

Autoreferat

dr n. wet. Tomasz Sylwester Maślanka

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 2014

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Tomasz Sylwester Maślanka

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

2005 Stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych w zakresie farmakologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie; tytuł rozprawy doktorskiej: *„Wpływ enrofloksacyny na tkankę chrzęstną szklistą wybranych stawów oraz tchawicy u kurcząt brojlerów”*,

2000 Tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

15.04.2008 do chwili obecnej Adiunkt, Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,

01.04.2006 – 28.03.2008 Postdoctoral researcher, Department of Veterinary Molecular Biology, Montana State University, Bozeman, MT, USA,

01.12.2001 – 16.12.2005 Doktorant, Katedra Farmakologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

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

4. 1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Wpływ deksametazonu i meloksykamu na wybrane subpopulacje limfocytów T oraz na komórki NK krwi obwodowej bydła”

Cykl ten obejmuje 7 publikacji w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 9,507, a łączna liczba punktów MNiSW to 195.

4. 2. Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

4. 2. 1. **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J. (2012) *In Vitro effects of dexamethasone on bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ cells*. Res. Vet. Sci., 93, 1367-1379 (punktacja MNiSW: 35; IF: 1,774).
4. 2. 2. **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J. (2013) *In Vitro effects of meloxicam on the number, Foxp3 expression, production of selected cytokines and apoptosis of bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ cells*. J. Vet. Sci., 14, 125-134 (punktacja MNiSW: 25; IF: 1,142).
4. 2. 3. **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J. (2013) *Dexamethasone, but not meloxicam, suppresses proliferation of bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ T cells*. Pol. J. Vet. Sci., 16, 219-222 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,712).
4. 2. 4. **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J. (2013) *In vitro studies on the influence of dexamethasone and meloxicam on bovine WC1⁺ γδ T cells*. Vet. Immunol. Immunopathol., 151, 248-262 (punktacja MNiSW: 30; IF: 1,748).
4. 2. 5. **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Jasiecka A., Ziółkowski H., Jędrzkiewicz D. (2013). *Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁻CD8⁺ T cells – in vitro study*. Res. Vet. Sci., 94, 662-674 (punktacja MNiSW: 35; IF: 1,511).
4. 2. 6. **Maślanka T.** (2013) *Dexamethasone inhibits and meloxicam promotes proliferation of bovine NK cells*. Immunopharmacol. Immunotoxicol., 35, 225-234 (punktacja MNiSW: 15; IF: 1,109).
4. 2. 7. **Maślanka T.** (2014) *Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle – In vivo investigations*. Res. Vet. Sci., 96, 338-346 (punktacja MNiSW: 35; IF: 1,511).

Oświadczam, że:

- samodzielnie opracowałem koncepcję badań opisanych w/w publikacjach,
- samodzielnie zaplanowałem doświadczenia oraz dokonałem analizy i interpretacji uzyskanych wyników,
- we wszystkich pracach byłem wyłącznym autorem tekstu i rycin; zgodnie z załączonym oświadczeniem prof. dr hab. Jerzego J. Jaroszewskiego, jego udział w pracach wymienionych przy pozycjach 4.2.1.-4.2.5. był związany z konsultacjami, radami i uwagami krytycznymi,
- samodzielnie wykonałem wszystkie badania przedstawione w w/w pracach za wyjątkiem publikacji znajdującej się przy pozycji 4.2.5.; w tym przypadku wymienieni współautorzy brali udział w wykonywaniu doświadczeń i oznaczeń (zgodnie z załączonymi oświadczeniami).

W związku z powyższym swój udział w powstaniu cyklu w/w prac oceniam na:

- 95% - publikacje wymienione przy pozycjach: 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3. i 4.2.4.
- 75% - publikacja wymieniona przy pozycji 4.2.5.
- 100% - publikacje wymienione przy pozycjach 4.2.6. i 4.2.7.

4. 3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

4. 3. 1. Wprowadzenie

4. 3. 1. 1. Badane leki

Profilaktyka i minimalizowanie natychmiastowych i odległych skutków reakcji zapalnej stanowią ważny element terapii wielu chorób i zaburzeń u ludzi i zwierząt. Wśród leków przeciwzapalnych wyróżnia się dwie grupy: niesteroidowe leki przeciwzapalne [NLPZ; non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)] i steroidowe leki przeciwzapalne [SLPZ; steroid anti-inflammatory drugs (SAIDs)], znane też jako glikokortykosteroidy (GKS), glukokortykoidy, kortykosteroidy lub kortykoidy.

Meloksykam jest NLPZ z grupy oksykamów. Jego punktem uchwytu, tak jak i dla innych NLPZ, jest enzym cyklooksygenaza (COX). Obecnie znamy trzy izoenzymy COX: COX-1, COX-2 i COX-3. COX-1 jest głównie izoformą konstytutywną, która występuje w większości tkanek i odpowiada za produkcję prostanoidów (tj. prostaglandyn, prostacykliny i tromboksanu) pełniących ważne funkcje fizjologiczne (m.in. działanie cytoprotekcyjne względem błony śluzowej przewodu pokarmowego, udział w procesie hemostazy i regulacji przepływu krwi w naczyniach nerek). Z kolei COX-2 jest głównie izoformą indukowaną w czasie reakcji zapalnej (w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, endotoksyny i inne czynniki), czego następstwem jest wzmożona produkcja prostaglandyn, będących mediatorami prozapalnymi, a także odpowiadających za powstawanie gorączki oraz odczuwanie bólu (jako wynik sensytyzacji nocyceptorów). Dlatego też wszystko wskazuje na to, że główny mechanizm odpowiadający za przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe działanie NLPZ polega na blokowaniu syntezy prozapalnych prostaglandyn w wyniku hamowania aktywności COX-2, natomiast wiele z działań niepożądanych tych leków jest skutkiem zmniejszenia produkcji prostanoidów pełniących funkcje fizjologiczne, co z kolei stanowi następstwo upośledzenia aktywności COX-1 (Vane & Botting, 2003). Meloksykam jest względnie selektywnym inhibitorem COX-2, co teoretycznie powinno się przekładać na mniejsze natężenie działań niepożądanych. Należy dodać, że obecnie odchodzi się od bezwzględnego podziału na „dobrą”, czyli fizjologiczną COX-1 i „złą”, czyli prozapalną COX-2, gdyż prawdopodobnie również COX-1 bierze udział w podtrzymywaniu reakcji zapalnej (aktywność COX-1 pod wpływem czynników prozapalnych może wzrastać nawet kilkakrotnie), a z kolei COX-2 okazuje się występować konstytutywnie w niektórych tkankach (np. OUN i nerkach) i odgrywać istotną rolę w pewnych procesach fizjologicznych. Meloksykam jest podstawowym NLPZ do zwalczania bólu, gorączki i zapalenia u bydła, przy czym wskazania rejestracyjne leku to leczenie objawowe: ostrych stanów zapalnych układu oddechowego, biegunki oraz ostrego zapalenia wymienia (Papich, 2011a). W Polsce, jak i wielu krajach Europy, lek jest dostępny w szeregu preparatów zarejestrowanych do stosowania u bydła (*Acticam*, *Emdocam*, *Contacera*, *Inflacam*, *Loxicom*, *Melovem*, *Meloxidyl*, *Metacam*, *Novem*, *Recocam*, *Rheumocam*). Szerokie stosowanie meloksykamu w terapii chorób bydła jest z jednej strony wynikiem jego wysokiej skuteczności i bezpieczeństwa podawania [(które z kolei są następstwem korzystnych właściwości farmakodynamicznych (np. względna selektywność wobec COX-2) i farmakokinetycznych (np. długi okres półtrwania leku → przedłużony czas działania)], zaś z drugiej ma w tym pewien udział fakt, że jest on jednym z nielicznych NLPZ (obok karprofenu,

fluniksyny, ketoprofenu i kwasu tolfenamowego) dostępnych w preparatach zarejestrowanych do stosowania u tego gatunku.

Deksametazon to środek z grupy SLPZ. Główne efekty farmakologiczne tych leków to działanie przeciwzapalne, przeciwalergiczne i immunosupresyjne. Mechanizmy odpowiedzialne za występowanie tych działań są bardzo złożone i wielopłaszczyznowe. Na poziomie genomowym są to oddziaływania zarówno bezpośrednie, jak i pośrednie. Do pierwszych należy m.in. pobudzenie transkrypcji pewnych genów np. dla lipokortyny, IL-10 (IL-10 jest główną cytokiną o działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym) i IκB, czyli inhibitora jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) (Rhen & Cidlowski, 2005). Lipokortyna, poprzez hamowanie aktywności fosfolipazy A₂ zmniejsza odszczepianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błon komórkowych, czego efektem jest hamowanie syntezy takich mediatorów prozapalnych, jak prostaglandyny i leukotrieny, gdyż kwas ten jest substratem do ich produkcji. Jest to podstawowy, lecz co należy podkreślić, niejedyny mechanizm odpowiedzialny za przeciwzapalne właściwości SLPZ. W świetle współczesnego stanu wiedzy główny mechanizm leżący u podstaw immunosupresyjnego i przeciwalergicznego działania SLPZ to mechanizm genomowy pośredni, polegający na unieczynnieniu czynników transkrypcyjnych NF-κB i AP-1 (aktywatorowe białko 1), a więc czynników pełniących wiodącą rolę we wzmacnianiu i podtrzymywaniu procesu zapalnego, m.in. w wyniku aktywacji genów dla wielu cytokin prozapalnych i chemokin oraz genów antyapoptotycznych i regulujących proliferację komórek (Rhen & Cidlowski, 2005). Mechanizm ten jest również elementem złożonej mozaiki oddziaływań składających się na przeciwzapalne działanie glikokortykosteroidów. Deksametazon jest podstawowym SLPZ do stosowania u bydła. W Polsce, jak i w wielu innych krajach, jest to jedyny lek z grupy SLPZ, który jest dostępny w preparatach zarejestrowanych do stosowania u tego gatunku (*Dexacortin*, *Dexafor*, *Dexasone*, *Rapidexon*). Deksametazon odgrywa pierwszoplanową rolę w leczeniu wielu chorób i zaburzeń u bydła o charakterze zapalnym, szczególnie w sytuacji, kiedy odczyn zapalny jest tak silnie wyrażony, że jego hamowanie za pośrednictwem NLPZ nie jest wystarczające. Ponadto jest to kluczowy (lub jedyny w przypadku krajów, w których nie są dostępne inne SLPZ w preparatach zarejestrowanych do stosowania u bydła) lek do terapii zaburzeń o podłożu alergicznym oraz do leczenia i zapobiegania konsekwencjom immunologicznym niektórych chorób (Papich, 2011b). Deksametazon znajduje ponadto zastosowanie w leczeniu ketozy oraz indukcji porodu u bydła (Papich, 2011b).

