównaniu z grupą szczurów traktowanych cyklofosfamidem i prawie o połowę, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Aktywność ceruloplazminy oraz poziom gammaglobulin wzrosły odpowiednio o 28% i 21%, w porównaniu z grupą intoksykowaną i kształtowały się na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej. W grupie szczurów karmionych paszą z dodatkiem Biolex–Beta HP jedynie w zakresie aktywności ceruloplazminy nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic, w porównaniu z grupą kontrolną.

Również w zakresie ocenianych spektrofotometrycznie parametrów nieswoistej odporności komórkowej szczurów: aktywności metabolicznej fagocytów (RBA), zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych zarówno LPS, jak i ConA, obserwowano statystycznie istotne spadki tych wskaźników w grupie zwierząt intoksykowanych cyklofosfamidem, w porównaniu z grupą kontrolną szczurów. W grupie szczurów intoksykowanych i otrzymujących Biolex–Beta HP aktywność metabolizmu tlenowego fagocytów (RBA) oraz aktywność bójcza komórek żernych (PKA) były odpowiednio statystycznie istotnie wyższe o 113% i 69% w stosunku do grupy intoksykowanej i nie przekroczyły statystycznie istotnie aktywności w grupie kontrolnej. Natomiast w grupie szczurów karmionych paszą z dodatkiem Biolex–Beta HP w porównaniu z grupą kontrolną zarówno aktywność metabolizmu

tlenowego fagocytów (RBA) oraz aktywność bójcza komórek żernych (PKA) były odpowiednio statystycznie istotnie wyższe o 48% i o 19%. Ponadto u szczurów intoksykowanych, które otrzymywały Biolex–Beta HP, nastąpił wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów T (ConA) oraz B (LPS) i kształtował się na podobnym poziomie, co w grupie szczurów kontrolnych. W grupie szczurów karmionych paszą z dodatkiem Biolex–Beta HP, w porównaniu z grupą kontrolną, jedynie w przypadku aktywności proliferacyjnej limfocytów T (ConA) stwierdzono statystycznie istotne różnice.

Również badania cytometryczne wykazały jednoznacznie, że zastosowany do intoksykacji szczurów cyklofosfamid spowodował statystycznie istotny spadek aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów (Phagotest), wyrażony w postaci odsetka komórek fagocytujących oraz średniej intensywności fluorescencji (średnia liczba bakterii pochłoniętych przez te komórki) w porównaniu z grupą kontrolną. W grupach szczurów traktowanych cyklofosfamidem i otrzymujących w paszy Biolex–Beta HP oraz tylko sam Biolex–Beta HP, stwierdzono zdecydowany statystycznie istotny wzrost omawianych parametrów w porównaniu z grupą intoksykowaną. Ponadto procent granulocytów fagocytujących oraz średnia intensywność fluorescencji monocytów w grupie otrzymującej paszę z dodatkiem Biolex–Beta HP były statystycznie istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. Analizując aktywność fagocytarną komórek żernych pomiędzy grupami intoksykowaną i jednocześnie suplementowaną Biolex–Beta HP oraz kontrolną stwierdzono statystycznie istotny wzrost zarówno odsetka fagocytujących monocytów, jak i średniej liczby pochłoniętych przez nie bakterii w grupie intoksykowanej i suplementowanej Biolex–Beta HP. Ponadto w grupie tej, aktywność fagocytarna granulocytów kształtowała się na podobnym poziomie, co w grupie kontrolnej. Obserwowano również statystycznie istotny wzrost aktywności fagocytarnej granulocytów i monocytów w grupie szczurów traktowanych jedynie Biolex–Beta HP, w porównaniu z grupą kontrolną, z nieco zaskakującym brakiem takiej korelacji w przypadku średniej liczby pochłoniętych bakterii przez granulocyty.

Badając zdolność do wewnątrzkomórkowego niszczenia drobnoustrojów (wybuch tlenowy) przez fagocyty (Phagoburst), w zależności od rodzaju badanych komórek żernych i użytego do aktywowania tych komórek stymulatora, uzyskano zróżnicowany efekt. Generalnie w grupie zwierząt intoksykowanych cyklofosfamidem obserwowano spadek odsetka pobudzonych do wewnątrzkomórkowego niszczenia bakterii granulocytów oraz intensywności wybuchu tlenowego granulocytów (wyrażona, jako średnia intensywność fluorescencji) stymulowanych fMLP, PMA, jak i *E.coli* w porównaniu z grupą kontrolną. Podanie Biolex–Beta HP szczurom intoksykowanym cyklofosfamidem oraz

nieintoksykowanym spowodowało wzrost odsetka pobudzonych do wybuchu tlenowego granulocytów oraz intensywności tego wybuchu tlenowego w granulocytach, aktywowanych każdym z trzech stymulatorów, w odniesieniu do grupy szczurów otrzymujących tylko cyklofosfamid. Natomiast w porównaniu z grupą kontrolną, w grupach intoksykowanej cyklofosfamidem i jednocześnie suplementowanej Biolex–Beta HP oraz tylko suplementowanej Biolex–Beta HP, obserwowano zarówno statystycznie istotny wzrost odsetka pobudzonych do wybuchu tlenowego granulocytów, jednak stymulowanych PMA i *E.coli*, jak i statystycznie istotny wzrost intensywności wybuchu tlenowego w tych komórkach inkubowanych jedynie z *E.coli*.

Analizując zdolność wewnątrzkomórkowego niszczenia drobnoustrojów przez monocyty w grupach szczurów kontrolnych i intoksykowanych, pomimo generalnie niższych wartości badanych parametrów, nie wykazano statystycznie istotnych różnic jedynie w przypadku intensywności wybuchu tlenowego komórek stymulowanych fMLP w grupie szczurów po intoksykacji cyklofosfamidem. Natomiast w grupach szczurów, którym podawano cyklofosfamid i Biolex–Beta HP oraz tylko Biolex–Beta HP obserwowano statystycznie istotny wzrost odsetka pobudzonych do wybuchu tlenowego monocytów oraz wzrost intensywności tego wybuchu tlenowego, po aktywacji każdym z trzech użytych stymulatorów (fMLP, PMA i *E.coli*), w porównaniu z grupą szczurów otrzymujących tylko cyklofosfamid. Pomimo tych wzrostów, w grupie szczurów intoksykowanych i stymulowanych Biolex–Beta HP zarówno odsetek monocytów pobudzonych do wybuchu tlenowego, stymulowanych PMA i *E.coli*, jak i aktywność metabolizmu tlenowego monocytów, stymulowanych PMA, kształtowały się na statystycznie istotnie niższym poziomie niż w grupie kontrolnej. W efekcie tego, procent monocytów pobudzonych do wybuchu tlenowego stymulowanych PMA i *E.coli* oraz aktywność metabolizmu tlenowego monocytów, stymulowanych PMA w grupie szczurów traktowanych cyklofosfamidem i Biolex–Beta HP, były statystycznie istotnie niższe niż w grupie zwierząt otrzymujących tylko Biolex–Beta HP.

## **DOŚWIADCZENIE II**

Uzyskane w trakcie doświadczenia wyniki badań, wskazują na istotny wpływ 60-dniowej suplementacji diety preparatem Biolex-MB40, na oceniane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej jagniąt.

W zakresie badanych wskaźników odporności humoralnej jagniąt: aktywności lizozymu oraz aktywności ceruloplazminy w surowicy krwi owiec stwierdzono, statystycznie



istotnie wyższe wartości w grupie doświadczalnej, karmionej paszą z dodatkiem Biolex-MB40 niż w grupie kontrolnej, bez dodatku tego preparatu w paszy, w trakcie trwania całego doświadczenia. Natomiast w odniesieniu do poziomu gammaglobulin w surowicy krwi owiec obserwowano, jedynie 30 i 60 dnia badań, statystycznie istotny wzrost tych wartości w grupie doświadczalnej, w porównaniu z grupą kontrolną jagniąt. Jedynie w stosunku do poziomu białka całkowitego w surowicy krwi owiec nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą doświadczalną, a grupą kontrolną jagniąt. Ponadto zarówno w zakresie aktywności ceruloplazminy, jak i lizozymu, jedynie w grupie zwierząt doświadczalnych, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost tych parametrów w kolejnych dniach eksperymentu (15, 30, 60), w porównaniu do dnia rozpoczęcia badań (0).

Również w zakresie ocenianych spektrofotometrycznie parametrów nieswoistej odporności komórkowej jagniąt: aktywności metabolicznej fagocytów (RBA), zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych zarówno LPS, jak i ConA, obserwowano statystycznie istotne wzrosty tych wskaźników w grupie doświadczalnej, w porównaniu z grupą kontrolną jagniąt. Jedynie 60 dnia aktywność metaboliczna fagocytów (RBA) w grupie doświadczalnej nie wykazywała statystycznie istotnego wzrostu w porównaniu z grupą kontrolną owiec. Ponadto zarówno aktywność metaboliczna fagocytów (RBA), jak i odpowiedź proliferacyjna limfocytów (MTT) stymulowanych LPS i ConA, statystycznie istotnie wzrosły jedynie w grupie zwierząt doświadczalnych, w kolejnych dniach eksperymentu (15, 30, 60) w porównaniu do dnia rozpoczęcia badań (0).

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań cytometrycznych stwierdzono statystycznie istotny wzrost średniej aktywności fagocytarnej granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej w grupie owiec doświadczalnych, traktowanych dodatkiem Biolex-MB40 w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych żywionych bez żadnych dodatków oraz w stosunku do jej średnich wartości wyjściowych (dzień 0), w trakcie trwania całego doświadczenia. Wzrost ten uzyskano zarówno w zakresie średniego odsetka komórek fagocytujących, jak również średniej intensywności fluorescencji, pozwalającej określić ilość bakterii sfagocytowanych przez jeden fagocyt. Analogiczne wyniki uzyskano również w zakresie średniej aktywności fagocytarnej i średniej intensywności fluorescencji monocytów krwi obwodowej owiec grup kontrolnej i doświadczalnej oraz w stosunku do jej średnich wartości wyjściowych (dzień 0), w trakcie trwania całego doświadczenia.

Również w odniesieniu do średniej intensywności wybuchu tlenowego granulocytów krwi obwodowej owiec grupy doświadczalnej stwierdzono stymulujący wpływ preparatu

Biolex-MB40, w porównaniu z grupą kontrolną oraz w stosunku do jej średnich wartości wyjściowych (dzień 0). Dotyczyło to zarówno średniego procenta komórek pobudzonych do wybuchu tlenowego, jak również średniej intensywności fluorescencji, określającej intensywność tego wybuchu tlenowego w poszczególnych granulocytach. Jednak jedynie po stymulacji silnym aktywatorem wybuchu oddechowego, jakim jest PMA oraz bakteriami *E. coli* obserwowano statystycznie istotny wzrost średnich wspomnianych parametrów w trakcie trwania całego doświadczenia. Natomiast po stymulacji słabym aktywatorem wybuchu oddechowego, jakim jest fMLP, statystycznie istotne różnice stwierdzono dopiero od 30 dnia podawania preparatu Biolex-MB40 do ostatniego dnia (60) doświadczenia.

Podobny efekt, jak w przypadku stymulacji granulocytów *E. coli* i PMA, obserwowano również po stymulacji tymi czynnikami monocytów krwi obwodowej do wybuchu oddechowego, który w obu przypadkach, zarówno w zakresie średniego odsetka komórek pobudzonych, jak i średniej intensywności wybuchu tlenowego był statystycznie istotnie wyższy w grupie jagniąt stymulowanych Biolex-MB40, niż w grupie kontrolnej oraz w stosunku do ich średnich wartości wyjściowych (dzień 0). Zgoła odmienny wynik uzyskano po stymulacji monocytów do wybuchu oddechowego za pośrednictwem fMLP, gdyż pomimo wyższych wartości średniego odsetka monocytów pobudzonych w grupie zwierząt badanych w porównaniu z grupą kontrolną oraz w stosunku do ich średnich wartości wyjściowych (dzień 0), nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w trakcie trwania całego doświadczenia. Natomiast w zakresie średniej intensywności fluorescencji monocytów po stymulacji fMLP, pomimo iż była ona wyższa w grupie zwierząt badanych, niż w grupie kontrolnej oraz w stosunku do jej średniej wartości wyjściowej (dzień 0), statystycznie istotne różnice odnotowano jednak dopiero od 30 dnia do końca trwania doświadczenia.

### **DOŚWIADCZENIE III**

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań wybranych parametrów odporności humoralnej, zaobserwowano w grupie cieląt doświadczalnych, suplementowanych przez 60 dni preparatem Leiber Beta-S, statystycznie istotny wzrost aktywności lizozymu (15 i 30 dzień doświadczenia), aktywności ceruloplazminy (15 dzień) oraz poziomu gammaglobulin (30 i 60 dzień), w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych, karmioną bez żadnych dodatków. Porównując wyniki badań odporności humoralnej, uzyskane w kolejnych dniach eksperymentu, w grupie cieląt doświadczalnych w odniesieniu do dnia rozpoczęcia badań (dzień 0) zaobserwowano statystycznie istotny wzrost aktywności lizozymu (30 dzień),

aktywności ceruloplazminy (15 dzień) oraz poziomu gammaglobulin (przez cały okres trwania eksperymentu). Białko całkowite, jako biochemiczny parametr, pomimo nieco wyższych poziomów, w poszczególnych dniach eksperymentu, w grupie doświadczalnej cieląt niż w grupie kontrolnej, nie wykazywało statystycznie istotnych różnic. Jedynie w grupie doświadczalnej zwierząt ostatniego dnia badania zanotowano statystycznie istotny wzrost jego poziomu, w porównaniu z dniem początkowym doświadczenia (0).