4. 3. 1. 2. Komórki stanowiące podmiot badań

Chociaż ta kwestia jest tylko szczątkowo poznana u bydła, należy wychodzić z założenia, że u tego gatunku, tak jak u człowieka i myszy, główne populacje limfocytów T, tj. komórki CD4⁺, CD8⁺ (populacje limfocytów Tαβ) i WC1⁺ (cząsteczka WC1 jest markerem limfocytów Tγδ przeżuwaczy), nie stanowią jednorodnych czynnościowo i fenotypowo populacji, lecz składają się z licznych subpopulacji, pełniących odmienne funkcje. Limfocyty T naiwne mają zdolność migracji do narządów docelowych (np. węzłów chłonnych), gdzie aktywowane przez antygen stają się komórkami efektorowymi i/lub pamięci. W tym kontekście wśród limfocytów T pełniących funkcje efektorowe wyróżniamy trzy pule komórek: komórki efektorowe (Teff), komórki efektorowe pamięci (Tem) i centralne komórki pamięci (Tcm) (Broere et al., 2011).

Limfocyty T CD4⁺ pod względem kierunku wpływu na odpowiedź immunologiczną i aktywność układu immunologicznego możemy podzielić na dwie grupy:

- Limfocyty pomocnicze (tj. komórki pełniące funkcje efektorowe), w obrębie których wyróżnia się szereg subpopulacji, spośród których najważniejsze to komórki Th1, Th2 i Th17. Z dużym uproszczeniem można powiedzieć, że limfocyty Th1 produkują głównie IL-2, IFN- γ oraz TNF- β i mają wybitne znaczenie we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego, a więc są zaangażowane przede wszystkim w zwalczanie patogenów wewnątrzkomórkowych. Z kolei komórki Th2 produkując IL-4, -5, -6, 10- i -13 (czynniki wzrostu i różnicowania limfocytów B) wspomagają odpowiedź humoralną, tym samym są zaangażowane w zwalczanie patogenów zewnątrzkomórkowych (Wan & Flavell, 2009). Limfocyty Th17 zostały opisane stosunkowo niedawno (Harrington et al., 2005); wydzielają one IL-17, IL-22 i IL-17F. Mimo że limfocyty te zyskały „sławę” przede wszystkim jako komórki prozapalne, zaangażowane w patogenezę różnych chorób alergicznych i autoimmunologicznych, to należy zauważyć, że pełnią one istotne funkcje fizjologiczne, m.in. stanowiąc ważną linię obrony przed zakażeniami bakteryjnymi (głównie zlokalizowanymi zewnątrzkomórkowo) i grzybiczymi (Marwaha et al., 2012).
- Limfocyty regulatorowe, czyli komórki, które odgrywają fundamentalną rolę w powstawaniu i utrzymywaniu tolerancji immunologicznej oraz biorą udział w wytwarzaniu tolerancji pokarmowej, a ponadto w odpowiedzi przeciwzakaźnej, poszczepiennej i przeciwnowotworowej. Należą tu obecnie najszerzej opisywane i badane limfocyty T o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺, znane też jako Tregs (nazwa ta bywa używana przez niektórych autorów w znaczeniu szerszym, tj. pojęcia, pod którym kryją się wszystkie typy komórek regulatorowych; w niniejszym opracowaniu określenie Tregs odnosi się wyłącznie do komórek o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺), które występują zarówno naturalnie (nTregs), jak i mogą mieć charakter indukowany (iTregs); należą tu ponadto komórki Tr1 (działają głównie za pośrednictwem IL-10, ale również i TGF- β), Th3 (działające za pośrednictwem TGF- β) (Workman et al., 2009) oraz stosunkowo niedawno opisane (Collison et al., 2007) komórki Tr35 (działające za pośrednictwem produkcji IL-35). Trzy pierwsze typy limfocytów scharakteryzowałem w pracy przeglądowej pt. „Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD4⁺” (Maślanka, 2010).

Należy wyjaśnić, że chociaż fenotyp CD25⁺CD4⁺ (bez uwzględnienia koekspresji Foxp3, a więc czynnika, który w świetle dzisiejszego stanu wiedzy determinuje właściwości regulatorowe komórek wykazujących jego ekspresję) jest utożsamiany z Tregs, to w rzeczywistości fenotyp ten nie jest dla nich swoisty, gdyż dzielą go one z aktywowanymi limfocytami CD4⁺. Istnieją trzy rodzaje łańcuchów wchodzących/mogących wchodzić w skład receptora dla IL-2 (IL-2R), tj. łańcuch α (CD25), β (CD122) i γ (CD132). W zależności od ich wzajemnej konfiguracji wyróżniamy: monomeryczny niefunkcjonalny, czyli nieprzewodzący sygnału, receptor o niskim powinowactwie (CD25⁺CD122⁻CD132⁻), dimeryczny funkcjonalny receptor o pośrednim powinowactwie (CD25⁺CD122⁺CD132⁻) i trimeryczny funkcjonalny receptor o wysokim powinowactwie (CD25⁺CD122⁺CD132⁺). Receptor o pośrednim powinowactwie występuje na limfocytach T naiwnych oraz pamięci (Létourneau et al., 2009). Kluczowym etapem aktywacji limfocytów T jest indukcja ekspresji na ich powierzchni cząsteczki CD25, która wraz z konstytutywnie występującymi

cząsteczkami CD122 i CD132 formuje receptor o wysokim powinowactwie do IL-2, a więc umożliwia właściwą czynność limfocytów efektorowych (Liao et al., 2013). W odróżnieniu od aktywowanych limfocytów T, które wykazują tylko przejściową obecność cząsteczki CD25, Tregs człowieka i myszy cechuje jej stała ekspresja, stąd też zwane są „limfocytami T regulatorowymi z konstytutywną ekspresją CD25” (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Limfocyty T CD8⁺ pod względem kierunku wpływu na odpowiedź immunologiczną i aktywność układu immunologicznego możemy podzielić na dwie grupy:

- Limfocyty cytotoksyczne (tj. komórki pełniące funkcje efektorowe), znane jako CTLs, to kluczowy element odporności komórkowej. Podstawowa funkcja tych limfocytów to zwalczanie patogenów wewnątrzkomórkowych (przede wszystkim wirusów) oraz niszczenie komórek nowotworowych. Wykazano, że limfocyty T CD8⁺ odgrywają zasadniczą rolę w zwalczaniu infekcji wirusowych (Taylor et al., 1995) i bakteryjnych (Villarreal-Ramos et al., 2003) oraz pewnych inwazji pasożytniczych (McKeever et al., 1994) u bydła.
- Limfocyty regulatorowe wśród których wyróżnia się komórki występujące naturalnie (tj. limfocyty o fenotypie CD8⁺CD122⁺, CD8⁺CD28⁻, CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ i jelitowe CD8⁺αα⁺) oraz komórki indukowane (tj. limfocyty o fenotypie CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD28⁻, CD8⁺CD75s⁺, CD8⁺CD11c⁺ i CD8⁺αα⁺). To przyporządkowanie należy traktować raczej jako zestawienie współczesnej wiedzy o fenotypach komórek regulatorowych z populacji komórek CD8⁺, niż jako ich ścisłą klasyfikację, gdyż przy obecnym stanie wiedzy nie można wykluczyć, że niektóre z tych grup komórek nie stanowią odrębnych populacji, lecz że pokrywają się ze sobą. Najlepiej poznane limfocyty regulatorowe T CD8⁺ scharakteryzowałem w pracy przeglądowej pt. „Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD8⁺” (Maślanka, 2011).

Do chwili obecnej nie ustalono, czy u bydła znajdują się odpowiedniki ludzkich i/lub mysich komórek regulatorowych Tr1, Tr35, Th3, CD122⁺CD8⁺, CD28⁻CD8⁺, CD8⁺CD75s⁺, CD8⁺CD11c⁺ i CD8⁺αα⁺. Bez wątpienia w obrębie limfocytów T bydła znajdują się nie tylko komórki efektorowe, lecz również regulatorowe, jakkolwiek zagadnienie to jest tylko szczątkowo poznane. Wyniki badań Seo et al. (2007) wskazują, że wśród bydlęcych limfocytów T CD8⁺ i CD4⁺ znajdują się komórki o właściwościach regulatorowych, ale ich charakterystyka fenotypowa i czynnościowa nie jest zbadana. W badaniach własnych (Maślanka & Jaroszewski, 2012) wykazano obecność limfocytów T CD4⁺ u bydła, które produkują IL-10 oraz TGF-β, ale jest to niewystarczające, aby utożsamiać te limfocyty, odpowiednio, z komórkami Tr1 i Th3. Dowiedziono również (Maślanka & Jaroszewski, 2012; Maślanka, 2014) istnienia u bydła naturalnie występujących limfocytów T CD25^{high}CD4⁺ i CD25^{low}CD4⁺ wykazujących ekspresję czynnika Foxp3, ale jego obecność dotyczy zaledwie kilku procent komórek o takim fenotypie, podczas gdy u człowieka i myszy wartości te są nieporównywalnie wyższe; np. w badaniach Chen et al. (2008) wykazano, że średni odsetek komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T CD25^{high}CD4⁺ i CD25^{high}CD4⁺ krwi obwodowej człowieka wynosił odpowiednio 95,34% i 38,01%. Tak więc wyniki własne (Maślanka & Jaroszewski, 2012; Maślanka, 2014), a także i innych badaczy (Seo et., 2009), wskazują, że w zakresie ekspresji Foxp3 (a więc pod względem liczebności limfocytów Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺ i Foxp3⁺CD25^{low}CD4⁺) bydlęce komórki CD25^{high}CD4⁺ i CD25^{low}CD4⁺ nie stanowią odpowiedników naturalnie występujących ludzkich i

mysich komórek o takim fenotypie. Hoek et al. (2009) w ogóle negują posiadanie właściwości regulatorowych przez limfocyty T $CD25^{high}CD4^{+}$ i $CD25^{low}CD4^{+}$ bydlą, gdyż w badaniach czynnościowych nie stwierdzili ich supresorowego wpływu względem odpowiednich komórek docelowych. Jak dotychczas nie zostało to zweryfikowane przez innych badaczy. W badaniach własnych wykazano, że we krwi obwodowej bydlą naturalnie występują limfocyty T $CD8^{+}$ o fenotypie regulatorowym, tj. $Foxp3^{+}CD25^{high}CD8^{+}$ i $Foxp3^{+}CD25^{low}CD8^{+}$ (Maślanka & Jaroszewski, 2013b). Zakładając, jak to jest obecnie przyjęte, że obecność czynnika Foxp3 w komórce nadaje jej właściwości regulatorowe oraz jest ograniczona do komórek o takiej funkcji, uzyskane wyniki sugerują istnienie u bydlą naturalnie występujących komórek regulatorowych o w/w fenotypie, jakkolwiek potwierdzenie tego wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań czynnościowych.

We wzmiankowanych wyżej badaniach prowadzonych przez Hoek et al. (2009) stwierdzono, że limfocyty $T\gamma\delta$ $WC1^{+}$ pełnią funkcję regulatorową u bydlą. Jednakże z uwagi na to, że komórki o tym fenotypie stanowią dużą populację limfocytów o udowodnionej funkcji efektorowej, nie można utożsamiać limfocytów $T\gamma\delta$ $WC1^{+}$ z komórkami regulatorowymi, lecz należy przyjąć, że w obrębie tej populacji znajduje się jakaś subpopulacja komórek wykazujących działanie regulatorowe. Częścinka $WC1$ jest głównym markerem bydlęcych limfocytów $T\gamma\delta$, choć istnieje również pewna pula tych komórek, która nie wykazuje jej ekspresji. Pod względem fenotypowym limfocyty $T\gamma\delta$ $WC1^{+}$ (dalej nazywane limfocytami T $WC1^{+}$) można określić jako komórki $CD2^{-}CD4^{-}CD6^{-}CD8^{-}$. U przeżuwaczy limfocyty te występują znacznie liczniej niż u człowieka i myszy (ok. 2-7% komórek jednojądrzastych krwi obwodowej, dalej zwanych PBMCs) (Bucy et al., 1989; Itohara et al., 1989), gdyż u dorosłego bydlą stanowią ok. 10-15%, a u cieląt nawet do 40% PBMCs (Wilson et al., 1986; Wyatt et al., 1994). Komórki T $WC1^{+}$ bydlą cechują się zarówno aktywnością regulatorową, jak i efektorową, jakkolwiek nie zostało poznane, czy wykazują one tak dużą plastyczność, że obie te aktywności koegzystują w jednej komórce, czy też w ich obrębie występują odrębne subpopulacje komórek efektorowych i regulatorowych.

Efektorowe „oblicze” bydlęcych limfocytów $WC1^{+}$:

- Zasadniczo bydlące limfocyty T $WC1^{+}$ uznawane są za komórki efektorowe cytotoksyczne oraz komórki pamięci immunologicznej (Guzman et al., 2012). Wiele badań wskazuje, że limfocyty T $WC1^{+}$ stanowią frakcję komórek efektorowych o właściwościach cytotoksycznych i NK podobnych i biorą udział w zwalczaniu infekcji wirusowych, bakteryjnych, wywołanych prątkami oraz inwazji pierwotniaczych (Brown et al., 1994; Amadori et al., 1995; Pollock & Welsh, 2002; Guzman et al., 2012).
- Istnieją dane sugerujące, że komórki te mogą prezentować antygen limfocytom T $CD4^{+}$ (Collins et al., 1998).
- Wiele badań wskazuje, że limfocyty T $WC1^{+}$ są ważnym źródłem wielu cytokin prozapalnych ($TNF-\alpha$, IL-12 i $IFN-\gamma$), ze szczególnym uwzględnieniem $IFN-\gamma$ (Brown et al., 1994; Collins et al., 1996; Fikri et al., 2001).

Regulatorowe „oblicze” bydlęcych limfocytów $WC1^{+}$:

- Hoek et al. (2009) stwierdzili, że u bydlą to limfocyty $WC1^{+}$, a nie $CD25^{+}CD4^{+}$, wykazują działanie supresorowe.

- Wykazano, że limfocyty T WC1⁺ syntetyzują mRNA dla dwóch głównych cytokin o działaniu supresorowym/regulatorowym: TGF-β (konstytutywnie) i IL-10 (Rogers et al., 2005).
- W badaniach własnych (Maślanka et al., 2012) stwierdzono, że w odpowiedzi na mitogen limfocyty T WC1⁺ produkowały IL-10 i TGF-β; wykazano ponadto, że pod względem produkcji IFN-γ, IL-10 i TGF-β, limfocyty o fenotypie CD25⁺WC1⁺ okazują się mieć bardziej supresorowy profil niż komórki z subpopulacji CD25⁻WC1⁺.

Oprócz roli fizjologicznej, limfocyty T są zaangażowane w powstawanie różnych zaburzeń immunologicznych. Z dużym uproszczeniem można powiedzieć, że limfocyty Th1 biorą udział przede wszystkim w patogenezie narządowo swoistych chorób autoimmunizacyjnych, podczas gdy limfocyty Th2 są zaangażowane w patogenzę chorób alergicznych i układowych chorób autoimmunizacyjnych (Kidd, 2003). Limfocyty z populacji komórek CD8⁺ najprawdopodobniej również partycypują w inicjacji, progresji i regulacji wielu zaburzeń autoimmunologicznych. Wykazano, że komórki te są zaangażowane w powstawanie wielu zwierzęcych modeli chorób autoimmunizacyjnych (np. modele cukrzycy typu I i chorób demielinizacyjnych ośrodkowego układu nerwowego) (Tsai et al., 2008). Limfocyty Tγδ także mogą uczestniczyć w patomechanizmie wielu chorób autoimmunologicznych (Schirmer et al., 2013).

Komórki NK reprezentują przede wszystkim komórki o charakterze efektorowym, które są zaangażowane w mechanizmy odporności wrodzonej. Tworzą one pierwszą linię obrony przed patogenami wewnątrzkomórkowymi (głównie wirusami) i własnymi zmienionymi nowotworowo komórkami (Lanier, 2005). Ich główne funkcje to:

- spontaniczne, tj. zachodzące bez uprzedniego uczulenia, rozpoznawanie i zabijanie komórek nowotworowych (Wu & Lanier, 2003) oraz zakażonych wirusem (French & Yokoyama, 2003),
- regulacja wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej poprzez wydzielanie wielu ważnych chemokin (Inngjerdengen et al., 2010) i cytokin (Cooper et al., 2001).

4. 3. 2. Uzasadnienie podjętych badań oraz cele badawcze

Fakt, że deksametazon oraz inne SLPZ wywierają działanie immunosupresyjne jest doskonale znany i niepodważalny, ale wiedza na temat mechanizmów i zjawisk immunologicznych odpowiadających za występowanie tego oddziaływania u bydła jest bardzo skromna i stosunkowo powierzchowna, szczególnie w odniesieniu do limfocytów T i komórek NK. Przed podjęciem badań opisywanych w niniejszym opracowaniu, wpływ SLPZ na limfocyty T był w ogóle bardzo słabo poznany i ograniczał się głównie do oceny oddziaływania deksametazonu na odsetek limfocytów T CD3⁺ (Burton & Kehrli, 1996), CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ (Oldham & Howard, 1992; Burton & Kehrli, 1996; Anderson et al., 1999; Menge & Dean-Nystrom, 2008); należy wspomnieć, że w zakresie wpływu deksametazonu na odsetek komórek z w/w populacji istnieją niezgodności między wynikami uzyskiwanymi przez poszczególne grupy badawcze. Przede wszystkim brakowało wiarygodnych danych na temat wpływu deksametazonu na liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺. Nie można opierać oceny wpływu leku na faktyczną liczebność komórek tylko w oparciu o cytometryczną ocenę odsetkową, gdyż zmiana w zakresie liczebności bezwzględnej nawet jednej z głównych populacji limfocytów składających się na całkowitą populację limfocytów (np. CD4⁺), prowadzi do zmiany/zakłócenia wzajemnego stosunku odsetkowego tych populacji (zmiany o

charakterze względnym, tj. pozorne wzrosty i spadki liczebności). Tak więc zmiany w zakresie odsetka limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ oraz limfocytów B i komórek NK mówią wyłącznie o przesunięciach we wzajemnym stosunku odsetkowym, natomiast wyciąganie na ich podstawie wniosku na temat zmian w zakresie liczebności faktycznej (tj. bezwzględnej), co nieraz ma miejsce, jest nie tylko nieuzasadnione, ale z założenia błędne. Dane na temat wpływu SLPZ na apoptozę limfocytów T była ograniczają się do jednej pracy (Burton & Kehrli, 1996), w której przedstawiono wyniki wskazujące, że deksametazon nie wpływa na apoptozę limfocytów T CD4⁺ i WC1⁺ oraz działa antyapoptotycznie względem komórek T CD8⁺. W świetle dobrze poznanych proapoptotycznych właściwości SLPZ względem ludzkich limfocytów T, wyniki te nie mogą nie nasuwać wątpliwości i w moim odczuciu definitywnie wymagały weryfikacji. W dostępnym piśmiennictwie brakowało także danych na temat wpływu SLPZ na proliferację poszczególnych populacji limfocytów T była, a także na produkcję przez nie jakichkolwiek cytokin. Opierając się na dostępnej literaturze można stwierdzić, że przed podjęciem niniejszych badań, cała wiedza dotycząca wpływu SLPZ na komórki NK była sprowadzała się do informacji, że zastosowanie deksametazonu u tego gatunku nie wpływało na ich aktywność (Anderson et al., 1999).