W zakresie badanych spektrofotometrycznie parametrów odporności komórkowej cieląt stwierdzono w grupie zwierząt doświadczalnych 15 i 30 dnia eksperymentu statystycznie istotny wzrost zarówno aktywności metabolicznej fagocytów krwi (RBA), jak i zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz 15, 30 i 60 dnia statystycznie istotny wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów (MTT), stymulowanych zarówno LPS (limfocyty B), jak i ConA (limfocyty T), w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto 15 i 30 dnia eksperymentu w grupie zwierząt doświadczalnych, wszystkie wyżej wspomniane parametry odporności komórkowej, statystycznie istotnie wzrosły w porównaniu z dniem rozpoczęcia badań (0).

Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań cytometrycznych (Phagotest), stwierdzono 15 i 30 dnia doświadczenia, statystycznie istotny wzrost średniej aktywności fagocytarnej neutrofilii krwi obwodowej w grupie doświadczalnej cieląt żywionych dodatkiem preparatu Leiber Beta-S, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt żywionych bez tego dodatku. Analogiczny wzrost uzyskano również w zakresie średniej intensywności fluorescencji granulocytów. Ponadto w obrębie grupy doświadczalnej cieląt, wykazano jedynie 30 dnia eksperymentu statystycznie istotny wzrost średniego odsetka granulocytów fagocytujących oraz 15 i 30 dnia statystycznie istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej cieląt, w porównaniu do średnich tych wartości wyjściowych z dnia rozpoczęcia doświadczenia (0). Reaktywność drugiej badanej subpopulacji leukocytów okazała się nieco odmienna, gdyż 15, 30 i 60 dnia doświadczenia w grupie doświadczalnej cieląt obserwowano statystycznie istotny wzrost średniego odsetka monocytów fagocytujących i tylko 30 dnia doświadczenia statystycznie istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji, w porównaniu z grupą kontrolną cieląt. W analogicznych okresach trwania doświadczenia, odnotowano w grupie doświadczalnej zwierząt statystycznie istotne wzrosty średniego odsetka monocytów fagocytujących (15, 30 i 60 dnia) oraz tylko 30 dnia statystycznie istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji monocytów, w porównaniu do średnich tych wartości wyjściowych (dzień 0).

Zdolność granulocytów i monocytów do produkcji silnie utleniających związków (wybuchu tlenowego) oceniono również cytometrycznie za pomocą testu Phagoburst i poddano analizie programem FlowJo. W grupie cieląt doświadczalnych odsetek granulocytów zdolnych do wybuchu tlenowego był statystycznie istotnie wyższy 15 dnia (po stymulacji PMA, fMLP i bakteriami *E. coli*) i 30 dnia badań (po stymulacji PMA i *E. coli*), w porównaniu z grupą kontrolną cieląt. Również 15 i 30 dnia badań w grupie cieląt doświadczalnych, obserwowano statystycznie istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji neutrofilii, po pobudzeniu przez fMLP i *E. coli*, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt. Natomiast po zastosowaniu PMA, jako aktywatora wybuchu oddechowego, wzrost ten obserwowano 30 i 60 dnia doświadczenia. Ponadto stwierdzono statystycznie istotny wzrost średniego odsetka neutrofilii pobudzonych do wybuchu tlenowego w grupie doświadczalnej cieląt, 15 dnia eksperymentu po stymulacji wszystkimi trzema aktywatorami wybuchu oddechowego (PMA, fMLP i *E. coli*) oraz 30 dnia po stymulacji PMA i *E. coli*, w porównaniu z średnimi tych wartości uzyskanymi w dniu rozpoczęcia doświadczenia (dzień 0). Natomiast średnie intensywności fluorescencji granulocytów, w grupie doświadczalnej cieląt, statystycznie istotnie wzrosły 30 dnia (po stymulacji PMA, fMLP i *E. coli*) oraz 60 dnia badań (PMA i fMLP) w porównaniu z średnimi tych wartości uzyskanymi w dniu rozpoczęcia doświadczenia (dzień 0).

Odmienne efekty zaobserwowano po analizie wyników uzyskanych w teście Phagoburst w obrębie drugiej badanej subpopulacji leukocytów, gdzie w grupie cieląt doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną, odsetek monocytów pobudzonych do wybuchu tlenowego był statystycznie istotnie wyższy tylko 30 dnia po stymulacji fMLP, 60 dnia po stymulacji PMA i 15, 30 i 60 dnia po stymulacji bakteriami *E. coli*, a średnia intensywności fluorescencji była statystycznie istotnie wyższa jedynie 60 dnia po stymulacji wszystkimi trzema aktywatorami wybuchu oddechowego. Ponadto w grupie doświadczalnej cieląt wykazano, statystycznie istotny wzrost: średniego odsetka monocytów pobudzonych do wybuchu tlenowego 60 dnia badania po stymulacji PMA oraz 15 i 30 dnia po stymulacji bakteriami *E. coli*, a także średniej intensywności fluorescencji monocytów 60 dnia doświadczenia, po stymulacji wszystkimi trzema aktywatorami wybuchu oddechowego (fMLP, PMA i bakteriami *E. coli*), w porównaniu z średnimi tych wartości uzyskanymi w dniu rozpoczęcia doświadczenia (dzień 0).

## **PODSUMOWANIE I WNIOSKI**

1. Cyklofosfamid, zgodnie z założeniami, okazał się silnym supresorem układu immunologicznego, czego efektem był spadek wszystkich ocenianych parametrów immunologicznych szczurów.
2. Preparat Biolex–Beta HP, o 85% zawartości  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu, cechował się dużą skutecznością immunokorygującą, dzięki czemu uległy poprawie wszystkie upośledzone przez cyklofosfamid parametry nieswoistej odpowiedzi komórkowej i humoralnej szczurów, a po 14 dniach suplementacji diety szczurów nastąpił powrót organizmu do homeostazy. Większości badanych parametrów powróciła do poziomu sprzed supresji indukowanej cyklofosfamidem, natomiast aktywność ceruloplazminy i lizozymu zdecydowanie przekroczyły ten poziom.
3. Przez wzgląd na brak wyników badań u jagniąt, dotyczących jednoczesnego wykorzystania mannanoligosacharydów i  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanów w żywieniu tych zwierząt i oceny ich wpływu na układ immunologiczny, szczególnie istotne wydają się uzyskane pozytywne efekty 60-dniowej suplementacji diety jagniąt preparatem Biolex-MB40, na oceniane parametry nieswoistej odporności humoralnej (wzrost aktywności lizozymu i ceruloplazminy) i komórkowej (wzrost aktywności fagocytarnej i metabolicznej granulocytów i monocytów oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów T i B).
4. Nieco zaskakujący wydaje się efekt pobudzenia aktywności fagocytarnej u jagniąt po zastosowaniu Biolex-MB40, ocenianej spektrofotometrycznie, gdzie pomimo jej wzrostu przez cały okres badań, statystycznie istotny obserwowano tylko 15 dnia eksperymentu, natomiast w trakcie oceny cytometrycznej tendencja ta utrzymywała się przez 60 dni doświadczenia.
5. Dieta cieląt wzbogacona dodatkiem Leiber Beta-S, zawierającym 80% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukan, stosowana przez 60 dni eksperymentu, wywierała istotny wpływ na wzrost ocenianych parametrów nieswoistej odporności komórkowej (wzrost aktywności fagocytarnej i metabolicznej granulocytów i monocytów oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów T i B) i humoralnej (wzrost aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz poziomu gammaglobulin).
6. Suplementacja diety jagniąt Biolex-MB40 spowodowała wzrost odsetka pochłoniętych bakterii przez jeden granulocyt i monocyt krwi obwodowej, oceniany cytometrycznie, przez cały okres eksperymentu, który u cieląt po podaniu Leiber Beta-S utrzymywał

się tylko do 30 dnia badań w grupach doświadczalnych jagniąt i cieląt w porównaniu z grupami kontrolnymi tych zwierząt.

7. Większość ocenianych parametrów nieswoistej odporności komórkowej i humoralnej u jagniąt karmionych z dodatkiem preparatu Biolex-MB40 wzrastała przez cały okres doświadczenia (60 dni), natomiast u cieląt suplementowanych Leiber Beta-S tylko przez pierwsze 30 dni badań.
8. Za stosowaniem tego typu preparatów przemawia dodatkowo fakt, że przy dobrym efekcie immunostymulacyjnym, nie wykazują one toksycznego działania dla organizmu i mogą być bezpiecznie stosowane.
9. Uzyskane wyniki mogą stanowić zachętę do dalszych badań nad możliwością praktycznego wykorzystania ocenianych preparatów w immunoprofilaktyce różnych gatunków zwierząt i ludzi, jak również do korygowania upośledzonej odporności, zwłaszcza w najmłodszym wieku, szczególnie predysponującym do zwiększonej zapadalności na różnego rodzaju infekcje bakteryjne i wirusowe.

## **LITERATURA**

1. Abel G., Czop J.K.: Stimulation of human monocyte beta-glucan receptors by glucan particles induces production of TNF-alpha and IL-1 beta. *Int J Immunopharmacol.* 1992, 14: 1363–1373.
2. Abreu L.A., Abreu R.R.: Effect of cyclophosphamide on serum ceruloplasmin oxidase activity in sarcoma bearing rats. *Arch Geschwulstforsch.* 1981, 51: 394-397.
3. Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E.: Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas).* 2007, 43: 597-606.
4. Al-Ghazlat S.: Immunosuppressive therapy for canine immune-mediated hemolytic anemia. *Compend Contin Educ Vet.* 2009, 31: 33-41.
5. Almkvist J., Karlsson A.: Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J.* 2004, 19: 575–581.
6. Aubrey D.A.: Massive hepatic necrosis after cyclophosphamide. *Br Med J.* 1970, 3: 588.
7. Bafna A.R., Mishra S.H.: Protective effect of bioactive fraction of *Sphaeranthus indicus* Linn. against cyclophosphamide induced suppression of humoral immunity in mice. *J Ethnopharmacol.* 2006, 104: 426-429.

8. Ben-Efraim S.: Immunomodulating anticancer alkylating drugs: targets and mechanisms of activity. *Curr Drug Targ.* 2001, 2: 197–212.
9. Biedrzycka E.: Probiotyki i prebiotyki – dwa różne mechanizmy modulacji odpowiedzi poprzez immunoglobulinę A (IgA). In: *Naturalne i syntetyczne modulatory odpowiedzi immunologicznej i angiogenezy*, Edited by A.K. Siwicki, E. Skopińska-Różewska, Edycja, Olsztyn, 2006, 87-93.
10. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E.: Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004, 229: 393-406.
11. Brown G.D.: Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol.* 2006, 6: 33–43.
12. Brown G.D., Gordon S.: Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001, 413: 36-37.
13. Carraway K.L., Ramsauer V.P., Haq B., Carothers Carraway C.A.: Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays.* 2003, 25: 66–71.
14. Carrow D.J.: Beta-1,3-glucan as a primary immune activator. *Townsend Lett.* 1996, 8: 86-91.
15. Che T.M., Johnson R.W., Kelley K.W., Dawson K.A., Moran C.A., Pettigrew J.E.: Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretions by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs. *J Anim Sci.* 2012, 90: 657-668.
16. Chung S., Secombes C.J.: Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comp Biochem Physiol.* 1988, 89 B: 539-544.
17. Compton R., Williams D., Browder W.: The beneficial effect of enhanced macrophage function on the healing of bowel anastomoses. *Am Surg.* 1996, 62: 14-18.
18. Czop K.: The role of beta-glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. *Pathol Immunopathol Res.* 1986, 5: 286-296.
19. Czop J.K., Austen K.F.: Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their beta-glucan receptor during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985, 82: 2751-2755.
20. Fernandez F., Hinton M., Van Gils B.: Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella Enteritidis* colonization. *Avian Pathol.* 2002, 31: 49-58.

21. Gallin E.K., Green S.W., Patchen M.L.: Comparative effects of particulate and soluble glucan on macrophages of C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Int J Immunopharmacol.* 1992, 14: 173–183.
22. Ganz T.: Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1987, 55: 568-571.
23. Gately M.K., Renzetti L.M., Magram J., Stern A.S., Adorini L., Gubler U., Presky D.H.: The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998, 16: 495-521.
24. Gu M., Ma H., Mai K., Zhang W., Bai N., Wang X.: Effects of dietary  $\beta$ -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2011, 31: 303-309.
25. Harris G., KuoLee R., Chen W.: Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2006, 12: 2149–2160.
26. Johnson A.G.: Molecular adjuvants and immunomodulators: New approaches to immunization. *Clin Microbiol Rev.* 1991, 7, 277-289.
27. King P.D., Perry M.: Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist.* 2001, 6: 162-176.
28. Lackovic V., Borecky L., Sikl D., Masler L., Bauer S.: Stimulation of interferon production by mannans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1970, 134: 874-879.
29. Li L.I., Hamilton R.F. Jr., Holian A.: Effect of acrolein on human alveolar macrophage NF- $\kappa$ B activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999, 277: 550–557.
30. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265-275.
31. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983, 65: 55-63.
32. Mosmann T.R., Coffman R.L.: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989, 7: 145-173.
33. Myśliwski A., Dzierzbicka K., Wardowska A.: Immunomodulatory naturalne: muramyłodipeptyd (MDP) tuftsyna modyfikowane drogą syntezy nowych pochodnych. In: Naturalne i syntetyczne modulatory odpowiedzi immunologicznej i angiogenezy, Edited by A.K. Siwicki, E. Skopińska-Różewska, Edycja, Olsztyn, 2006, 27-32.