Z jednej strony immunosupresyjne działanie deksametazonu i innych SLPZ jest pożądanym efektem farmakologicznym, gdyż działanie to warunkuje ich skuteczność w terapii chorób i zaburzeń o charakterze alergicznym i autoimmunizacyjnym. Z drugiej jednak strony, immunosupresyjne działanie SLPZ stanowi poważny efekt uboczny, który znacząco ogranicza ich zastosowanie kliniczne. W związku z tym deksametazon, jak i inne SLPZ, są zasadniczo przeciwwskazane do stosowania u pacjentów cierpiących na zakażenia wirusowe, grzybicze, atypowe i większość bakteryjnych. Obecnie NLPZ stanowią alternatywę (co prawda względną, ale obecnie jedyną w lecznictwie weterynaryjnym) względem SLPZ w chorobach i sytuacjach klinicznych, które wymagają hamowania towarzyszącej im reakcji zapalnej, a które:

- stanowią przeciwwskazanie bezwzględne do stosowania SLPZ,
- dotyczą pacjentów, u których istnieje inne przeciwwskazanie bezwzględne do stosowania SLPZ.

U była to meloksykam stanowi bardzo często taką właśnie alternatywę. Uważa się, że lek ten nie wywiera działania immunosupresyjnego. Taka opinia stanowiła w znacznej mierze domniemanie, gdyż kwestia jego wpływu na układ immunologiczny była była szczątkowo poznana. Przegląd literatury wykazał, że stan wiedzy na temat wpływu meloksykamu na limfocyty odpowiedzialne za odpowiedź immunologiczną typu komórkowego sprowadzał się do dwóch doniesień, w których oceniano efekt pojedynczej dawki leku na odsetek (Bednarek et al., 2003; Maślanka et al., 2010) i apoptozę (Maślanka et al., 2010) limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ T cieląt.

Konfrontując duże znaczenie deksametazonu i meloksykamu w terapii chorób była ze słabo poznany wpływem tych leków na limfocyty odpowiedzialne za odpowiedź immunologiczną typu komórkowego u tego gatunku, za godne poznania i użyteczne uznano przeprowadzenie kompleksowych badań nad wpływem obu leków na komórki NK oraz limfocyty T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ była.

W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia wskazujące, że SLPZ (Karagiannidis et al., 2004; Braitch et al., 2009; Provoost et al., 2009, Xie et al., 2009) mogą wpływać na odsetek komórek

T CD25⁺CD4⁺ i/lub ekspresję Foxp3 w ich obrębie, a także na produkcję przez nie niektórych cytokin. Wykazano, że deksametazon oraz inne glikokortykosteroidy indukują ekspresję Foxp3 (Karagiannidis et al., 2004; Braitch et al., 2009; Provoost et al., 2009) i zwiększają liczbę ludzkich (Karagiannidis et al., 2004; Provoost et al., 2009) i mysich (Xie et al., 2009) komórek regulatorowych Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺. Wyniki tych badań mocno sugerowały, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za przeciwzapalne i immunosupresyjne działanie SLPZ może być generowanie komórek o takim fenotypie, czyli iTregs. NLPZ również mogą wpływać na ekspresję Foxp3, choć dane na temat kierunku tego oddziaływania są ze sobą sprzeczne (Mahic et al., 2006; Atarashi et al., 2008; Lönnroth et al., 2008; Yaqub et al., 2008; Javeed et al., 2009). Ponadto stwierdzono, że PGE₂, a więc cel terapeutyczny NLPZ, reguluje w dół ekspresję cząsteczki CD25 na ludzkich, zarówno aktywowanych (Anastassiou et al., 1992; Baratelli et al., 2005), jak i regulatorowych (Tregs) limfocytach T (Baratelli et al., 2005). Należy wyjaśnić, że w badaniach pilotażowych nad limfocytami T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ krwi obwodowej bydła stwierdziłem, że pewien odsetek tych komórek wykazuje konstytutywną ekspresję CD25, przy czym w ich obrębie można wyróżnić subpopulacje o wysokiej (CD25^{high}) oraz niskiej (CD25^{low}) ekspresji tej cząsteczki. Biorąc wszystkie powyższe pod uwagę postanowiłem sprawdzić, czy deksametazon i meloksykam wpływają na liczebność (względną i bezwzględną) limfocytów T o fenotypie regulatorowym (tj. Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{low}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{high}CD8⁺ i Foxp3⁺CD25^{low}CD8⁺) oraz na liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺, które wykazują wysoką (CD25^{high}) i niską (CD25^{low}) ekspresję CD25 oraz które są pozbawione ekspresji tej cząsteczki. W związku z tym, że w toku badań stwierdziłem, że kierunek wpływu deksametazonu (i w pewnym stopniu również meloksykamu) na liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ był selektywny, tj. pozostawał w związku z obecnością i intensywności ekspresji CD25, za celowe uznałem, aby ocena wpływu leków na badane komórki w zakresie ich apoptozy, proliferacji i produkcji cytokin odbywała się w tym kontekście, czyli w odniesieniu do subpopulacji CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻. Konfrontacja danych na temat wpływu deksametazonu i meloksykamu na liczebność komórek z tych subpopulacji z wynikami dotyczącymi ich apoptozy i proliferacji umożliwiają w sposób pośredni ustalenie tego, czy badane leki wpływają na ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T bydła.

Za warte poznania uznałem określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na produkcję IL-10, TGF-β (a więc dwóch głównych cytokin przeciwzapalnych i immunosupresyjnych) oraz IFN-γ (a więc głównej cytokiny prozapalnej oraz stymulującej odpowiedź immunologiczną poprzez wpływ na różne komórki immunokompetentne) przez poszczególne populacje limfocytów T przede wszystkim z uwagi na to, że podejrzewałem/brałem pod uwagę, iż:

- wzrost produkcji IL-10 i TGF-β może być jednym z elementów składających się na przeciwzapalne i immunosupresyjne działanie deksametazonu. Wykazano bowiem, że lek ten zwiększał odsetek komórek produkujących IL-10 wśród ludzkich limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (Richards et al., 2000) oraz mysich limfocytów T CD8⁺ (Noble et al., 2006); dostępne są także wyniki badań, w których nie potwierdzono takiego oddziaływania leku.
- hamowanie produkcji IFN-γ może być jednym z elementów składających się na przeciwzapalne i immunosupresyjne działanie deksametazonu. Stwierdzono bowiem, że lek ten zmniejszał

produkcję IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺ szczura (Ramirez, 1998) oraz redukował odsetek komórek IFN- γ ⁺ wśród limfocytów T CD8⁺ człowieka (Okosieme et al., 2006).

- meloksykam mimo swoich przeciwzapalnych właściwości, może (teoretycznie) działać stymulująco na produkcję IFN- γ , a hamująco na syntezę IL-10 i TGF- β . Wykazano bowiem, że PGE₂ (a więc eikozanoid, którego wytwarzanie jest hamowane przez meloksykam) redukowała produkcję IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺ człowieka (Katamura et al., 1995), a z kolei hamowanie aktywności COX-2 prowadziło do wzmocnienia wydzielania tej cytokiny przez mysie splenocyty (Sharma et al., 2005). Dostępne są dane wskazujące, że PGE₂ produkowana z udziałem COX-2 może być zaangażowana w regulację w górę produkcji IL-10 (Harizi et al., 2002) oraz TGF- β (Chávez et al., 2010).

Badania nad wpływem meloksykamu i deksametazonu na komórki NK i limfocyty T bydła były wykonywane równocześnie, z zastosowaniem oceny tych samych parametrów oraz tego samego materiału biologicznego. Dzięki temu przeprowadzone badania nie tylko znacząco uzupełniają współczesny stan wiedzy na temat wpływu obu leków na układ immunologiczny bydła, ale ich cennym aspektem jest możliwość bezpośredniego porównania wpływu steroidowego i niesteroidowego leku przeciwzapalnego w zakresie ocenianych parametrów. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki posiadają wartość kliniczną, gdyż w doświadczeniach *in vivo* użyto deksametazon i meloksykam w preparatach zarejestrowanych dla bydła, a zastosowane dawkowanie odpowiadało zaleceniom producentów tych preparatów. Wreszcie inną wartością prowadzonych badań, była możliwość zweryfikowania w warunkach *in vivo* wyników uzyskanych w warunkach *in vitro*, a tym samym dostarczenie nowych danych na temat wiarygodności metod *in vitro* w badaniach immunologicznych nad SLPZ i NLPZ.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe, postawiono następujące cele badawcze:

1. Określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na liczebność względną i bezwzględną komórek NK oraz całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ bydła (badania *in vitro* oraz *in vivo*).
2. Określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na liczebność względną i bezwzględną (badania *in vitro* oraz *in vivo*):
 - a) limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻,
 - b) subpopulacji limfocytów T o fenotypach regulatorowych, tj. Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{low}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{high}CD8⁺ i Foxp3⁺CD25^{low}CD8⁺.
3. Określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na apoptozę (badania *in vitro*):
 - a) limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻,
 - b) komórek NK.
4. Określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na proliferację (badania *in vitro*):
 - a) limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻,
 - b) komórek NK.
5. Określenie wpływu deksametazonu i meloksykamu na produkcję IFN- γ , IL-10 i TGF- β przez (badania *in vitro*):
 - a) limfocyty T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻,
 - b) komórki NK (z wyłączeniem TGF- β).

4. 3. 3. Podsumowanie uzyskanych wyników*

Badania *in vivo*

1. Wpływ deksametazonu i meloksykamu na liczebność całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ oraz komórek NK

a) Deksametazon

- **Limfocyty T:**

- W 1 i 3 dniu po podaniu deksametazonu dochodziło do wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺, ale nie było to wynikiem wzrostu liczby bezwzględnej tych komórek, gdyż wartość tego parametru 24 godz. po podaniu leku była zredukowana, natomiast w kolejnych punktach czasowych nie różniła się istotnie od wartości kontrolnych.
- W 1 dniu po podaniu deksametazonu dochodziło do redukcji liczby względnej i bezwzględnej limfocytów T CD8⁺. Ubytek tych komórek utrzymywał się w kolejnych punktach czasowych, ale nie znalazło to odzwierciedlenia w wartościach względnych, gdyż odsetek limfocytów T CD8⁺ na dzień 3 po podaniu leku był podwyższony, natomiast w ostatnim punkcie czasowym nie różnił się od wartości kontrolnych.
- U zwierząt otrzymujących deksametazon stwierdzano w każdym punkcie czasowym redukcję liczby bezwzględnej limfocytów T WC1⁺, a zmiana ta była skorelowana ze znaczącym zmniejszeniem odsetka tych komórek.

- **Komórki NK:** W 3 i 7 dniu po podaniu deksametazonu dochodziło do redukcji liczby bezwzględnej komórek NK, choć efekt ten nie znalazł odzwierciedlenia w wartościach odsetkowych; średni ubytek komórek stanowił odpowiednio 32,96% i 26,90% adekwatnych wartości kontrolnych.

b) Meloksykam

- **Limfocyty T:** Stosowanie meloksykamu nie wpływało na odsetek i liczbę bezwzględną całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺.
- **Komórki NK:** Podawanie meloksykamu zwiększało odsetek i liczbę bezwzględną komórek NK, przy czym powstanie tego efektu wymagało czasu, gdyż wystąpił on dopiero w ostatnim punkcie czasowym.

2. Wpływ deksametazonu i meloksykamu na liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻ oraz na odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T o fenotypach regulatorowych (tj. Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{low}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{high}CD8⁺ i Foxp3⁺CD25^{low}CD8⁺)

a) Deksametazon

- **Liczebność limfocytów T o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻:**

- Już 24 godz. po podaniu leku dochodziło do wzrostu odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{high}CD4⁺, a zmiana ta miała charakter długotrwały, gdyż występowała również w 3 i 7 dniu po zastosowaniu leku. Deksametazon wywoływał szybki, lecz krótkotrwały, tj. występujący tylko w pierwszym dniu po podaniu leku, wzrost odsetka limfocytów T CD25^{low}CD4⁺ i redukcję liczby bezwzględnej limfocytów T o fenotypie CD25⁻CD4⁺ (średni ubytek tych komórek stanowił 39,46%

wartości kontrolnych); wzrost odsetka limfocytów z subpopulacji $CD25^{low}CD4^{+}$ nie był spowodowany wzrostem liczby bezwzględnej komórek o tym fenotypie, a więc miał charakter względny.

- W 1 i 3 dniu po podaniu deksametazonu dochodziło do wzrostu odsetka limfocytów T $CD25^{high}CD8^{+}$, ale tylko w drugim przypadku towarzyszyło temu zwiększenie liczby bezwzględnej tych komórek. Stosowanie leku indukowało również wzrost odsetka komórek o fenotypie $CD25^{low}CD8^{+}$ (dzień 1 i 3 eksperymentu), ale efekt ten nie był wynikiem wzrostu liczby bezwzględnej komórek z tej subpopulacji, a więc miał charakter względny. Podawanie deksametazonu wywoływało szybki, tj. występujący już 24 godz. po podaniu leku, oraz trwały, tj. utrzymujący się w 3 i 7 dniu eksperymentu, ubytek komórek o fenotypie $CD25^{-}CD8^{+}$. Średni ubytek tych limfocytów w 1, 3 i 7 dniu po podaniu leku stanowił odpowiednio 62,78%, 24,10% i 24,01% adekwatnych wartości kontrolnych.
- U zwierząt otrzymujących deksametazon w każdym punkcie czasowym stwierdzano znaczący wzrost odsetka limfocytów T $CD25^{high}WC1^{+}$, przy czym w 1 i 3 dniu po podaniu leku było to skorelowane ze wzrostem liczby bezwzględnej komórek o tym fenotypie. Również odsetek komórek z subpopulacji limfocytów T $CD25^{low}WC1^{+}$ był zwiększony, co stwierdzano w każdym punkcie czasowym. Wzrost ten nie miał wyłącznie charakteru względnego, gdyż w 3 dniu po podaniu leku dochodziło do zwiększenia liczby bezwzględnej komórek z tej subpopulacji. Lek wywoływał szybki, tj. występujący już 24 godz. po jego podaniu, oraz trwały, tj. utrzymujący się w 3 i 7 dniu eksperymentu, ubytek komórek o fenotypie $CD25^{-}WC1^{+}$. Utrata tych limfocytów była bardzo głęboka, gdyż ich średnie ubytki w 1, 3 i 7 dniu od podania leku stanowiły odpowiednio 85,88%, 53,09% i 46,16% adekwatnych wartości kontrolnych.
- **Odsetek komórek $Foxp3^{+}$ wśród limfocytów T $CD25^{high}CD4^{+}$, $CD25^{low}CD4^{+}$, $CD25^{high}CD8^{+}$ i $CD25^{low}CD8^{+}$ oraz liczba bezwzględna limfocytów T o fenotypach $Foxp3^{+}CD25^{high}CD4^{+}$, $Foxp3^{+}CD25^{low}CD4^{+}$, $Foxp3^{+}CD25^{high}CD8^{+}$ i $Foxp3^{+}CD25^{low}CD8^{+}$:**
 - U zwierząt otrzymujących deksametazon, w 1 i 3 dniu po podaniu leku dochodziło do redukcji odsetka komórek wykazujących ekspresję $Foxp3$ wśród limfocytów z subpopulacji $CD25^{high}CD4^{+}$, ale nie towarzyszyła temu zmiana w zakresie liczby bezwzględnej komórek o fenotypie $Foxp3^{+}CD25^{high}CD4^{+}$. Lek nie wpływał na odsetek komórek $Foxp3^{+}$ wśród limfocytów z subpopulacji $CD25^{low}CD4^{+}$, ani też na liczbę bezwzględną komórek o fenotypie $Foxp3^{+}CD25^{low}CD4^{+}$.
 - Stosowanie deksametazonu nie oddziaływało na ekspresję $Foxp3$ wśród limfocytów z subpopulacji $CD25^{high}CD8^{+}$ i $CD25^{low}CD8^{+}$, jak również nie wpływało na liczebność bezwzględną komórek o fenotypach $Foxp3^{+}CD25^{high}CD8^{+}$ i $Foxp3^{+}CD25^{low}CD8^{+}$.

b) Meloksykam

- **Liczebność limfocytów T o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻:**
 - U zwierząt otrzymujących meloksykam, w 1 i 7 dniu doświadczenia dochodziło do redukcji odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{high}CD4⁺; 24 godz. po podaniu pierwszej dawki meloksykamu zanotowano również istotną redukcję liczby względnej i bezwzględnej komórek z subpopulacji o fenotypie CD25^{low}CD4⁺.
 - Podawanie meloksykamu wywoływało przejściową, tj. występującą w 3 dniu eksperymentu, redukcję odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T o fenotypie CD25^{high}WC1⁺.
 - Stosowanie meloksykamu nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów T o fenotypach CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25^{low}WC1⁺, CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺.
- **Odsetek komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ o fenotypach CD25^{high} i CD25^{low} oraz liczba bezwzględna limfocytów T o fenotypach regulatorowych:**
 - W 1 i 7 dniu po podaniu pierwszej dawki meloksykamu następował wzrost odsetka komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T z subpopulacji CD25^{high}CD4⁺, przy czym nie dochodziło do zwiększenia liczby bezwzględnej komórek o fenotypie Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺.
 - Lek nie zmieniał odsetka komórek Foxp3⁺ w obrębie limfocytów z subpopulacji CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺ i CD25^{low}CD8⁺, ani też liczebności bezwzględnej komórek o fenotypie Foxp3⁺CD25^{low}CD4⁺, Foxp3⁺CD25^{high}CD8⁺ i Foxp3⁺CD25^{low}CD8⁺.

Badania in vitro

1. Wpływ deksametazonu i meloksykamu na liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻ oraz na odsetek limfocytów T o fenotypach regulatorowych (tj. na odsetek komórek wykazujących ekspresję Foxp3 wśród limfocytów T z subpopulacji CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺ i CD25^{low}CD8⁺)

a) Deksametazon

- **Liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻:**
 Ekspozycja na deksametazon prowadziła do wzrostu odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ oraz redukcji liczby bezwzględnej komórek z subpopulacji o fenotypach CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺. Wzrost liczby bezwzględnej komórek CD25^{high}CD8⁺ i CD25^{low}CD8 utrzymywał się krócej (brak efektu, odpowiednio, po 24 i 48 godz. hodowli) niż limfocytów o fenotypach CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ (efekt obecny w w/w punktach czasowych, choć nie po 7 dniach ekspozycji na lek). Zwiększenie liczby bezwzględnej komórek CD25^{high} i CD25^{low} w obrębie limfocytów T CD4⁺ wystąpiło później niż miało to miejsce w przypadku limfocytów T CD8⁺ i WC1⁺, ale w przypadku komórek o fenotypie CD25^{high}CD4⁺ efekt ten był najbardziej trwały, gdyż po 7 dniach hodowli w obecności leku był nadal stwierdzany. Ubytek limfocytów T o fenotypach

CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺ utrzymywał się przez cały czas ekspozycji na lek, podczas gdy w przypadku limfocytów T CD25⁻CD4⁺ stwierdzono rekonstytucję ich liczebności przy ostatnim punkcie czasowym.