34. Netea M.G., Gow N.A., Munro C.A., Bates S., Collins C., Ferwerda G., Hobson R.P., Bertram G., Hughes H.B., Jansen T., Jacobs L., Buurman E.T., Gijzen K., Williams D.L., Torensma R., McKinnon A., MacCallum D.M., Odds F.C., Van der Meer J.W., Brown A.J., Kullberg B.J.: Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006, 116: 1642–1650.
35. Ohno N., Egawa Y., Hashimoto T., Adachi Y., Yadomae T.: Effect of beta-glucans on the nitric oxide synthesis by peritoneal macrophage in mice. *Biol Pharm Bull.* 1996, 19: 608-612.
36. Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97: 13766-13771.
37. Parry R.M. Jr., Chandan R.C., Shahani R.M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1965, 119: 384-386.
38. Pelizon A.C., Kaneno R., Soares A.M., Meira D.A., Sartori A.: Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Res.* 2005, 54: 557-564.
39. Quakyi E.K., Carter P.H., Tsai C.M., Marti G.E.: Immunization with meningococcal membrane-bound lipooligosaccharide accelerates granulocyte recovery and enhances lymphocyte proliferation in myelosuppressed mice. *Pathobiology.* 1997, 65: 26–38.
40. Refstie S., Baeverfjord G., Seim R.R., Elvebø O.: Effects of dietary yeast cell wall  $\beta$ -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture.* 2010, 305: 109–116.
41. Ranta K., Nieminen K., Saariaho T., Kortekangas-Savolainen O., Kumpula E.K., Kosonen J., Pasanen A.L., Savolainen J.: Evaluation of fungal extracts to determine immunomodulatory properties. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013, 23: 226-233.
42. Rasmussen L.T., Seljelid R.: Novel immunomodulators with pronounced in vivo effects caused by stimulation of cytokine release. *J Cell Biochem* 1991, 46: 60–68.
43. Robinson J.M., Ohira T., Badwey J.A.: Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics and microscopy. *Histochem Cell Biol.* 2004, 122: 293–304.

44. Rook G.A., Steele J., Umar S., Dockrell H.M.: A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J Immunol Methods*. 1985, 82: 161-167.
45. Sadeghi A.A., Mohammadi A., Shawrang P., Aminafshar M.: Immune responses to dietary inclusion of prebiotic-based mannan-oligosaccharide and  $\beta$ -glucan in broiler chicks challenged with *Salmonella enteritidis*. *Turk J Vet Anim Sci*. 2013, 37: 206-213.
46. Seifert S., Watzl B.: Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *J Nutr*. 2007, 137: 2563S–2567S.
47. Siwicki A.K., Anderson D.P.: Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. US Fish Wildlife Service, IFI, Olsztyn. 1993, 1: 17.
48. Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Nartowska J., Małaczewska J., Wójcik R., Sommer E., Trapkowska S., Filewska M., Skurzak H.: Effect of Immunostim Plus – a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on granulocyte activity and tumour angiogenesis in mice. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2004, 48: 489-492.
49. Siwicki A.K., Studnicka M.: Ceruloplasmin activity in carp (*Cyprinus carpio*). *Bamidgeh*. 1986, 38: 126-129.
50. Thomas W.E., Nilsson L.M., Forero M., Sokurenko E.V., Vogel V.: Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2004, 53: 1545-1557.
51. Tzianabos A.O.: Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev*. 2000, 13: 523-533.
52. Tzianabos A.O., Cisneros R.L.: Prophylaxis with the immunomodulator PGG glucan enhances antibiotic efficacy in rats infected with antibiotic-resistant bacteria. *Ann NY Acad Sci*. 1996, 797: 285-287.
53. Vetvicka V., Vetvickova J., Frank J., Yvin J.C.: Enhancing effects of new biological response modifier  $\beta$ -1,3 glucan sulfated PS3 on immune reactions. *Biomed Pharmacother*. 2008, 62: 283-288.
54. Wagner U., Burkhardt E., Failing K.: Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the <sup>3</sup>H-thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999, 70: 151-159.

55. Werner G.H., Jolles P.: Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical application. *Eur J Biochem.* 1996, 242, 1-19.
56. Wiśniewski J., Siwicki A.K., Wiśniewska M.: Wprowadzenie do ogólnej i klinicznej immunologii weterynaryjnej. Wydawnictwo UW-M, Olsztyn, 2004, 212-226.
57. Yang Y., Iji P.A., Kocher A., Mikkelsen L.L., Choct M.: Effects of mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the response of broilers to pathogenic *Escherichia coli* challenge. *Br Poult Sci.* 2008, 49: 550-559.
58. Zhu L.P., Cupps T.R., Whalen G., Fauci A.S.: Selective effects of cyclophosphamide therapy on activation, proliferation and differentiation of human B cells. *J Clin Invest.* 1987, 79: 1082-1090.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych:**

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

Pierwszy etap mojej pracy naukowej rozpocząłem w 1995 roku w Pracowni Wirusologicznej, Katedry Mikrobiologii, Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie, gdzie pod opieką prof. dr hab. Jerzego Wiśniewskiego poznałem podstawowe techniki badawcze stosowane w wirusologii i immunologii. Brałem udział w badaniach określających różnice w zakresie właściwości immunogennych białek otoczkowych dwóch szczepów wirusa BHV1 (bovine herpesvirus 1), pierwszy IPV (szczep 508/89) izolowany z narządów płciowych, drugi IBR (szczep Cooper) izolowany z układu oddechowego oraz w ocenie odpowiedzi serologicznej i alergicznej cieląt sztucznie zakażonych tymi szczepami wirusa, przy wykorzystaniu odczynu seroneutralizacji (SN24), hamowania migracji leukocytów (LMI), testu transformacji blastycznej (TB) i ELISA oraz pomiaru zgrubienia fałdu skórniego. Wyniki naszych badań dowiodły istnienia nieznaczących różnic w zakresie właściwości antygenowych badanych szczepów oraz silniejszej immunogenności szczepu pneumotropowego (IBR). Uczestniczyłem również w badaniach, podczas których, w pojedynczych przypadkach pobieranych prób, izolowano wirus choroby Aujeszkiego (identyfikowany odczynem SN) z leukocytów krwi i węzłów chłonnych, pobranych od nieszczepionych świń rzeźnych, co sugerowało możliwość występowania u tych zwierząt zakażeń latentnych.

Po przejściu pod opiekę dr hab. Grażyny Świącickiej-Grabowskiej, prof UW-M i przejęciu kierownictwa Katedry przez prof. dr hab. Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, mój

profil badawczy uległ zmianie. Początkowo dotyczył on oceny wpływu wybranych pestycydów (IPO-63, Diazinon, Foschlor i Neguvon) *in vitro* na reaktywność leukocytów i namnażanie się wirusa choroby Newcastle (NDV - Newcastle disease virus) w hodowlach komórkowych traktowanymi tymi pestycydami oraz *in vivo* na namnażanie i rozmieszczenie wirusa choroby Newcastle w narządach kurcząt intoksykowanych tymi pestycydami. Na podstawie analizy wyników testu transformacji blastycznej, spontanicznej migracji leukocytów i odczynu fagocytarnego stwierdzono zróżnicowaną reaktywność leukocytów zależną od rodzaju i dawki działającego na nie pestycydu. Ponadto w hodowlach komórkowych, na zarodkach kurzych i w narządach pierwotnego powinowactwa (płuca) zwierząt, traktowanych pestycydami, uzyskano wyższe miana wirusa niż w hodowlach kontrolnych bez preparatów, co wskazywało na pobudzające działanie na namnażanie wirusów i silniejszą aktywację komórek immunokompetentnych przez pestycydy.

W późniejszym etapie mój profil badawczy ukierunkowany został na badanie wpływu preparatów stymulujących układ odpornościowy (biostymina, lewamizol, izoprynozyne, *Propionibacterium acnes*, Lydium KLP-602, *Mycobacterium chelonae* węgiel drzewny i wodny wyciąg z surowego czosnku) u różnych gatunków zwierząt i do dzisiaj jest on dominujący w mojej pracy naukowej. Efektem tych badań była 06 grudnia 2001 roku, obrona mojej pracy doktorskiej pt.: „Wpływ wybranych immunomodulatorów na kształtowanie się odporności poszczepiennej u indyków”, która została nagrodzona przez Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. W tym okresie ukazało się 6 prac oryginalnych oraz 12 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakaty), których byłem pierwszym autorem lub współautorem.

#### Prace oryginalne:

1. Wiśniewski J., Rutherford M., Świąćicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**: Serological and allergic response of calves experimentally infected with IPV or IBR strains of bovine herpesvirus type 1 (BHV 1). Acta Acad Agricult Tech Olst 1996, 24: 93-100.
2. Wiśniewski J., Rutherford M., **Wójcik R.**: Untersuchungen uber eine Serokonversion nach intradermal Verabreichung des BHV-1 Antigenes beim Rind. Tierarztl Umschau 1997, 52: 122-127.
3. Świąćicka-Grabowska G., Majewska T., **Wójcik R.**, Gałęcki W., Wiśniewski J., Kozłowski K.: Wpływ niekonwencjonalnych dodatków paszowych w żywieniu indyków rzeźnych na kształtowanie się wybranych wskaźników odporności nieswoistej. Zeszyty Naukowe Przeglądu Hodowlanego PTZ 1998, 36: 177-183.
4. Wiśniewski J., Świąćicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**: Cellular response of calves experimentally infected with IPV or IBR strains of bovine herpesvirus type 1 (BHV 1). Natur Sci 1999, 2: 229-236. (obecnie, Polish Journal of Natural Sciences)
5. Świąćicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**, Wiśniewski J.: Przeciwwirusowa odpowiedź immunologiczna kurcząt stymulowana *Propionibacterium acnes*. Med Weter 1999, 55: 669-671.
6. Świąćicka-Grabowska G., **Wójcik R.**, Rotkiewicz Z., Zasadowski A.: The effect of selected pesticides on leucocytes reactivity in studies performed *in vitro*. Acta Pol. Toxicol. 2001, 9 (2), 133-141. (obecnie Acta Toxicologica)

Doniesienia:

1. Wiśniewski J., Rutherford M., Święcicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**: Krzyżowa serologiczna i alergiczna odpowiedź cieląt na antygeny szczepów IPV i IBR wirusa BHV 1. X Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Wrocław 1996, 454.
2. Wiśniewski J., Rutherford M., **Wójcik R.**: Badanie alergiczne bydła w kierunku zakażeń BHV-1, problem serokonwersji. X Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Wrocław 1996, 455.
3. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**, Wiśniewski J., Rotkiewicz Z.: Badanie latencji zakażeń wirusem choroby Aujeszkiego u świń. PTNW Wrocław 1996, 437.
4. Święcicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**, Wiśniewski J.: Stymulacja swoistej i nieswoistej odporności p/zakaźnej kurcząt poddanych unieruchomieniu. II Krajowe Sympozjum Immunologów Weterynaryjnych „Biologia molekularna w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt”, Świnoujście 1997, 196.
5. Święcicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z., **Wójcik R.**, Wiśniewski J.: Ocena wpływu biotropiny i lewamizolu na wybrane wskaźniki odporności swoistej i nieswoistej u kurcząt. II Krajowe Sympozjum Immunologów Weterynaryjnych „Biologia molekularna w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt”, Świnoujście 1997, 176.
6. Majewska T., Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**, Pyrek D.: Wyniki produkcyjne i kształtowanie się odporności nieswoistej u indyków rzeźnych żywionych mieszankami z udziałem owsa. Future Breeding Programmes and Animal Welfare, AR Kraków, 22-23. 06.1998, 101-102.
7. Święcicka-Grabowska G., Majewska T., Gałęcki W., Jankowski J., **Wójcik R.**: Kształtowanie się wskaźników odporności nieswoistej u indyków rzeźnych w żywieniu których zastosowano dodatki stymulatorów odporności. International Symposium of Young Poultry Scientist WPSA, Book of Abstracts (II), Olsztyn, Stare Jabłonki, 1998, 42.
8. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**, Rotkiewicz Z., Zasadowski A., Budrewicz B.: Ocena reaktywności komórek immunokompetentnych traktowanych pestycydami w hodowlach *in vitro*. Materiały Konferencji „Toksykologiczne i Farmakologiczne Aspekty Działania Ksenobiotyków”, Olsztyn 2000, 38.
9. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: Reaktywność układu odpornościowego intoksykowanych ptaków na żywy i inaktywowany antygen wirusowy. Mikrobiologia na przełomie wieków, Olsztyn 2000, 178.
10. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: Rozmieszczenie wirusa choroby Newcastle w narządach kurcząt intoksykowanych IPO-63 i Neguvonem. Mikrobiologia na przełomie wieków, Olsztyn 2000, 179.
11. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Namnażanie się wirusa choroby Newcastle w hodowlach komórek traktowanych wybranymi pestycydami. Mikrobiologia na przełomie wieków, Olsztyn 2000, 184.
12. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G., Rotkiewicz Z.: Próba reizolacji wirusa choroby Aujeszkiego z leukocytów i węzłów chłonnych pobranych od świń po uboju. Mikrobiologia na przełomie wieków, Olsztyn 2000, 185.

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

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk weterynaryjnych opublikowałem wyniki badań przedstawione w pracy doktorskiej, czego efektem było 7 prac oryginalnych i 6 doniesień konferencyjnych (ustne lub plakaty).

Prace oryginalne:

1. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Parametry biochemiczne oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych szczepem Roakin wirusa NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyiny. Med Weter 2003, 59: 713-717.
2. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Parametry odporności swoistej u indyków szczepionych wirusem NDV po podaniu lewamizolu lub izoprynozyiny. Med Weter 2003, 59: 808-810.
3. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Reactivity of the immunological system of turkeys infected with the Newcastle virus after intoxication with carbaryl. Pol J Vet Sci 2004, 7: 9-13.
4. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G., Siwicki A.K.: Wpływ lewamizolu i izoprynozyiny na odporność nieswoistą u indyków supresorowanych karbarylem. Med Weter 2004, 60: 437-440.
5. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Parametry biochemiczne oraz odporności nieswoistej u indyków uodpornionych wirusem ND po podaniu KLP-602 i *Mycobacterium chelonae*. Med Weter 2006, 62: 830-833.

6. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Wpływ KLP-602 i *Mycobacterium chelonae* na odporność swoistą u indyków szczepionych wirusem ND. Med Weter 2006, 62: 922-924.
7. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Wybrane parametry odporności nieswoistej u indyków szczepionych Dindorałem-SPF po podaniu lewamizolu i izoprynozyny. Med Weter 2006, 62: 1256 - 1260.

Doniesienia:

1. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: An evaluation of the modifying effect of a single and repeated administration of *M. chelonae* on the immunity system in turkeys. Pol J Vet Sci 2001, 4: 177.
2. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: A comparison of the level of immunity antiviral parameters in turkeys stimulated with Levamisol and KLP-602. Pol J Vet Sci 2001, 4: 182.
3. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Influence of KLP-602 and *Mycobacterium chelonae* on specific immunity in turkey vaccinated with ND virus. Med Weter 2005, 61 (Supl.): 20.
4. **Wójcik R.**, Święcicka-Grabowska G.: Biochemical and nonspecific immunity parameters i turkeys vaccinated with ND virus after KLP-602 or *Mycobacterium chelonae* administration. Med Weter 2005, 61 (Supl.): 23.
5. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Święcicka-Grabowska G., Siwicki A.K.: Effect of *Mycobacterium chelonae* on non-specific and specific cellular immunity in turkeys intoxicated by carbaryl. Centr Eur J Immunol 2008, 33 (Supl. I): 176.
6. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Święcicka-Grabowska G., Siwicki A.K.: Antiviral immunological response of turkeys stimulated with *Mycobacterium chelonae*. Centr Eur J Immunol 2008, 33 (Supl. I): 175.

Po nawiązaniu współpracy z prof. dr hab. Ewą Skopińską-Różewską z Uniwersytetu Medycznego w Warszawie brałem czynny udział w badaniach nad kilkoma preparatami immunostymulującymi. Pierwszym z nich był naturalny preparat Immunostim Plus, będący mieszaniną ekstraktów korzenia żeńszenia syberyjskiego (*Eleutherococcus senticosus*) i owoców cytryńca chińskiego (*Schizandra chinensis*), które z osobna, od lat z powodzeniem wykorzystywane są w naturalnej medycynie chińskiej, w profilaktyce i leczeniu wielu schorzeń (przewlekłego kaszlu i duszności, biegunki, kołatania serca, bezsenności, chorób nowotworowych i wyniszczających). Immunostim Plus przygotowany był w postaci 300 mg kapsulek, każda z nich zawierała 155 mg *Eleutherococci radix extrac. siccum*, 100 mg *Schizandrae frutus. extract siccum* i 45 mg substancji pomocniczych. U świń oceniano jego wpływ, po 7-dniowej suplementacji diety 1 kapsułką preparatu w trakcie porannego karmienia, na aktywność fagocytarną (potential killing activity - PKA) i zdolność do wewnątrzkomórkowego niszczenia bakterii (respiratory burst activity - RBA) przez granulocyty i monocyty krwi obwodowej oraz aktywność lizozymu w surowicy krwi. W badaniach przeprowadzonych na myszach po 7-dniowym podawaniu *per os* wodnego lub alkoholowego roztworu Immunosim Plus w trzech różnych dawkach 300, 600 lub 1200 µg, co koresponduje z dawkami 150, 300 i 600 mg w przeliczeniu na człowieka o masie ciała 70 kg (biorąc pod uwagę różnicę między myszą i człowiekiem w stosunku powierzchnia ciała do jego masy), określono aktywność fagocytarną (PKA), zdolność do wybuchu tlenowego leukocytów śledzionowych i krwi obwodowej w testach chemiluminescencji

(CL) indukowanej zymosanem i RBA stymulowanej PMA (Phorbol Myristate Acetate), zdolność proliferacyjną limfocytów B i T stymulowanych mitogenami: lipopolisacharyd (LPS), fitohemaglutynina (PHA) lub konkanawalina A (ConA) w teście MTT, zdolność do pobudzenia produkcji przeciwciał anti-SRBC (sheep red blood cells) po uczuleniu myszy 10% zawiesiną erytrocytów owcy, gdzie poziom anti-SRBC oceniano w teście mikrohemaglutynacji, aktywność chemokinetyczną splenocytów w teście spontanicznej migracji metodą Sandberga oraz aktywność limfocytów śledzionowych do produkcji substancji pro-angiogennych (angiogeneza immunologiczna) po lokalnej reakcji Graft-versus-host w teście LIA (lymphocyte-induced angiogenesis). Natomiast u myszy po 3-dniowym podawaniu preparatu w ten sam sposób i w identycznych dawkach, co wcześniej wspomniano, zbadano jego antyangiogenne działanie po wszczepieniu śródskórnym syngenicznych komórek mysiego mięsaka Sarcoma L-1 w teście skórnej angiogenezy TIA (tumor-induced angiogenesis). Z kolei na szczurach intoksykowanych kadmem, który podawano w wodzie do picia przez 50 dni, oceniono właściwości immunokorygujące preparatu Immunostim Plus, który równolegle otrzymywały, również przez 50 dni, w wodzie do picia. W badaniach wykorzystano nowo poznane techniki badawcze z wykorzystaniem cytometrii przepływowej: Phagotest - pozwalający określić odsetek monocytów i granulocytów fagocytujących (pochłonięcie jednej lub więcej bakterii przez komórkę) oraz ich aktywność fagocytarną (średnią intensywność fluorescencji - MFI, która pozwala wnioskować o ekspresji samego procesu – ilości pochłoniętych bakterii znakowanych FITC przez jedną komórkę żerną); Phagoburst – pozwalający określić odsetek monocytów i granulocytów, w których nastąpił wybuch tlenowy (nie będąca barwnikiem fluorescencyjnym dihydrorodamina – 123DHR ulega głównie w mitochondriach utlenieniu w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, powstałego po stymulacji komórki, zarówno silnym aktywatorem wybuchu oddechowego – PMA, słabszym aktywatorem – fMLP, jak i bakteriami *E.coli*, do kationowej rodaminy 123 - R123, która emituje sygnał fluorescencyjny) oraz intensywność tego wybuchu oddechowego w pojedynczych komórkach na podstawie średniej intensywności fluorescencji (MFI).

Badania te wykazały immunomodulujące i immunokorygujące właściwości preparatu Immunostim Plus (wzrost aktywności granulocytów, monocytów, limfocytów i produkcji przeciwciał) oraz silne działanie antyangiogenne, co udokumentowano w 4 pracach oryginalnych i 1 rozdziale w monografii.

Prace oryginalne:

1. Siwicki A.K., Zielonka Ł., Skopińska-Różewska E., Gajęcki M., Małaczewska J., **Wójcik R.**, Trapkowska S.: The influence of Immunostim Plus – a standardized fixe combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus* extracts on blond phagocytes and lysozyme activity in pigs. *Pol J Food Nutr Sci* 2004, 54: 55-57.
2. Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Nartowska J., Małaczewska J., **Wójcik R.**, Sommer E., Trapkowska S., Filewska M., Skurzak H.: Effect of Immunostim Plus – a standardized fixed combination of *Schizandra chinensis* with *Eleutherococcus senticosus* extracts on granulocyte activity and tumour angiogenesis in mice. *Bull Vet Inst Pulawy* 2004, 48: 489-492.
3. Skopińska-Różewska E., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Trapkowska S., Nartowska J., Bałan B. J., Wasiutyński 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.
4. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Jedlińska-Krakowska M., Jakubowski K., Siwicki A.K.: Wpływ preparatu Immunostim-Plus na aktywność fagocytarną i metabolizm tlenowy leukocytów krwi szczurów intoksykowanych kadmem. *Med Weter* 2006, 62: 1179 – 1182.

Autorstwo rozdziału w monografii:

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

Wyżej wspomniana współpraca zaowocowała również badaniami nad roślinami pochodzącymi z ludowej medycyny mongolskiej, rosyjskiej i chińskiej – *Rhodiola quadrifida*, *Rhodiola rosea* (różeniec górski) i *Rhodiola kirilowii* – stosowane, jako adaptogeny, środki wzmacniające, przeciwzapalne, antybakteryjne, antystresowe oraz przeciwdepresyjne. Celem badań była ocena toksycznego działania wodnych lub 50% wodno-alkoholowych ekstraktów *R. rosea*, *R. quadrifida* i *R. kirilowii* w stężeniach 50, 100, 200, 400, 800, 1000 i 1200 µg/ml w trakcie 24-, 48- i 72-godzinnej inkubacji przeprowadzonej w warunkach *in vitro* na hodowlach komórkowych: GMK (monkey's kidney), EPC (fish epithelial cells), KFC (Koi fin cells) oraz hodowli limfocytów i monocytów izolowanych z krwi obwodowej świń i szczurów, gdzie jedynie dawka 1200 µg/ml okazała się toksyczna. W kolejnych badaniach *in vitro* oceniano aktywność metaboliczną (RBA) i fagocytarną (PKA) leukocytów krwi obwodowej pobranych od szczurów i świń, po 2 godzinnej preinkubacji z ekstraktami wodnymi lub 50% wodno-alkoholowymi *R. rosea*, *R. kirilowii* lub *R. quadrifida* w stężeniu 1, 5, 10 µg/ml (szczury) i 1, 5, 10, 20 i 50 µg/ml (świnie). W trakcie oceny aktywności proliferacyjnej (MTT) splenocytów i limfocytów krwi obwodowej, pozyskanych od szczurów i świń, ekstrakty wodne lub 50% wodno-alkoholowe *R. rosea*, *R. kirilowii* lub *R. quadrifida* były obecne w płynach odżywczych wraz z mitogenami (LPS lub ConA) w trakcie całego okresu inkubacji hodowli (72 godziny). U myszy *in vivo* oceniano wpływ tych ekstraktów,



podawanych *per os* przez 7 dni, w dziennych dawkach 50, 100, 200 lub 400 µg na wybrane parametry swoistej i nieswoistej odporności komórkowej (RBA, PKA, LIA). Zarówno wodne (lepszą skuteczność), jak i 50% wodno-alkoholowe ekstrakty *R. rosea*, *R. kirilowii* oraz *R. quadrifida* pobudzały *in vitro* w różnym stopniu aktywność metaboliczną i fagocytarną komórek żernych oraz aktywność proliferacyjną limfocytów, jednak tylko w niskich dawkach, do 10 µg/ml. W dawce 20 µg/ml były nieefektywne, a w wyższych dawkach od 50 µg/ml działały supresyjnie. Również w badaniach *in vivo* na myszach obserwowano stymulację lokalnej reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi (Graft-versus-Host) – angiogenezę indukowaną cytokinami i czynnikami wzrostowymi produkowanymi przez limfocyty myszy rodzicielskich u F1 hybryd myszy – kiedy myszy będące dawcą splenocytów otrzymywały ekstrakty: *R. rosea* – wodne (lepszą skuteczność) lub 50% wodno-alkoholowe w dawce 50 µg/ml. Wyższe dawki były nieefektywne, a dawka 400 µg/ml działała hamująco; *R. quadrifida* – tylko 50% wodno-alkoholowe w dawkach 50-400 µg/ml; *R. kirilowii* – wodne (lepszą skuteczność) lub 50% wodno-alkoholowe w dawce 100, 200 i 400 µg/ml. Efekty tych badań zostały udokumentowane w postaci 6 prac oryginalnych i 1 doniesienia konferencyjnego.

#### Prace oryginalne:

1. Siwicki A. K., Skopińska-Różewska E., Hartwich M., **Wójcik R.**, Bakula T., Furmanowa M., Bałan B. J., Sommer E., Mielcarek S., Buchwald W., Krajewska-Patan A., Mścisz A., Mrozikiewicz P. M., Bany J.: The influence of *Rhodiola rosea* extracts on non-specific and specific cellular immunity in pigs, rats and mice. *Centr Eur J Immunol* 2007, 32: 84-91.
2. Skopińska-Różewska E., **Wójcik R.**, Siwicki A.K., Sommer E., Wasiutyński A., Furmanowa M., Malinowski M., Mazurkiewicz M.: The effect of *Rhodiola quadrifida* extracts on cellular immunity in mice and rats. *Pol J Vet Sci* 2008, 11: 105-111.
3. **Wójcik R.**, Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Mścisz A., Mielcarek S., Furmanowa M., Mrozikiewicz P.M.: The *in vitro* influence of *Rhodiola quadrifida* extracts on non-specific cellular immunity in pigs. *Centr Eur J Immunol* 2008, 33: 193-196.
4. **Wójcik R.**, Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Wasiutyński A., Sommer E., Furmanowa M.: The effect of chinese medicinal herb *Rhodiola kirilowii* extracts on cellular immunity in mice and rats. *Pol J Vet Sci* 2009, 12: 399-405.
5. **Wójcik R.**, Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Buchwald W., Furmanowa M.: The *in vitro* influence of *Rhodiola kirilowii* extracts on blood granulocytes potential killing activity (PKA) in pigs. *Centr Eur J Immunol* 2009, 34: 158-161.
6. **Wójcik R.**, Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Bakula T., Furmanowa M.: The *in vitro* effect of *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola kirilowii* extracts on pigs blood lymphocyte response to mitogen Concanavalin A. *Centr Eur J Immunol* 2009, 34: 166-170.
7. Siwicki A.K., Skopińska-Różewska E., Wasiutyński A., **Wójcik R.**, Zdanowski R., Sommer E., Buchwald W., Furmanowa M., Bakula T., Stankiewicz W.: The effect of *Rhodiola kirilowii* extracts on pigs' blood leukocytes metabolic (RBA) and proliferative (LPS) activity, and on the bacterial infection and blood leukocytes number in mice. *Centr Eur J Immunol* 2012, 37: 145-150.

#### Doniesienia:

1. Skopińska-Różewska E., Siwicki A. K., Wasiutyński A., **Wójcik R.**, Buchwald W., Mielcarek S., Furmanowa M., Hartwich M., Malinowski M., Zdanowski R., Skopiński P., Stankiewicz W.: Rośliny rodzaju *Rhodiola* – adaptogeny, stymulatory odporności, inhibitory angiogenezy nowotworowej. VII

Konferencja Naukowa „Aktualne problemy immunologii doświadczalnej i klinicznej” Olsztyn 24-26.05.2012, 44-45.

Ponadto wraz z Zespołami z Uniwersytetu Medycznego, Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Centrum Onkologii oraz Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie badałem działanie *in vivo* niektórych pochodnych alifatycznych ketonów (2-undekanonu, 3-undekanonu, 4-undekanonu) na angiogenezę mięsaka L-1 i produkcję czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego VEGF (vascular-endothelial growth factor) u myszy Balb/c. W świecie roślinnym rozpowszechnione są szczególnie undekan-2-on i undekan-2-ol, które stanowią składniki olejków eterycznych, pozyskiwane z różnych gatunków ruty. Można je jednak w prosty sposób syntetyzować chemicznie i mają one status identycznych z naturalnymi. Undekan-2-on stosowany jest dość powszechnie w komponowaniu aromatów spożywczych, ale również wykazano jego silne właściwości wirusobójcze (niszczą wirusy opryszczki HSV-1, HIV-1, grypy), jednak brak danych o ich właściwościach immunotropowych. Właściwości te oceniano inhalując myszy przez 3 kolejne dni czystymi związkami (2-4)-undecanonu i ich pochodnymi: prawo i lewoskrętnymi enancjomerami oraz acetalem etylenowym i propylenowym (2-4)-undecanonu w 1% i 10% roztworach. Myszy, które wdychały 10% roztwór undekan-3-on lub 1% roztwór acetalu propylenowego undekan-2-onu przez 3 dni po śródskórnym wszczepieniu komórek nowotworowych, wykazywały niższą zdolność do tworzenia nowych naczyń krwionośnych, mierzoną w skórny teście angiogenezy, wywołanej wzrostem guza (TIA) i mniejszą produkcją czynnika wzrostowego VEGF w guzach nowotworowych, po 5 dniach od wszczepienia tych komórek nowotworowych, niż myszy kontrolne bez inhalacji. Pozostałe substancje wykazywały zróżnicowane, jednak słabe lub brak działania antyangiogenne, wyrażonego brakiem wpływu zarówno na stężenie czynnika wzrostowego VEGF w guzach nowotworowych, jak i na angiogenezę. Badania histologiczne zmian pobranych od grupy myszy wdychających acetal propylenowy undekan-2-onu lub od grupy myszy kontrolnych, nieinhalowanych, ujawniły niewielkie rozproszone obszary martwicy w pierwszej grupie. Ponadto, w obu grupach myszy, zaobserwowano na marginesie guza nieznaczne do umiarkowanych nacieki zapalne oraz w grupie myszy inhalowanych acetalem propylenowym undekan-2-onu mniejszą liczbę drobnych naczyń krwionośnych w porównaniu z grupą kontrolną. Efektem badań była 1 praca oryginalna.

Prace oryginalne:

1. Gibka J., Wasiutyński A., Skopińska-Różewska E., Siwicki A.K., Chorostowska-Wynimko J., Sommer E., Mazurkiewicz M., Gliński M., Skurzak H., **Wójcik R.**: The effect of undecanones and their derivatives on tumor angiogenesis and VEGF content. *Pol J Vet Sci* 2010, 13: 105-115.

Brałem czynny udział wraz z Zespołem Farmakologii UW-M w Olsztynie w ocenie wpływu meloksykamu, należącego do niesterydowych leków przeciwzapalnych, na nieswoiste humoralne i komórkowe mechanizmy obronne u bydła z uwzględnieniem fazy lutealnej i pęcherzykowej cyklu rujowego. Powszechnie znane jest działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe niesterydowych leków przeciwzapalnych, jednak wciąż niewiele wiadomo o ich bezpośrednim i pośrednim wpływie na odporność organizmu. Mechanizm ich działania związany jest z hamowaniem aktywności cyklooksygenaz (COX-1 i COX-2), co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia syntezy prozapalnie działających prostaglandyn, które mogą hamować aktywność czynnika transkrypcyjnego NF-κB. Badany meloksykam jest wybiórczym inhibitorem COX-2 i cechuje się znacznie mniejszą aktywnością w stosunku do COX-1, co może również zaburzać funkcję jajnika. Biorąc pod uwagę fakt, że meloksykam w zależności od fazy cyklu rujowego, w której jest stosowany (lutealna lub pęcherzykowa) zaburza proces owulacji i produkcji progesteronu w jajniku krów, zbadano poziom odporności nieswoistej przed i po 5, 10 i 15 dnia od jednorazowej iniekcji dożylniej meloksykamu jałówkom, będącym w fazie lutealnej lub pęcherzykowej cyklu rujowego. Oznaczano parametry odporności komórkowej (RBA, PKA, MTT z użyciem trzech mitogenów: ConA – konkawaliny, LPS – lipopolisacharów oraz PHA – fitohemaglutyniny), humoralnej (aktywność lizozymu i ceruloplazminy, poziom gammaglobulin) oraz poziom białka całkowitego. Po iniekcji meloksykamu jałówkom będącym w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego stwierdzono spadki poziomu i aktywności badanych parametrów, jedynie w odniesieniu do ceruloplazminy zanotowano wzrost jej aktywności. Natomiast u krów będących w fazie lutealnej zanotowano jedynie spadek poziomu gammaglobulin i podobnie jak u krów będących w fazie pęcherzykowej wzrost aktywności ceruloplazminy. Ta odmienna reaktywność układu immunologicznego w różnych fazach cyklu może być związana ze zmieniającą się ilością hormonów w czasie cyklu i jednoczesnym hamującym działaniem meloksykamu na syntezę cytokin, będących głównymi mediatorami odporności. Wyniki tych badań opublikowano w postaci 2 prac oryginalnych i 1 doniesienia konferencyjnego.

Prace oryginalne:

1. **Wójcik R.**, Markiewicz W., Małaczewska J., Chrostowska M., Maślanka T., Jaroszewski J., Rotkiewicz Z., Siwicki A.K.: Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła. *Med Weter* 2006, 62: 1400-1402.
2. Markiewicz W., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Chrostowska M., Jaroszewski J., Siwicki A.K.: Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła w fazie lutealnej cyklu rujowego. *Med Weter* 2011, 67: 478-482.

Doniesienia:

1. **Wójcik R.**, Markiewicz W., Małaczewska J., Chrostowska M., Trapkowska S., Maślanka T., Jaroszewski J., Rotkiewicz Z., Siwicki A.K.: Influence of meloxam on the cellular and humoral defense mechanisms – *in vivo* study. *Med Weter* 2005, 61 (Supl.): 23.

Celem kolejnych badań przeprowadzonych z Zespołem Katedry Drobiarstwa Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UW-M w Olsztynie było określenie wpływu: żywienia młodych indyków rzeźnych mieszankami pełnoporcjowymi zawierającymi dietetyczny poziom 10% śruty owsianej lub podawania do picia wodnego wyciągu z surowego czosnku, w trakcie 18-tygodniowego odchowu, na parametry wzrostowe ptaków, wartość rzeźną, jakość mięsa oraz wybrane parametry odporności (aktywność lizozymu w surowicy krwi metodą spektrofotometryczną, aktywność fagocytarną leukocytów krwi obwodowej metodą standardową wobec szczepu 209P *Staphylococcus aureus*, aktywność bójąca leukocytów krwi obwodowej określono w teście NBT metodą spontanicznej migracji leukocytów). Owies ze względu na zawartość włókna surowego oraz szczególnie skład chemiczny (korzystny profil aminokwasowy, duża zawartość globulin, tłuszczu surowego, witaminy E, kwasu linolowego, linolenowego, lecytyny, bogaty w składniki mineralne, melatonine) jest jedną z najlepszych pasz dietetycznych, zwłaszcza w dobie odstąpienia od podawania indykom żwirku krzemowego i nadmiernego rozdrobnienia mieszanek paszowych. Czosnek, jak wiadomo, ma bardzo silne właściwości bakterio-, wiruso-, grzybo- i parazytobójcze, a także przeciwutleniające, przeciwzakrzepowe i przeciwzapalne, co przypisywane jest przede wszystkim antybiotycznym substancjom: allicynie, garlicynie i skordyninie oraz lotnym olejkom eterycznym (fitoncydom), których niestety suszony czosnek w znacznej mierze jest pozbawiony. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że włączenie 10% śruty owsianej do mieszanek dla indyków, w porównaniu z grupą kontrolną ptaków, zwiększyło ich przeżywalność (brak padnięć), efektywność produkcyjną (spadek średniego zużycia paszy na 1 kg masy ciała), poprawiło kondycję zdrowotną (wzrost poziomu białka całkowitego i spadek poziomu glukozy i cholesterolu, wzrost aktywności lizozymu, niższy poziom komórek nefagocytujących oraz wyższy procent spontanicznej migracji leukocytów) i nie miało istotnego wpływu na wskaźniki wydajności rzeźnej oraz skład chemiczny i

właściwości fizykochemiczne mięsa. Również podawanie indykom przez 18-tygodni, dwa razy w tygodniu, świeżego zgniecionego czosnku w wodzie do picia w dawce 0,5 g/l wody, wpłynęło korzystnie na ich kondycję zdrowotną (spadek o połowę śmiertelności), efektywność produkcyjną (większa masa ciała i spadek średniego zużycia paszy na 1kg masy ciała), skład chemiczny mięsa (wyższa zawartość białka ogólnego, tłuszczu i popiołu w mięśniach piersiowych), badane parametry odporności nieswoistej (wzrost aktywności lizozymu, komórek fagocytujących i wyższy procent spontanicznej migracji leukocytów) i niektóre wskaźniki morfologiczne (wyższy poziom erytrocytów i hemoglobiny) i biochemiczne (wzrost poziomu glukozy i triglicerydów, spadek poziomu cholesterolu i korzystniejszy stosunek Ca do P), w porównaniu z grupą kontrolną ptaków.

Ponadto, w ramach wspomnianej współpracy, dokonałem oceny wpływu kwasu 3-hydroksy-3-metylomasłowego (HMB), podawanego w paszy na cechy użytkowe gęsi stada rodzicielskiego, a także masę ciała potomstwa oraz wybrane nieswoiste mechanizmy obronne (aktywność ceruloplazminy i lizozymu, poziom gammaglobulin w surowicy oznaczono metodą spektrofotometryczną, wewnątrzkomórkową zdolność zabijania sfagocytowanych drobnoustrojów przez granulocyty obojętnochłonne krwi obwodowej w odczynie NBT oraz zdolność do transformowania limfocytów T do form blastycznych oznaczono testem transformacji blastycznej) u gęsi stada rodzicielskiego przed i 21 i 35 dnia po podaniu HMB oraz ich potomstwa w 12 tygodniu życia (uwzględniają płęć rodziców i potomstwa). HMB fizjologicznie występuje w organizmach ludzi, zwierząt i roślin, stanowiąc endogenny metabolit leucyny, powstający w wyniku jej utleniania w cytoplazmie komórek, głównie wątroby i mięśni. Po przekształceniu w  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metyloglutarylo-koenzym A (HMG-CoA), stanowi źródło szkieletów węglowych w syntezie cholesterolu *de novo* i jest odpowiedzialny za utrzymanie optymalnej funkcji błon komórkowych i komórek organizmu. HMB występuje w niewielkich ilościach w owocach cytrusowych, w niektórych gatunkach ryb, w czerwonym winie, mleku i tkankach ssaków. Jednak ilość HMB powstającego w organizmie oraz dostarczonego z pokarmem jest niewystarczająca i stąd konieczność jego suplementacji z zewnątrz. W doświadczeniu tylko stado rodzicielskie gęsi (w szczycie nieśności) przez miesiąc otrzymywało wraz z mieszanką treściwą preparat HMB w ilości 10 g/kg paszy, dietę gęsiąt pochodzących od tych matek nie suplementowano. Uzyskane wyniki badań immunologicznych wykazały, że dodatek HMB ma istotny wpływ na aktywność metaboliczną fagocytów oraz zdolność proliferacyjną limfocytów T u stada rodzicielskiego, przy czym stwierdzono różnice w aktywności mechanizmów komórkowych w zależności od płci. HMB podany natomiast *per os* znacząco aktywował nieswoiste humoralne mechanizmy

obronne, zarówno u samic, jak i u samców oraz ich potomstwa. Wykazano także pozytywny wpływ HMB na intensywność nieśności, wskaźnik zapłodnienia i wylęgowości piskląt.

Brałem również udział wraz z Zespołem Katedry Hodowli Bydła, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, UW-M w badaniach nad możliwością praktycznego wykorzystania HMB w hodowli cieląt. Zwierzęta otrzymywały wraz z paszą HMB w dawce 40 mg/kg masy ciała przez 60 dni. Przed podaniem i po 15, 30 i 60 dnia podawania HMB pobierano krew od cieląt w celu oceny wybranych parametrów odporności komórkowej i humoralnej (odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych LPS i ConA, aktywności metabolicznej fagocytów (RBA), zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA), aktywności lizozymu i ceruloplazminy oraz poziomu gammaglobulin i białka całkowitego). Po analizie uzyskanych wyników stwierdzono istotny wzrost aktywności metabolicznej fagocytów, odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów, poziomu gammaglobulin oraz aktywności lizozymu cieląt otrzymujących HMB, w porównaniu z grupą kontrolną, przez cały okres eksperymentu. Natomiast wzrost zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania pod wpływem HMB obserwowano jedynie 30 dnia doświadczenia, aktywności ceruloplazminy 15 i 30 dnia badań oraz brak takiego wzrostu w stosunku do białka całkowitego. Efektem tych badań było 5 prac oryginalnych i 2 doniesienia konferencyjne.