- **Odsetek komórek Foxp3 wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ o fenotypach CD25^{high} i CD25^{low}:** Efektem ekspozycji na deksametazon była redukcja odsetka komórek Foxp3⁺ w obrębie limfocytów T CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺ i CD25^{low}CD8⁺; lek nie wpływał na odsetek limfocytów Foxp3⁺ wśród komórek subpopulacji CD25^{high}CD8⁺.

b) Meloksykam

- **Liczebność limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻:** Efektem krótkoterminowej (12 i 24 godz.) ekspozycji PBMCs na działanie meloksykamu była redukcja odsetka, choć nie liczby bezwzględnej, komórek CD25^{high}CD4⁺. Z kolei po dłuższej hodowli PBMCs w obecności leku dochodziło do zwiększenia liczby bezwzględnej tych komórek. Meloksykam przejściowo redukował odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}WC1⁺ i CD25^{high}WC1⁺. Lek nie wpływał na liczebność limfocytów z subpopulacji o fenotypach CD25^{low}CD4⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺.
- **Odsetek komórek Foxp3 wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ o fenotypach CD25^{high} i CD25^{low}:** Długotrwała (tj. 7-dniowa) ekspozycja na meloksykam indukowała wzrost odsetka komórek Foxp3⁺ w obrębie limfocytów T CD25^{high}CD4⁺. Nie stwierdzono wpływu meloksykamu na ekspresję Foxp3 w obrębie komórek z subpopulacji o fenotypach CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺ i CD25^{low}CD8⁺.

2. Wpływ deksametazonu i meloksykamu na apoptozę limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25⁻ oraz komórek NK

a) Deksametazon

- **Limfocyty T:** Efektem 12- (limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺) i 6-godzinnej (limfocyty T WC1⁺) ekspozycji PBMCs na deksametazon był znaczący wzrost odsetka komórek wczesnoapoptotycznych (tj. Annexin V⁺7-AAD⁻) wśród subpopulacji o fenotypach CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺, przy czym efekt ten nie był już obserwowany w kolejnym punkcie czasowym. Z kolei obecność deksametazonu w medium hodowlanym znacząco redukowała odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wśród limfocytów T CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺.
- **Komórki NK:** 6-godzinna ekspozycja PBMCs na deksametazon skutkowała znaczącym wzrostem odsetka komórek wczesnoapoptotycznych wśród limfocytów NK, ale w kolejnym punkcie czasowym nie stwierdzano już zmian w odsetku limfocytów NK będących w tym stadium apoptozy.

b) Meloksykam

- **Limfocyty T:** Lek nie wpływał na odsetek komórek wczesnoapoptotycznych w obrębie którejkolwiek z ocenianych subpopulacji limfocytów T.

- **Komórki NK:** Lek nie wywierał wpływu na odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wśród komórek NK.
3. *Wpływ deksametazonu i meloksykamu na proliferację limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25 oraz komórek NK*
- a) **Deksametazon**
- **Limfocyty T:** Lek redukował odsetek komórek proliferujących (tj. BrdU⁺) w obrębie wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T.
 - **Komórki NK:** Lek zmniejszał odsetek komórek proliferujących wśród limfocytów NK.
- b) **Meloksykam**
- **Limfocyty T:** Lek nie wpływał na odsetek komórek proliferujących w obrębie którejkolwiek z ocenianych subpopulacji limfocytów T.
 - **Komórki NK:** Ekspozycja na lek prowadziła do wzrostu odsetka komórek proliferujących wśród limfocytów NK.
4. *Wpływ deksametazonu i meloksykamu na produkcję IFN- γ , IL-10 i TGF- β przez limfocyty T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ o fenotypach CD25^{high}, CD25^{low} i CD25 oraz komórki NK*
- a) **Deksametazon**
- **Limfocyty T:**
 - **IFN- γ :** Ekspozycja na deksametazon prowadziła do redukcji odsetka komórek produkujących IFN- γ w obrębie subpopulacji o fenotypach CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺, natomiast nie wpływała na syntezę tej cytokiny przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujące ekspresję cząsteczki CD25. Lek paradoksalnie zwiększał odsetek komórek IFN- γ ⁺ w obrębie wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T WC1⁺.
 - **IL-10:** Deksametazon redukował odsetek komórek produkujących IL-10 wśród wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i WC1⁺, a ponadto w obrębie komórek CD25^{low}CD8⁺.
 - **TGF- β :** Ekspozycja na deksametazon powodowała wzrost odsetka komórek produkujących TGF- β wśród limfocytów T o fenotypie CD25⁺WC1⁺, natomiast nie wpływała na produkcję tej cytokiny przez resztę badanych subpopulacji limfocytów T.
 - **Komórki NK:**
 - **IFN- γ :** Ekspozycja na deksametazon redukowała odsetek komórek NK produkujących IFN- γ .
 - **IL10:** Deksametazon indukował wzrost odsetka komórek NK syntetyzujących IL-10.
- b) **Meloksykam**
- **Limfocyty T:**
 - **IFN- γ :** Ekspozycja na meloksykam zwiększała odsetek komórek produkujących IFN- γ w obrębie limfocytów T CD25⁺CD4⁺, natomiast redukowała odsetek komórek IFN- γ ⁺ wśród limfocytów z subpopulacji o fenotypie CD25⁺WC1⁺. Lek nie wpływał na produkcję IFN- γ przez pozostałe, oceniane w tym zakresie subpopulacje limfocytów T.

- **IL-10:** Meloksykam redukował odsetek komórek produkujących IL-10 wśród wszystkich badanych subpopulacji limfocytów T WC1⁺, natomiast nie wpływał na produkcję tej cytokiny przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺.
- **TGF-β:** Meloksykam nie wpływał na produkcję TGF-β przez którąkolwiek z badanych subpopulacji limfocytów T.
- **Komórki NK:**
 - **IFN-γ:** Ekspozycja na meloksykam redukowała odsetek komórek NK produkujących IFN-γ.
 - **IL-10:** Meloksykam nie wpływał na produkcję IL-10 przez komórki NK.

*Powyższe zestawienie nie obejmuje wszystkich wyników uzyskanych w toku badań.

4. 3. 4. Omówienie wyników

Deksametazon: omówienie i interpretacja wyników w kontekście farmakodynamicznym

Przeprowadzone badania *in vivo* (Maślanka, 2014) wykazały, że stosowanie deksametazonu u bydła wywołuje znaczącą utratę limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ krwi obwodowej, ale kierunek wpływu leku na liczebność tych komórek jest selektywny, tj. pozostaje w związku z obecnością i intensywnością ekspresji CD25 na tych limfocytach. Redukcja liczebności tych komórek nie była wynikiem ubytku limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ wykazujących ekspresję CD25, lecz była następstwem utraty komórek o fenotypach CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺. Wyniki te znajdują pełne potwierdzenie w adekwatnych badaniach *in vitro*, w których również wykazano, że na cytoredukcyjne działanie deksametazonu nie były wrażliwe komórki z ekspresją CD25, lecz że dotyczyło ono limfocytów T z subpopulacji CD25⁻CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2012), CD25⁻CD8⁺ (Maślanka et al., 2013) i CD25⁻WC1⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013d). Odpowiedzi o przyczynę tego zaburzenia dostarczają wyniki badań *in vitro*, w których wykazano proapoptotyczne (Maślanka & Jaroszewski, 2012, 2013d; Maślanka et al., 2013), a ponadto antyproliferacyjne (Maślanka & Jaroszewski, 2013ad; Maślanka et al., 2013) działanie leku wobec komórek o takim fenotypie. Pozwala to więc na sformułowanie wniosku, że kluczową przyczyną generowanego deksametazonem ubytku limfocytów T o fenotypach CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺ była indukcja ich apoptozy, jakkolwiek upośledzenie ich regeneracji również mogło mieć pewien udział w generowaniu tego efektu, choć ta kwestia nie jest pewna (można jedynie hipotetycznie zakładać, że w odpowiedzi na masową utratę/apoptozę limfocytów T dochodziło do próby ich odtwarzania na drodze proliferacji). Przytaczane badania *in vitro* ujawniły, że proapoptotyczne działanie deksametazonu miało charakter szybko występujący, lecz krótkotrwały. Przejściowy charakter tego efektu każe podejrzewać, że albo tylko pewna pula komórek z subpopulacji, o których mowa, jest podatna na proapoptotyczne działanie leku, albo działanie to ma charakter samoograniczający się. Ta przejściowość proapoptotycznego wpływu leku pozostaje w zgodzie z kinetyką ubytku limfocytów T z subpopulacji CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺ T obserwowaną w badaniach *in vivo* (Maślanka, 2014). Redukcja liczby bezwzględnej tych komórek pojawiła się bardzo szybko, tj. była stwierdzana już w 1 dniu po podaniu leku i nie ulegała pogłębieniu w 3 i 7 dniu eksperymentu, mimo że w tym czasie stężenie terapeutyczne deksametazonu nadal utrzymywało się w organizmie. Co więcej, w tym czasie nastąpił powrót do normy liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁻CD4⁺. Nie doszło do rekonstrukcji liczebności bezwzględnej komórek o fenotypach CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺,