#### Prace oryginalne:

1. Majewska T., Mikulski D., Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: Owies w żywieniu młodych indyków rzeźnych. *Med Weter* 2004, 60: 657-661.
2. Majewska T., Mikulski D., Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: Wodny wyciąg z surowego czosnku w żywieniu młodych indyków rzeźnych. *Med Weter* 2007, 63: 1357-1360.
3. Puchajda-Skowrońska H., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Pudyszak K.: Effects of 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) on selected performance indices and non-specific defense mechanisms in geese. *Med Weter* 2006, 62: 89-92.
4. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Siwicki A. K., 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.
5. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Siwicki A. K., 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.

#### Doniesienia:

1. Majewska T., Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**, Pyrek D.: Wyniki produkcyjne i kształtowanie się odporności nieswoistej u indyków rzeźnych żywionych mieszankami z udziałem owsa. *Future Breeding Programmes and Animal Welfare*, AR Kraków, 22-23. 06.1998, 101-102.
2. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Siwicki A.K., Miciński J., Zwierzchowski G.: Wpływ HMB na aktywność fagocytarną i metaboliczną leukocytów krwi cieląt. XIV Kongres PTNW „Nauka Praktyce”, Wrocław 13-15.09.2012, 246.

Uczestniczyłem także w badaniach, przeprowadzonych w ramach Katedry, mających na celu porównanie wpływu naturalnego immunomodulatora biotropiny i syntetycznego lewamizolu (podawane na dobę przed szczepieniem oraz 3 i 5 dnia po szczepieniu szczepem Roakin wirusa rzekomego pomoru drobiu NDV) na wybrane parametry odporności przeciwwirusowej u kurcząt. Na podstawie aktywności fagocytarnej leukocytów, ocenianej metodą mikroskopową, wyrażonej w postaci odsetka komórek fagocytujących i indeksu fagocytarnego; aktywności lizozymu metodą płytkową wobec szczepu *Micrococcus lysodeicticus*; poziomu przeciwciał hemaglutynujących, oznaczanych metodą mikro w odczynie hamowania hemaglutynacji (HI) i przeciwciał seroneutralizujących, oznaczanych metodą mikro w odczynie seroneutralizacji (SN); zdolności do proliferowania limfocytów wobec wirusa ND (oznaczonej jako indeks reaktywności - RI) w teście transformacji blastycznej (TB) oraz zdolności hamowania migracji leukocytów w odczynie LMI (leukocyte migration-inhibition) stwierdzono, że lewamizol cechował się nieco lepszą skutecznością w stosunku do swoistej odporności komórkowej, a biotropina znacznie efektywniej pobudzała swoistą i nieswoistą odporność humoralną.

Laktoferyna to kolejny naturalny immunomodulator, którego skuteczność oceniałem w warunkach *in vitro*. Ta glikoproteina z rodziny transferyn, naturalnie występuje w mleku, narządach, na błonach surowiczych i w ich wydzielinach oraz w drugorzędowych ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych ssaków. Wiadomo, że stymuluje ona dojrzewanie i odpowiedź komórek immunokompetentnych, co wykazano na zwierzętach laboratoryjnych. Jednak w praktyce hodowlanej, skutecznie wykorzystywana jest tylko w hodowli ryb, jako suplement paszowy. W pierwszym eksperymencie oceniono wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów krwi obwodowej kurcząt. W organizmie ptaków obecne są dwa białka z rodziny transferyn (surowicza transferyna i owotransferyna), jednak laktoferyna nie występuje. Ponieważ brak jest danych na temat jej wpływu na aktywność komórek immunokompetentnych, czy funkcjonowanie układu immunologicznego ptaków, podjęto tego typu badania. Po wyizolowaniu limfocytów i granulocytów krwi obwodowej kurcząt poprzez wirowanie w gradiencie gęstości (Gradizol L lub G) komórki hodowano w podłożu RPMI z dodatkiem 0 (kontrola); 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 i 2,0 mg ml<sup>-1</sup> 90% bydlęcej laktoferyny. Granulocyty hodowano w podłożu z dodatkiem preparatu przez 18 godzin, a limfocyty przez 48 godzin. W celu oceny ich aktywności po stymulacji laktoferyną wykonano badanie aktywności metabolicznej fagocytów (RBA), badanie zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez fagocyty (PKA) oraz badanie odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów (MTT) stymulowanych mitogenami ConA i LPS. Laktoferyna nie

stymulowała proliferacji limfocytów B, natomiast stymulowała proliferację limfocytów T, przy czym skuteczne okazały się trzy pośrednie zastosowane stężenia białka: 1; 0,5 i 0,25 mg/ml, a przy dwóch ostatnich dawkach uzyskano najwyższy 50% wzrost indeksu stymulacji limfocytów T. Również wykazano stymulujący wpływ tego białka na aktywność metaboliczną fagocytów, która wzrastała przy wszystkich zastosowanych stężeniach laktoferyny, choć statystycznie istotny wzrost badanego parametru miał miejsce tylko przy dawkach 1 i 0,1 mg/ml. Nie uzyskano natomiast w badaniach własnych stymulacji fagocytów w zakresie ich zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii. W drugim doświadczeniu, przeprowadzonym *in vitro*, analogicznie jak u ptaków, oceniono wpływ laktoferyny bydlęcej na aktywność leukocytów śledzionowych i nerki główowej trzech gatunków ryb słodkowodnych: pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), węgorza europejskiego (*Anguilla Anguilla*) i sumy (*Silurus glanis*). Chociaż ryby, podobnie jak ptaki, pozbawione są laktoferyny i swoistych dla niej receptorów komórkowych, to jak wynika z danych literaturowych, wpływa ona stymulująco na mechanizmy odporności ryb. Uzyskane wyniki badań wykazały korzystny wpływ laktoferyny na wybuch oddechowy fagocytów (RBA) u pstrąga tęczowego i sumy, proliferację limfocytów T u pstrąga tęczowego i węgorza europejskiego, proliferację limfocytów B u pstrąga tęczowego oraz brak takiego efektu w stosunku do aktywności bójczej fagocytów (PKA) przeciw *Aeromonas hydrophila* u wszystkich badanych gatunków ryb. Efektem tych badań były 3 prace oryginalne i 1 doniesienie konferencyjne.

#### Prace oryginalne:

1. Święcicka-Grabowska G., **Wójcik R.**: Immunity against viruses in chickens after applying natural and synthetic immunity stimulator. Pol J Vet Sci 2003, 6: 60-63.
2. Małaczewska J., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów krwi obwodowej kurcząt – badania *in vitro*. Med Weter 2008, 64: 1430-1433.
3. Małaczewska J., Wójcik M., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: 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 R.**, Siwicki A.K.: Wpływ bydlęcej laktoferyny na aktywność leukocytów narządowych pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro*. XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych 18-20.09.2008, Olsztyn, 428.

Przedmiotem kolejnych moich badań były naturalne preparaty (Biolex-Beta HP, Biolex-Beta S, Biolex-MB40 oraz Inter Yeast S) zawierające  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukan lub/oraz mannanooligosacharydy stanowiące składowe ściany komórkowej drożdży *Saccharomyces*



*cerevisiae* i ich oddziaływanie na wybrane parametry układu odpornościowego owiec i szczura oraz cechy użytkowości mięsnej owiec.

W pierwszym doświadczeniu oceniono wpływ preparatu Biolex-Beta HP, zawierającego 85% czystego  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu, podawanego w paszy na cechy użytkowości mięsnej (masę ciała, przyrosty dobowe, tempo wzrostu oraz wymiary przekroju mięśnia najdłuższego grzbietu) oraz nieswoiste humoralne (aktywność lizozymu, poziom gammaglobulin i białka całkowitego) i komórkowe (RBA, PKA, MTT) parametry odporności jagniąt. Badania przeprowadzono na 26 jagniętach ssących owcy kamienieckiej, które podzielono na grupę kontrolną i doświadczalną. Grupa doświadczalna podczas 60-dniowego okresu eksperymentu otrzymywała dodatek Biolex-Beta HP do mieszanki treściwej w ilości 0,5%, a kontrolna mieszankę treściwą bez żadnych dodatków. Bezpośrednio przed podaniem Biolex-Beta HP do paszy oraz w 15, 30 i 60 dniu jego podawania, analizowano cechy użytkowości mięsnej jagniąt, a także pobierano krew z żyły jarzmowej jagniąt w celu oznaczenia wskaźników odporności. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono w grupie doświadczalnej wyższą masę ciała jagniąt (30 i 60 dzień badań,  $p \leq 0,05$ ), wyższe przyrosty dobowe masy ciała (15-60 dzień,  $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ), lepsze tempo wzrostu jagniąt (15-60 dzień,  $p \leq 0,01$ ), lepszy rozwój mięśnia najdłuższego grzbietu (15-60 dzień,  $p \leq 0,01$ ;  $p \leq 0,05$ ), a także wzrost aktywności lizozymu (15-60 dzień,  $p \leq 0,05$ ), poziomu gammaglobulin (15-60 dzień,  $p \leq 0,05$ ), aktywności metabolicznej fagocytów krwi (15-60 dzień,  $p \leq 0,05$ ), wewnątrzkomórkowej aktywności bójczej fagocytów (15-60 dzień,  $p \leq 0,05$ ) oraz aktywności proliferacyjnej limfocytów krwi (15-60 dzień,  $p \leq 0,05$ ), w porównaniu z grupą kontrolną.

W drugim doświadczeniu oceniano efekt 14 dniowej suplementacji diety szczura preparatem Biolex-Beta HP w dawce 12-19 mg/szczura/dzień (w zależności od masy ciała) na wybrane parametry odporności humoralnej i komórkowej. Najśłabszy efekt działania Biolex-Beta HP obserwowano w odniesieniu do poziomu białka całkowitego, gdyż pomimo wyższych jego wartości w grupie szczurów doświadczalnych (suplementowanych) niż kontrolnych (brak suplementacji), nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. W zakresie badanych parametrów nieswoistej odporności humoralnej szczurów: aktywności lizozymu, ceruloplazminy oraz poziomu gammaglobulin w surowicy krwi stwierdzono statystycznie istotny ich wzrost w grupie doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną, jednak najefektywniej wzrosła aktywność lizozymu o 50% ( $p \leq 0.001$ ). Również w zakresie badanych parametrów odporności komórkowej szczurów: aktywności metabolicznej fagocytów (RBA) na podstawie wewnątrzkomórkowego wybuchu tlenowego po stymulacji

PMA, fMLP i *E. coli*, zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania przez komórki fagocytyjące (PKA) oraz zdolności proliferacyjnej limfocytów stymulowanych mitogenami (ConA i LPS) przy pomocy metody MTT w trakcie doświadczenia obserwowano wyższe wartości w grupie doświadczalnej niż w grupie kontrolnej. Najwyraźniej wyraża to aktywność metaboliczna fagocytów krwi, która była niemal dwukrotnie wyższa w grupie doświadczalnej niż w grupie kontrolnej. Statystycznie istotny wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów krwi szczurów odnotowano tylko po stymulacji ConA. Podobnie oceniane za pomocą cytometrii przepływowej: aktywność fagocytarna (PHAGOTEST) granulocytów i monocytów krwi obwodowej szczurów wykazywała statystycznie istotnie wyższą wartość w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, zarówno w stosunku do odsetka komórek fagocytyjących, jak i średniej intensywności fluorescencji oraz wybuch tlenowy (BURSTTEST) granulocytów i monocytów po stymulacji bakteriami *E. coli* i tylko granulocytów po stymulacji PMA (odsetek komórek z wybuchem tlenowym i średnia intensywność fluorescencji).

W kolejnym doświadczeniu zbadano wpływ dodatku suszonych drożdży piwowskich *Saccharomyces cerevisiae* (Inter Yeast S) w diecie maciorek kotnych i karmiących, poczynając od 4 miesiąca ciąży lub od wykotu, na kształtowanie się nieswoistych humoralnych (aktywność lizozymu i ceruloplazminy oraz poziom gammaglobulin i białka całkowitego) i komórkowych (RBA, PKA, MTT) mechanizmów obronnych ich potomstwa, które oceniano 28 dnia po ich urodzeniu. W grupach jagniąt pochodzących od matek karmionych dodatkiem Inter Yeast, zarówno od 4 miesiąca ciąży, jak i od momentu wykotu w porównaniu z jagniętami kontrolnymi pochodzącymi od matek, które karmiono bez żadnych dodatków, zaobserwowano statystycznie istotnie ( $p \leq 0.01$ ) wyższą aktywność lizozymu i ceruloplazminy, poziomu gammaglobulin, aktywność metaboliczną fagocytów (RBA), zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania fagocytów (PKA) oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów (MTT). Ponadto aktywność ceruloplazminy u potomstwa pochodzącego od maciorek karmionych paszą z dodatkiem drożdży od wykotu była wyższa ( $p \leq 0.01$ ), niż u jagniąt pochodzących od matek karmionych paszą z dodatkiem drożdży od 4 miesiąca ciąży. Natomiast zdolność proliferacyjna limfocytów pod wpływem LPS ( $p \leq 0.01$ ) i Con A ( $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.05$ ), była wyższa w grupie jagniąt pochodzących od matek karmionych paszą z dodatkiem drożdży od 4 miesiąca ciąży, niż w grupie potomstwa pochodzącego od maciorek karmionych paszą z dodatkiem drożdży od wykotu.

Oceniono również wpływ preparatu Inter Yeast S, podawanego w dawce 50 g/kg mieszanki treściwej, na wydajność i skład chemiczny mleka (procentową zawartość suchej masy, tłuszczu, białka, laktozy oraz liczbę komórek somatycznych w 1 ml) oraz na wybrane

parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej owiec kotnych i karmiących (suplementacja diety od 3 miesiąca ciąży do 70 dnia laktacji) lub karmiących (suplementacja diety od porodu do 70 dnia laktacji). Badane wskaźniki analizowano 28 i 70 dnia laktacji. Stwierdzono, że dodatek Inter Yeast S spowodował istotny ( $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.05$ ) wzrost wydajności mlecznej (16-20%), brak różnic w składzie chemicznym mleka oraz spadek zawartości komórek somatycznych, wskazujący na lepszy stan zdrowotny gruczołu mlekowego u owiec grup badanych (suplementowanych), w porównaniu z grupą kontrolną (brak suplementacji). Suplementacja diety wpłynęła korzystnie, w grupach badanych, w porównaniu z grupą kontrolną owiec, na wzrost poziomu gammaglobulin (najlepszy efekt w grupie owiec suplementowanych od 3 miesiąca ciąży do 70 dnia laktacji), aktywności lizozymu (najlepszy efekt w grupie owiec suplementowanych od 3 miesiąca ciąży do 70 dnia laktacji) i ceruloplazminy (najlepszy efekt w grupie owiec suplementowanych od porodu do 70 dnia laktacji), a także aktywność metaboliczną komórek fagocytujących (RBA), zdolności fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów T oraz limfocytów B po stymulacji odpowiednio miogenami ConA lub LPS (najlepsze efekty w grupie owiec suplementowanych od 3 miesiąca ciąży do 70 dnia laktacji).

Celem kolejnych badań była ocena wpływu preparatu Biolex-Beta S podawanego matkom przez okres 70-dniowej laktacji w dawce 3 g/kg mieszanki treściwej, na cechy użyteczności mlecznej u maciorek (wydajność i skład chemiczny mleka analizowano 28 i 70 dnia laktacji) i użyteczności mięsnej u potomstwa (masę ciała badano w wieku: 2, 28 i 70 dni; przyrosty dobowe oraz wskaźnik względnego tempa wzrostu w okresach: 2 - 28, 28 - 70 i 2 - 70 dni; wymiary przekroju mięśnia najdłuższego grzbietu i grubości warstwy tłuszczu nad „okiem połędwicy” w wieku: 28 i 70 dni) oraz na nieswoiste humoralne i komórkowe mechanizmy obronne matek (badano w 28 i 70 dniu laktacji). W grupie doświadczalnej owiec (suplementowanej), w porównaniu z grupą kontrolną (brak suplementacji), w trakcie trwania całego eksperymentu, zanotowano wzrost wydajności dziennej mleka, wzrosty zawartości tłuszczu, białka i w konsekwencji suchej masy w mleku oraz spadek ilości komórek somatycznych w mleku. Jagnięta pochodzące od matek otrzymujących dodatek Biolex-Beta S, w porównaniu z jagniętami pochodzącymi z grupy kontrolnej, charakteryzowały się wyższym tempem wzrostu (brak statystycznie istotnych różnic w zakresie przyrostów dobowych i masy ciała), lepszym rozwojem umięśnienia i brakiem różnic w grubości warstwy tłuszczu nad „okiem” połędwicy. Ponadto, w trakcie trwania całego eksperymentu, poziom gammaglobulin, aktywność lizozymu, aktywność metaboliczna komórek fagocytujących (RBA), zdolność fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania (PKA) oraz odpowiedź

proliferacyjna limfocytów kształtowały się na statystycznie istotnie ( $p \leq 0.01$ ) wyższym poziomie w grupie maciorek badanych, niż w grupie kontrolnej.

W następnych badaniach oceniono wpływ 60-dniowej suplementacji diety jagniąt preparatami Biolex-MB40 (ekstrakt z komórek drożdży piwowarskich *Saccharomyces cerevisiae*, zawierający 25-30%  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu i 20-25% MOS) lub Inter Yeast S (suszone drożdże piwowarskie *Saccharomyces cerevisiae*) na cechy użytkowości mięsnej (przyrosty dobowe masy ciała i wskaźniki względnego tempa wzrostu w okresach: 1-30, 31-60 i 1-60 dni doświadczenia oraz wskaźniki umięśnienia i otluszczenia, określone przyżyciowo techniką USG bezpośrednio po zakończeniu badań) oraz wybrane wskaźniki odporności humoralnej jagniąt (aktywność lizozymu i ceruloplazminy oraz poziom białka całkowitego i frakcji gammaglobulin). Zastosowane preparaty spowodowały 30 i 60 dnia doświadczenia istotny ( $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.05$ ) wzrost masy ciała jagniąt grup doświadczalnych, w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi. Efekt ten był rezultatem wyższych przyrostów dobowych masy ciała, co determinowała wartość względnego wskaźnika tempa wzrostu jagniąt. Wyższe tempo wzrostu korespondowało z wynikami pomiarów ultrasonograficznych mięśnia najdłuższego grzbietu, które były istotnie wyższe u jagniąt grup doświadczalnych ( $p \leq 0.05$ ). Jednocześnie, podawane preparaty nie spowodowały wzrostu stopnia otluszczenia jagniąt, gdyż we wszystkich grupach zwierząt nie stwierdzono różnic w grubości warstwy tłuszczu oraz warstwy tłuszczu ze skórą, mierzone nad „okiem” polędwicy. W zakresie badanych wskaźników odporności humoralnej jagniąt, aktywność lizozymu i ceruloplazminy (w trakcie trwania całego doświadczenia) oraz poziom gammaglobulin (Biolex-MB40 - 30 i 60 dnia doświadczenia; Inter Yeast S - 30 dnia doświadczenia) w surowicy krwi, były statystycznie istotnie wyższe ( $p \leq 0.01$ ;  $p \leq 0.05$ ) w grupie doświadczalnej, niż w grupie kontrolnej zwierząt. Jedynie poziom białka całkowitego w surowicy krwi, w trakcie trwania całego doświadczenia, nie wykazywał statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi, a grupami kontrolnymi jagniąt. Efektem tych badań było 9 prac oryginalnych i 5 doniesień konferencyjnych.

#### Prace oryginalne:

1. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A.K.: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na nieswoiste komórkowe mechanizmy obronne jagniąt. *Med Weter* 2007, 63: 84-86.
2. Milewski S., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Trapkowska S., Siwicki A.K.: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na cechy użytkowości mięsnej oraz nieswoiste humoralne mechanizmy obronne jagniąt. *Med Weter* 2007, 63: 360-363.
3. **Wójcik R.**, Milewski S., Małaczewska J., Tański Z., Brzostowski H., Siwicki A.K.: Defence mechanisms of the offspring of ewes fed a diet supplemented with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during pregnancy and lactation. *Centr Eur J Immunol* 2008, 33: 197-201.

4. **Wójcik R.**, Janowska E., Małaczewska J., Siwicki A.K.: The effect of  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009, 53: 241-246.
5. Małaczewska J., **Wójcik R.**, Jung L., Siwicki A.K.: The effect of Biolex Beta-HP on the selected parameters of biochemical, specific and non-specific humoral and cellular immunity in rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2010, 54: 75-80.
6. Milewski S., Sobiech P., Bednarek D., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Zaleska B., Siwicki A.K.: 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.
7. Milewski S., **Wójcik R.**, Zaleska B., Małaczewska J., Tański Z., Siwicki A.K.: 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.
8. Ząbek K., Milewski S., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: Effect of  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan in diet on productivity and humoral and cellular defense mechanisms in sheep. *Acta Vet. Brno.* 82, 141-146, 2013.
9. Ząbek K., Milewski S., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: The effects of supplementing diets fed to pregnant and lactating ewes with *Saccharomyces cerevisiae* dried yeast. *Turk J Vet Anim Sci* 2014, 38: 200-206.

#### Doniesienia:

1. **Wójcik R.**, Milewski S., Małaczewska J., Tański Z., Brzostowski H., Siwicki A.K.: 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 A.K.: Wpływ  $\beta$ -1,3/1,6-D-glukanu na wybrane parametry odporności nieswoistej komórkowej szczurów supresorowanych cyklofosfamidem. *XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych 18-20.09.2008, Olsztyn*, 442-443.
3. **Wójcik R.**, Janowska E., Małaczewska J., Siwicki A.K.: 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 18-20.09.2008, Olsztyn*, 455-456.
4. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Siwicki A.K.: 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, Gdańsk, 16-18.06.2012, Materiały Zjazdowe (USO25)*.
5. **Wójcik R.**, Małaczewska J., Siwicki A.K., Miciński J., Zwierzchowski G.: Immunotropowe oddziaływanie preparatu Biolex Beta-HP u cieląt. *XIV Kongres PTNW „Nauka Praktyce”, Wrocław 13-15.09.2012*, 245.

W ramach projektu badawczego: N N308 578540 „Właściwości immunotropowe kwasu kynureninowego - toksyczność, wchłanianie oraz wpływ na komórkowe i humoralne mechanizmy obronne”, uczestniczyłem w badaniach określających wpływ kwasu kynureninowego (KYNA) na aktywność proliferacyjną limfocytów (test MTT) oraz aktywność komórek fagocytujących (testy RBA i PKA), izolowanych ze śledziony pstrąga tęczowego. Doświadczenie przeprowadzono na 120 sztukach pstrąga (masa ciała około 150 g), losowo podzielonych na 4 grupy: kontrolna (nieotrzymująca kwasu kynureninowego) i trzy doświadczalne, przyjmujące KYNA w paszy w dawkach 2.5, 25 lub 250 mg/kg paszy przez okres 7, 14 lub 28 dni. Najsilniejszy immunotropowy wpływ KYNA obserwowano po najkrótszym okresie jego administracji, gdzie stwierdzono spadek aktywności proliferacyjnej limfocytów T i B w grupie otrzymującej najwyższą dawkę KYNA oraz, niezależnie od dawki, wzrost aktywności komórek fagocytujących. Wraz z wydłużaniem czasu administracji KYNA, efekt jego działania ulegał osłabieniu i po 28 dniach podawania uzyskano jedynie

wzrost aktywności wybuchu tlenowego komórek fagocytujących w grupie otrzymującej najwyższą dawkę oraz zaskakujący wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów T w grupie otrzymującej najniższą dawkę KYNA.

Przeprowadzono również na różnych typach komórek ocenę cytotoksyczności szerokiego zakresu stężeń KYNA (0,0625-10 mM), łącznie ze stężeniami potencjalnie terapeutycznymi. Badaniami objęto dwie ciągłe linie komórkowe – NIH/3T3 (fibroblasty mysie) i GMK (nerka małpy zielonej) oraz pierwotną hodowlę komórek zarodka kurzego (CECC). Komórki hodowli, po 24 godzinnej inkubacji ze wzrastającymi stężeniami kwasu kynureninowego, poddano ocenie żywotności w spektrofotometrycznych testach: redukcji MTT (ocena aktywności mitochondriów), NRU (pochłanianie czerwieni obojętnej - ocena integralności błon lizosomalnych) i LDH (uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej - ocena integralności błon komórkowych). Wysokie stężenia KYNA, w różnym stopniu, istotnie obniżały żywotność wszystkich badanych komórek, w zależności od użytego testu, jednak zawsze w nasileniu proporcjonalnym do stężenia (NIH/3T3 – stężenia 3,75-10 mM, GMK – 2,5-10 mM, CECC – 1,25-10 mM). W żadnym z badanych układów nie stwierdzono niekorzystnego wpływu, na badane komórki, stężeń do 1 mM KYNA. W przypadku pierwotnej hodowli komórek zarodka kurzego wykazano wręcz stymulację ich proliferacji przez KYNA w stężeniach poniżej 1 mM. Uzyskane wyniki wskazują na niską toksyczność kwasu kynureninowego *in vitro*.

Podjęto także badania mające na celu określenie wpływu różnych stężeń KYNA na aktywność fagocytarną splenocytów oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów mysich w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzono na 25 myszach Swiss od których pobierano splenocyty i leukocyty krwi obwodowej, które hodowano w podłożu RPMI w obecności wzrastających stężeń kwasu kynureninowego (6,25  $\mu$ M-10 mM) przez 24 godziny (komórki adherentne) lub 72 godziny (komórki nieadherentne). Aktywność metaboliczną fagocytów oznaczano w testach RBA i PKA oraz aktywność proliferacyjną limfocytów stymulowanych mitogenami (ConA i LPS) w teście MTT. Żadne z użytych stężeń kwasu kynureninowego nie wpływało znacząco na aktywność fagocytarną splenocytów. Natomiast efekt działania KYNA na limfocyty był różny i zależał od wysokości jego stężenia i pochodzenia komórek. Splenocyty wykazywały spadek aktywności proliferacyjnej pod wpływem wysokich stężeń KYNA (limfocyty T: 2,5-10 mM, limfocyty B: 5-10 mM), zaś limfocyty izolowane z krwi – stymulację proliferacji przy niskich stężeniach kwasu (komórki T: 0,5  $\mu$ M, komórki B: 6,25  $\mu$ M-0,25 mM).

Określono również *in vivo* wpływ KYNA, podawanego myszom z wodą do picia (w dawkach 2.5 mg/l, 25 mg/l lub 250 mg/l), przez okres 3, 7, 14 lub 28 dni, na aktywność proliferacyjną limfocytów (test MTT) oraz aktywność fagocytarną i nasilenie wybuchu tlenowego granulocytów i monocytów (Phagotest, Phagoburst). Wykazano, że tylko najniższa dawka KYNA wpływała na wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów T. Wszystkie dawki KYNA istotnie obniżały aktywność wybuchu tlenowego w komórkach fagocytujących, już po krótkim okresie jego administracji, co prawdopodobnie miało związek z właściwościami antyoksydacyjnymi KYNA. Natomiast aktywność fagocytarna była zmienna, w zależności od wysokości dawki i długości czasu administracji KYNA.