ale uzyskane wyniki wskazują, że zaburzenie to wykazywało wyraźną tendencję ku powrotowi do normy, ponieważ w 7 dniu eksperymentu średni ubytek tych komórek był odpowiednio 2,61 i 1,86 razy mniejszy od wartości tego parametru uzyskanej w 1 dniu eksperymentu (Maślanka, 2014). Uzyskane wyniki w zakresie ustępowania lub utrzymywania się ubytku limfocytów T CD25⁻ w trakcie ekspozycji na deksametazon pozostają w zgodzie z tymi, otrzymanymi w warunkach *in vitro*. Badania te wykazały, że ubytek komórek z subpopulacji CD25⁻CD4⁺ również miał charakter przejściowy, tj. liczebność bezwzględna tych komórek wracała do normy w trakcie ekspozycji na lek (Maślanka & Jaroszewski, 2012), podczas gdy redukcja liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁻CD8⁺ (Maślanka et al., 2013) i CD25⁻WC1⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013d) utrzymywała się przez cały okres doświadczeń. Ta zgodność między wynikami uzyskanymi w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* jest niezwykle ważna, gdyż dowodzi, że ubytek limfocytów T z krwi obwodowej po zastosowaniu deksametazonu faktycznie wynikał ze zmniejszenia ich liczebności (jako następstwa ich zwiększonej apoptozy), a nie z ich przemieszczenia się z układu krążenia do węzłów chłonnych, bądź innych elementów układu limfatycznego (warunki *in vitro* wykluczają możliwość wpływu redystrybucji komórek na ich liczebność). Oczywiście można brać pod uwagę taką możliwość, ale w moim mniemaniu jest to nieprawdopodobne. Redystrybucja limfocytów z układu krążenia do węzłów chłonnych, czy też innych obwodowych narządów limfoidalnych, wymagałaby nabycia przez nie odpowiednich receptorów zasiedlania, np. L-selektyny do zasiedlenia węzłów chłonnych, lub integryny $\beta 7$ do zasiedlenia kępek Peyera i blaszki właściwej jelit. Nic nie wskazuje na to, że glikokortykosteroidy wywierają tego typu oddziaływanie. Wręcz przeciwnie, wykazano, m.in. u człowieka (Filep et al., 1997) i u bydła (Weber et al., 2004), że związki te zmniejszają ekspresję L-selektyny na jednojądrzastych leukocytach krwi obwodowej.

Stosowanie deksametazonu u bydła wywołało ubytek komórek NK (Maślanka, 2014), choć efekt ten nie wystąpił tak szybko, jak miało to miejsce w warunkach *in vitro*, kiedy to już po 6 godz. ekspozycji PBMCs na lek dochodziło do redukcji liczby bezwzględnej tych komórek (Maślanka, 2013). Przyczyny tego efektu należy upatrywać w indukowanej deksametazonem apoptozie komórek NK, gdyż badania *in vitro* ujawniły proapoptotyczne działanie leku wobec tych limfocytów (Maślanka, 2013).

Przeprowadzone badania wykazały, że wrażliwość komórek NK oraz limfocytów T CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺ na cytoredukcyjne działanie deksametazonu jest zróżnicowana i to nie tylko w odniesieniu do czasu trwania tego efektu, lecz również, a może przede wszystkim, w zakresie jego skali. Szczególnie dobitnie wskazują na to wyniki uzyskane w warunkach *in vivo* (Maślanka, 2014). Badania te wykazały, że stosunkowo najmniej podatne na to działanie były dwa pierwsze rodzaje komórek, gdyż ich średni ubytek był mniejszy niż 40%. Redukcja liczby bezwzględnej limfocytów T o fenotypie CD25⁻CD8⁺ była poważniejsza, ponieważ średni ubytek komórek z tej subpopulacji wynosił 62,78% w pierwszym dniu eksperymentu. Najbardziej dramatyczny ubytek dotyczył jednakże limfocytów T CD25⁻WC1⁺, gdyż średni odsetek utraconych komórek z tej subpopulacji w tym punkcie czasowym wynosił aż 85,88%. To zróżnicowanie w skali ubytku poszczególnych typów limfocytów tłumaczy wyniki dotyczące wpływu deksametazonu na odsetek komórek NK oraz całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺. Największy ubytek dotyczył limfocytów T WC1⁺, dlatego też znalazło to odzwierciedlenie w wartościach

odsetkowych. Na pierwszy rzut oka może dziwić fakt, że w 1 dniu po podaniu deksametazonu wystąpił wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺, mimo że lek spowodował redukcję liczby bezwzględnej tych limfocytów. Było to konsekwencją tego, że ubytek limfocytów T CD4⁺ nie był tak głęboki jak komórek T CD8⁺ i WC1⁺. W kolejnych punktach czasowych liczba bezwzględna limfocytów T CD4⁺ wróciła do normy, podczas gdy ubytek komórek T z populacji CD8⁺ i WC1⁺ nadal się utrzymywał; ujawniło się również cytoredukcyjne działanie deksametazonu wobec komórek NK. Naturalnym tego następstwem był wzrost odsetka limfocytów T CD4⁺. Tak więc „niekompatybilność” wyników dotyczących odsetka i liczby bezwzględnej komórek NK i limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ jest wynikiem tego, że indukowany deksametazonem ubytek tych komórek różnił się między sobą pod względem głębokości, czasu pojawienia się oraz czasu trwania. Należy także wziąć pod uwagę, że w wywoływanie zakłócenia we wzajemnym stosunku odsetkowym pomiędzy limfocytami T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ oraz komórkami NK, mógł również być zaangażowany wpływ leku na liczbę limfocytów B. Dostępne jest bowiem doniesienie wskazujące, że stosowanie deksametazonu u bydła może powodować redukcję liczby bezwzględnej tych komórek (Oldham & Howard, 1992).

Podawanie deksametazonu u bydła nie zmieniało liczebności bezwzględnej limfocytów T z subpopulacji CD25^{low}CD4⁺ i CD25^{low}CD8⁺, natomiast indukowało wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T o fenotypach CD25^{high}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ (Maślanka, 2014). Notowany w niektórych punktach czasowych wzrost odsetka limfocytów T o fenotypach CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ bez towarzyszącego wzrostu liczby bezwzględnej tych komórek, należy interpretować jako wzrost o charakterze względnym, stanowiący następstwo utraty komórek z subpopulacji CD25^{low}CD4⁺, CD25^{low}CD8⁺ i CD25^{low}WC1⁺. Wyniki te są stosunkowo zgodne z rezultatami adekwatnych badań *in vitro* (Maślanka & Jaroszewski, 2012, 2013d; Maślanka et al., 2013). Podobnie jak to miało miejsce w warunkach *in vivo*, deksametazon albo nie wpływał na liczbę komórek o fenotypie CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2012), CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013d), albo zwiększał liczbę bezwzględną komórek z tych subpopulacji (w zależności od czasu ekspozycji PBMCs na lek). Krótkotrwałe traktowanie PBMCs lekiem indukowało również wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺ (Maślanka et al., 2013). Przyczyną wzrostu liczby bezwzględnej limfocytów T z w/w subpopulacji bez wątpienia nie była zwiększona proliferacja tych komórek, gdyż wyniki badania *in vitro* (Maślanka & Jaroszewski, 2013ad; Maślanka et al., 2013) wskazują jednoznacznie, że deksametazon nie wzmacnia, lecz upośledza proliferację komórek o takim fenotypie. Zważywszy na to oraz na fakt, że stosowanie leku u zwierząt nie zmniejszało liczebności bezwzględnej limfocytów T o fenotypach CD25^{low}CD4⁺, CD25^{low}CD8⁺ i CD25^{low}WC1⁺ (Maślanka et al., 2014) jasne staje się, że efekt ten był następstwem regulacji w górę ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD25^{low}CD4⁺, CD25^{low}CD8⁺ i CD25^{low}WC1⁺. Należy dodać, że miało to marginalne znaczenie w generowaniu ubytku komórek o tym fenotypie. Już pobieżna analiza uzyskanych wyników wskazuje na to: 24 godz. po podaniu leku dochodziło do głębokiego ubytku limfocytów T CD25^{low}WC1⁺, podczas gdy nie towarzyszył temu wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{low}WC1⁺, a przyrost komórek o fenotypie CD25^{high}WC1⁺ był blisko 40-krotnie mniejszy niż utrata limfocytów T CD25^{low}WC1⁺.

W generowaniu wzrostu liczby bezwzględnej limfocytów T CD25^{high}CD4⁺, CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ w warunkach *in vitro* uczestniczył dodatkowo mechanizm, który nie mógł być zaangażowany we wzrost liczby tych komórek stwierdzany *in vivo*. W badaniach *in vitro* wykazano bowiem, że deksametazon znacząco zmniejszał apoptozę komórek o takim właśnie fenotypie (Maślanka & Jaroszewski, 2012, 2013d; Maślanka et al., 2013). To drugie odkrycie uczyniło niemożliwym ustalenie, czy wzrost liczby bezwzględnej tych komórek obserwowany w warunkach *in vitro* wynikał wyłącznie z ich zmniejszonej śmiertelności, czy też indukcja ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺ również miała w tym swój udział. Należy zauważyć, że podczas hodowli PBMCs pewna pula komórek stale ulega apoptozie, co jest związane ze specyfiką warunków hodowlanych. Tak więc w warunkach *in vitro* antyapoptotyczne działanie deksametazonu wobec limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ wykazujących ekspresję CD25 miało możliwość ujawnienia się, a więc mogło być odpowiedzialne za wzrost liczby bezwzględnej komórek o takim fenotypie. W warunkach *in vivo* komórki nie są narażone na proapoptotyczne oddziaływania, które występują *in vitro*, dlatego nie należy wnioskować, że wykazany po stosowaniu deksametazonu u bydła wzrost liczby bezwzględnej komórek o fenotypach CD25^{high}CD4⁺, CD25^{high}CD8⁺, CD25^{high}WC1⁺ i CD25^{low}WC1⁺ był wynikiem ich zmniejszonej śmiertelności. Tym niemniej, uzyskane wyniki sugerują, że w przypadku stosowania deksametazonu u bydła, lek nie będzie indukować apoptozy limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ wykazujących ekspresję CD25, lecz być może będzie chronić je przed tym typem śmierci komórkowej w przypadku równoczesnego wystąpienia jakiegoś czynnika oddziałującego na nie proapoptotycznie.