Celem kolejnych badań było określenie wpływu różnych stężeń KYNA (12.5  $\mu$ M - 10 mM) na żywotność i aktywność proliferacyjną limfocytów oraz aktywność komórek fagocytujących izolowanych z krwi i śledziony pstrąga tęczowego. Uzyskane wyniki badań wskazują na niską toksyczność KYNA w stosunku do komórek immunokompetentnych, a efekt proliferacyjny obserwowano przy dwóch najniższych testowanych stężeniach KYNA (12.5 i 25  $\mu$ M), co świadczyć może o zdolności pobudzaniu rybiej limfocytów przez zewnątrzpochodny KYNA. Nietoksyczne, mikromolowe stężenia kwasu nie wywierały jednak żadnego wpływu na aktywność proliferacyjną limfocytów i aktywność fagocytów pstrąga tęczowego w warunkach *in vitro*. Być może efekt taki można by zaobserwować przy jeszcze niższych, nanomolowych stężeniach KYNA. Efektem tych badań były 3 prace oryginalne i 7 doniesień konferencyjnych.

#### Prace oryginalne:

1. Małaczewska J., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Kaczorek E., Turski W.A.: Effect of dietary administration of kynurenic acid on the activity of splenocytes of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Centr Eur J Immunol 2013, 38: 475-479.
2. Małaczewska J., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Kaczorek E., Turski W.A.: Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood leukocytes in mice. Centr Eur J Immunol 2014, 39: 6-13.
3. Małaczewska J., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Kaczorek E., Turski W.A.: The *in vitro* effect of kynurenic acid on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocyte and splenocyte activity. Pol J Vet Sci 2014, 17: 453-458.

#### Doniesienia:

1. Małaczewska J., Parada-Turska J., Turski W., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: Ocena immunotoksykologicznego oddziaływania kwasu kynureninowego: badania porównawcze *in vitro*. VII Konferencja Naukowa „Aktualne problemy immunologii doświadczalnej i klinicznej” Olsztyn 24-26.05.2012, 25.
2. Małaczewska J., Turski W., **Wójcik R.**, Siwicki A.K.: Wpływ kwasu kynureninowego na produkcję wybranych cytokin przez splenocyty mysie - badania *in vitro*. VII Konferencja Naukowa „Aktualne problemy immunologii doświadczalnej i klinicznej” Olsztyn 24-26.05.2012, 26.
3. Małaczewska J., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Turski A.: Określenie cytotoxyczności kwasu kynureninowego. XIV Kongres PTNW „Nauka Praktyce”, Wrocław 13-15.09.2012, 97.

4. Małaczewska J., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Turski A.: Wpływ różnych stężeń kwasu kynureninowego na aktywność fagocytarną splenocytów oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów mysich – badania *in vitro*. XIV Kongres PTNW „Nauka Praktyce”, Wrocław 13-15.09.2012, 624.
5. Małaczewska J., Siwicki A.K., Turski A., **Wójcik R.**, Kaczorek E.: Effect of oral administration of kynurenic acid on the activity of the peripheral blood phagocytes in mice. 15th Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26th-28<sup>th</sup> June, Centr Eur J Immunol 2014, 39 (Supl. I): 67.
6. Siwicki A.K., Małaczewska J., Turski A., **Wójcik R.**, Kaczorek E., Adamowski M.: Immunomodulating activity of kynurenic acid on the cytokines production – *in vitro* and *in vivo* study. 15th Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26th-28<sup>th</sup> June, Centr Eur J Immunol 2014, 39 (Supl. I): 67.
7. Kaczorek E., Schulz P., Terech-Majewska E., Małaczewska J., **Wójcik R.**, Szczucińska E., Zembrzaska M., Adamowski M., Siwicki A.K., Turski W.: Kształtowanie się wskaźnika wątrobowego u pstrąga tęczowego (*Onchorhynchus mykiss*) pod wpływem kwasu kynureninowego – KYNA. Konferencja „Nowe kierunki i technologie w akwakulturze”, Olsztyn 08-10.07.2014, 88.

Ponadto uczestniczyłem w badaniach nad właściwościami immunostymulującymi syntetycznego preparatu metizoprinol. W pierwszym doświadczeniu, przeprowadzonym na samcach i samicach szczurów, określono w warunkach *in vitro*, wpływ różnych stężeń metizoprinolu (0; 0,5; 1; 5; 10; 25 i 50 µg/ml) na odpowiedź proliferacyjną limfocytów krwi szczurów stymulowanych ConA lub LPS w teście MTT, aktywność metaboliczną komórek fagocytujących śledziona w teście RBA oraz aktywność bójczą komórek fagocytujących śledziona w teście PKA. Uzyskano statystycznie istotny wzrost aktywności proliferacyjnej limfocytów T i B szczurów przy koncentracji od 5 do 50 µg/ml metizoprinolu ( $p < 0.05$ ), jednak nie zaobserwowano statystycznie znaczących różnic między samcami i samicami, w porównaniu z grupami kontrolnymi zwierząt. Ponadto, w zakresie tych samych koncentracji metizoprinolu (5-50 µg/ml), stwierdzono istotny wzrost aktywności metabolicznej (RBA) i zdolności bójczej (PKA) komórek fagocytujących śledziona szczurów, w porównaniu z grupami kontrolnymi zwierząt. Jednak najwyższe wartości RBA i PKA zanotowano przy koncentracjach metizoprinolu między 10-50 µg/ml, przy braku statystycznie istotnych różnic między grupami samców i samic szczurów.

W drugim doświadczeniu, przeprowadzonym również w warunkach *in vitro*, określono wpływu metizoprinolu na aktywność makrofagów i limfocytów pozyskiwanych z nerki główowej pstrąga tęczowego, po supresji indukowanej przez wirus zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego (IHNV). Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań, stwierdzono, że wirus IHNV, w trakcie inkubacji z pozyskaną od ryb frakcją leukocytarną, statystycznie istotnie ( $p < 0.05$ ) obniżał aktywność wybuchu tlenowego i zdolność wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez makrofagi oraz odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowanych mitogenami ConA i LPS. Ponadto wyniki badań wykazały, że metizoprinol dodany do hodowli komórek wraz z wirusem, w stężeniu 50 mg/ml przywracał, a nawet pobudzał w



porównaniu z kontrolą (leukocyty niepoddane działaniu wirusa, ani metizoprinolu), aktywność metaboliczną i zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania przez makrofagi oraz aktywność proliferacyjną limfocytów, wcześniej obniżoną działaniem supresyjnym wirusa IHN. Efektem tych badań były 2 prace oryginalne i 2 doniesienia konferencyjne.

Prace oryginalne:

1. Siwicki A.K., Jung L., Małaczewska J., **Wójcik R.**: The influence of methisoprinol on the spleen phagocyte and blood lymphocyte activity in rats - *in vitro* study. *Centr Eur J Immunol* 2009, 34: 227-231.
2. Siwicki A.K., Małaczewska J., Kazuń B., **Wójcik R.**: Immunomodulating effect of methisoprinol on the pronephros macrophage and lymphocyte activity after suppression induced by Infectious Haematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet Brno* 2008, 77: 631-635.

Doniesienia:

1. Siwicki A.K., Małaczewska J., **Wójcik R.**, Szweda W., Plat-Samoraj E., Procajło Z.: *In vitro* effect of methisoprinol on proliferative response of blood lymphocytes in pigs. 15th Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26th-28<sup>th</sup> June, *Centr Eur J Immunol* 2014, 39 (Supl. I): 70.
2. Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Pomianowski A., Zarczyńska K.: Influence of methisoprinol on the blood phagocyte activity in dogs – *in vitro* study. 15th Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology, Wrocław 26th-28<sup>th</sup> June, *Centr Eur J Immunol* 2014, 39 (Supl. I): 70.

Wraz z Zespołami z Uniwersytetów w Quebec i Montrealu oraz Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie porównaliśmy wpływ 41 dniowej suplementacji diety dodatkiem paszowym – awilamycyną (antybiotykowy stymulator wzrostu) lub jednym z pięciu probiotycznych szczepów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (*L. salivarius* szczep AWH, *L. acidophilus* szczep BS, *L. helveticus* szczep b9, *Bifidobacterium longum* szczep KNA1 oraz *B. animalis* szczep 30), podawanych w wodzie do picia, na wybrane parametry nieswoistej odporności humoralnej i komórkowej kurcząt eksperymentalnie zakażonych bakteriami *Salmonella enteritidis* szczepem 491 lub niezakażonych. We wszystkich grupach kurcząt z dodatkiem szczepów probiotycznych, zakażonych i niezakażonych, obserwowano wzrost produkcji anionu nadtlenkowego, aktywności proliferacyjnej leukocytów, aktywności lizozym i poziomu gammaglobulin (do 65 %,  $p < 0.01$ ) oraz spadek aktywności ceruloplazminy (do 32 %). Natomiast indukcję swoistych przeciwciał (IgY) przeciwko *S. enteritidis* pobudzał tylko *L. salivarius*, co oceniono metodą ELISA i potwierdzono odczynem aglutynacji ( $p < 0,05$ ). W grupach kurcząt karmionych paszą z dodatkiem awilamycyny, zakażonych i niezakażonych, stwierdzono spadek poziomu wszystkich badanych parametrów odporności (o 30%) oprócz ceruloplazminy, której aktywność wzrosła o 35%. Efektem tych badań była 1 praca oryginalna i 2 doniesienia konferencyjne.

Prace oryginalne:

1. Bielecka M., Smoragiewicz W., Siwicki A.K., **Wójcik R.**, Biedrzycka E., Orłowski A., Kask S., Jankowski J., Karska-Wysocki B., Ham D.: The effect of various probiotic strains or avilamycin feed additive on immune defense markers and acute-phase response to *Salmonella* infection in chickens. *Probiotics Antimicro Prot* 2010, 2: 175-185, DOI: 10.1007/s12602-010-9054-3.

Doniesienia:

1. Siwicki A., Bielecka M., Biedrzycka E., **Wójcik R.**, Małaczewska J., Orłowski A., Smoragiewicz W.: Wpływ wybranych probiotyków na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne i odporność przeciwwzakaźną. *Post Mikrobiol* 2004, 43 (Supl. 1): 487.
2. Siwicki A.K., Bielecka M., **Wójcik R.**, Biedrzycka E., Smoragiewicz W., Orłowski A., Małaczewska J., Kask S.: Effect of selected probiotics on non-specific cellular and humoral defense mechanisms and protection against salmonellosis – experimental study in broiler chicken. Roadshow 3, Guthealth Support, 1 April 2005, Warsaw, Poland.

W ramach badań własnych, pilotażowych, oceniających immunostymulujące działanie  $\beta$ -glukanów u zwierząt będących w stanie immunosupresji, określiłem długość i zakres supresji indukowanej przez cyklofosfamid. Materiał badawczy stanowiły 48 dorosłych szczurów w wieku 14 tygodni, rasy Wistar, w tym 24 samice i 24 samców, które podzielono na dwie grupy: kontrolną i doświadczalną. W ciągu 3 kolejnych dni (1-3), 24 szczurom grupy doświadczalnej podawano domięśniowo cyklofosfamid w dawce 50 mg/kg masy ciała/dobę. Na początku eksperymentu (dzień 0) oraz 8, 15 i 22 dnia badania, po 6 szczurów grupy kontrolnej i doświadczalnej uśmiercano i pobierano od nich krew pełną i heparynizowaną w celu określenia i porównania wybranych parametrów odporności humoralnej i komórkowej (poziom białka całkowitego i gammaglobulin, aktywność ceruloplazminy i lizozymu, aktywność proliferacyjnej limfocytów krwi (MTT) po stymulacji LPS oraz ConA, aktywność metaboliczną (RBA i Phagoburst) oraz bójczą (PKA i Phagotest) komórek fagocytujących. Uzyskane wyniki badań wskazują na silne, statystycznie istotne ( $p \leq 0.001$ ) supresyjne działanie cyklofosfamidu w stosunku do wszystkich badanych parametrów odporności humoralnej i komórkowej szczurów przez cały okres doświadczenia (8-22 dzień badań). Efektem tych badań była 1 praca oryginalna.

Prace oryginalne:

1. **Wójcik R.**, Dąbkowska A.: The effect of cyclophosphamide on the selected parameters of immunity in rats. *Centr Eur J Immunol* 2010, 35: 1-9.

## 6. Podsumowanie dorobku publikacyjnego:

6.1. Prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora:

Rodzaj publikacji	<u>Liczba</u>	Punktacja MNiSW	Impact factor
Oryginalne prace twórcze	6	34	0,415
Artykuły przeglądowe	-	-	-
Short communication	-	-	-
Autorstwo rozdziału w monografii	-	-	-
Doniesienia posterowe na konferencjach	12	-	-
<b>Łącznie</b>	<b><u>18</u></b>	<b><u>34</u></b>	<b><u>0,415</u></b>

6.2. Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, po wyłączeniu 6 oryginalnych prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego:

Rodzaj publikacji	<u>Liczba</u>	Punktacja MNiSW	Impact factor
Oryginalne prace twórcze	45	566	11,728
Artykuły przeglądowe	1	6	-
Short communication	2	40	1,42
Autorstwo rozdziału w monografii	6	23	-
Doniesienia posterowe na konferencjach	40	-	-
<b>Łącznie</b>	<b><u>94</u></b>	<b><u>635</u></b>	<b><u>13,148</u></b>

6.3. Publikacje ogółem (włącznie z stanowiącymi szczególne osiągnięcie naukowe):

Rodzaj publikacji	<u>Liczba</u>	Punktacja MNiSW	Impact factor
Oryginalne prace twórcze	57	715	12,538
Artykuły przeglądowe	1	6	-
Short communication	2	40	1,42
Autorstwo rozdziału w monografii	6	23	-
Doniesienia posterowe na konferencjach	52	-	-
<b>Łącznie</b>	<b><u>118</u></b>	<b><u>784</u></b>	<b><u>16,357</u></b>

**Indeks Hirscha według bazy Web of Science: = 7**

**Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: 196**

**Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: IF = 16,357 (z czego prace stanowiące osiągnięcie naukowe IF= 2,794)**

Wójcik Roman