Odkrycie, że limfocyty T z ekspresją CD25 są nie tylko niewrażliwe na proapoptotyczne działanie deksametazonu, ale że lek zmniejsza podatności tych komórek w ogóle na apoptozę, jest niezwykle ciekawe i intrygujące. Dostępne są wyniki badań wskazujących, że obecność cząsteczki CD25 może chronić mysie limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ przed apoptozą indukowaną deksametazonem (Chen et al., 2004), ale brak jest danych wskazujących, że deksametazon, bądź inne glikokortykosteroidy, wywierają działanie antyapoptotyczne (jako takie) wobec limfocytów T CD25⁺ człowieka, bądź zwierząt. Nie znajduję wytłumaczenia dla tego ostatniego fenomenu, ale postawiłem hipotezę (Maślanka, 2014) stanowiącą próbę wyjaśnienia niewrażliwości tych komórek na indukowaną deksametazonem apoptozę. Przypuszczam, że obecność cząsteczki CD25 na limfocytach T bydła nie jest przypadkowo skorelowana z brakiem ich podatności na proapoptotyczne oddziaływanie leku, lecz że determinuje to zjawisko, gdyż czyni te komórki wrażliwymi na antyapoptotyczne działanie IL-2, lub potęguje ich wrażliwość na to działanie. Ekspresja CD25 na komórce, a więc łańcucha α receptora dla IL-2 (IL-2R), jest równoznaczna z posiadaniem przez nią receptora o wysokim powinowactwie dla tej cytokiny (jak wspomniano wcześniej, pozostałe łańcuchy, tj. β i γ , składające się na IL-2R występują konstytutywnie na limfocytach T). Obecność tego receptora nadaje komórce zdolność intensywnego wychwytu IL-2 ze środowiska. Należy zakładać, że limfocyty T bydła niewykazujące ekspresji CD25, albo nie są w ogóle zdolne do wiązania IL-2, lub zdolność ta jest znacznie ograniczona w porównaniu do limfocytów T wykazujących ekspresję tej cząsteczki. Wiele badań wskazuje, że IL-2 chroni limfocyty T przed apoptozą indukowaną glikokortykosteroidami (Guizani et al., 1996; Xie et al., 1997; Distelhorst et al., 2002). Glikokortykosteroidy promują proces apoptozy za pośrednictwem indukcji ekspresji I κ B, który jest

inhibitorem NF- κ B, czyli czynnika transkrypcyjnego krytycznego dla produkcji proprzeżyciowych cytokin (Distelhorst et al., 2002). Efekt ten może być najprawdopodobniej niwelowany przez IL-2, gdyż dostępne są doniesienia wskazujące, że chroni ona limfocyty T przed proapoptotycznym działaniem glikokortykosteroidów poprzez hamowanie ekspresji I κ B indukowanej tymi związkami (Xie et al., 1997). Ponadto IL-2 przeciwdziała apoptozie poprzez indukcję ekspresji antyapoptotycznych białek, m.in. Bcl-2 (Kim et al., 2001). Co więcej, wyniki badań Walker et al. (1993) i Guizani et al. (1996) mocno sugerują, że IL-2 przeciwdziała apoptozie limfocytów T indukowanej glikokortykosteroidami za pośrednictwem wpływu na AP-1, czyli ważny czynnik proprzeżyciowy. Tak więc przypuszczam, że deksametazon nie indukował apoptozy limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ wykazujących ekspresję CD25 z uwagi na to, że cząsteczka ta umożliwiała im intensywny wychwyt IL-2 ze środowiska, a ta z kolei dzięki swym antyapoptotycznym oddziaływaniom niwelowała/znosiła proapoptotyczną aktywność leku.

Przeprowadzone badania wykazały, że stosowanie deksametazonu wywołało redukcję odsetka komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T o fenotypie CD25^{high}CD4⁺ (Maślanka, 2014), co wskazywałoby, że lek zmniejszał ekspresję Foxp3 wśród tych komórek. Jednakże w kontekście całokształtu uzyskanych wyników taki wniosek wydaje się błędny. Zważywszy na to, że podanie leku nie wpłynęło na liczbę bezwzględną limfocytów T o fenotypie Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺, a zwiększało liczbę bezwzględną komórek z subpopulacji CD25^{high}CD4⁺, to najwyraźniej redukcja odsetka komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T CD25^{high}CD4⁺ miała charakter względny, tj. wynikała ze wzrostu liczby bezwzględnej komórek Foxp3⁺CD25^{high}CD4⁺. W badaniach *in vitro* również stwierdzono, że w obecności deksametazonu dochodziło do redukcji odsetka komórek Foxp3⁺ wśród limfocytów T z subpopulacji CD25^{high}CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2012). Jakkolwiek wykazano również, że lek redukował odsetek komórek wykazujących ekspresję Foxp3 wśród limfocytów T CD25^{low}CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2012) i CD25^{low}CD8⁺ (Maślanka et al., 2013), podczas gdy w warunkach *in vivo* efekt ten nie miał miejsca (Maślanka, 2014). Najprawdopodobniej rozbieżności te wynikają z tego, że podawanie zwierzętom deksametazonu nie wpływało na liczebność bezwzględną limfocytów T o fenotypie CD25^{low}CD4⁺ i CD25^{low}CD8⁺, podczas gdy ekspozycja na lek w warunkach *in vitro* wpływała znacząco na liczebność tych komórek, co rzutowało na odsetek komórek wykazujących ekspresję Foxp3⁺.

Przeprowadzone badania wykazały, że deksametazon redukował odsetek komórek produkujących IFN- γ wśród komórek NK oraz limfocytów T z subpopulacji CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺, natomiast nie wpływał na syntezę tej cytokiny przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujące ekspresję cząsteczki CD25. Zważywszy na to, że deksametazon wywołuje znaczący ubytek komórek NK i limfocytów T CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺, jasne staje się, że rzeczywiste upośledzenie produkcji IFN- γ może być znacznie większe niż wynika to z danych odsetkowych. Lek paradoksalnie zwiększał odsetek komórek syntetyzujących IFN- γ , a więc kluczową cytokinę prozapalną, w obrębie wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T WC1⁺; wzrostu odsetka komórek IFN- γ ⁺WC1⁺ nie należy jednak przekładać na wartości bezwzględne, gdyż trzeba mieć na uwadze „spustoszenie” jakie deksametazon wywołuje wśród limfocytów T WC1⁺. Uzyskane wyniki w zakresie indukowanego deksametazonem upośledzenia produkcji IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ są zgodne z wynikami innych badań tego typu. Stwierdzono bowiem, że deksametazon zmniejszał produkcję IFN- γ przez

szczurze limfocyty T CD4⁺ (Ramirez, 1998) oraz ludzkie (Okosieme et al., 2006) i mysie (Hinrichs et al., 2005) limfocyty T CD8⁺; wykazano ponadto, że lek wywierał hamujące działanie na ekspresję mRNA dla IFN- γ w limfocytach T CD4⁺ człowieka (Choy et al., 1999). Hamujący wpływ deksametazonu na produkcję IFN- γ wydaje się naturalny, gdyż glikokortykosteroidy są inhibitorami NF- κ B, a produkcja IFN- γ jest zależna od aktywności tego czynnika, gdyż jest on aktywatorem genu tej cytokiny (Najjar et al., 2005). Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizm ten nie dotyczy limfocytów T WC1⁺ bydła, przy czym nie należy raczej tego tłumaczyć brakiem NF- κ B w tych komórkach. Mimo braku danych na temat obecności/nieobecności NF- κ B w limfocytach T WC1⁺ bydła, należy zakładać, że czynnik ten jest w nich obecny, gdyż był on stwierdzany niemal we wszystkich typach komórek ludzi i różnych zwierząt, włączając w to limfocyty T $\gamma\delta$ człowieka (Ferrarini et al., 2008). Oprócz NF- κ B w regulację produkcji IFN- γ zaangażowana jest COX-2 i, co się z tym wiąże, PGE₂. Sharma et al. (2005) stwierdzili, że hamowanie COX-2 znacząco wzmacniało produkcję IFN- γ przez mysie splenocyty. Z kolei w innych badaniach wykazano, że PGE₂ redukowała produkcję tej cytokiny przez limfocyty T CD4⁺ krwi człowieka (Katamura et al., 1995). Tak więc biorąc po uwagę fakt hamującego wpływu SLPZ na aktywność COX-2 i produkcję PGE₂ można powiedzieć, że leki te wywierają przeciwstawne wpływy na produkcję IFN- γ : upośledzają produkcję tej cytokiny poprzez hamowanie NF- κ B, natomiast wzmagają jej syntezę ograniczając hamujące działanie PGE₂ na ten proces. Biorąc powyższe pod uwagę, należy rozważyć możliwość, że w przypadku wpływu deksametazonu na produkcję IFN- γ przez limfocyty T WC1⁺ bydła dominuje ten drugi kierunek oddziaływania leku. Co zaś się tyczy wpływu leku na syntezę tej cytokiny przez bydłce limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, to najwyraźniej w tym przypadku przeważa hamujące działanie leku na NF- κ B. Istnieje jeszcze inne, może bardziej prawdopodobne, wytłumaczenie opisywanego zróżnicowania w zakresie produkcji IFN- γ , o czym będzie mowa dalej. Należy jeszcze zwrócić uwagę na fakt, że u bydła najwyraźniej hamowanie produkcji IFN- γ zachodzące pod wpływem deksametazonu dotyczy tylko komórek CD4⁺ i CD8⁺ niewykazujących ekspresji CD25, podczas gdy komórki CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺ są „oporne” na takie działanie leku. Trudno znaleźć przekonujące wytłumaczenie takiego zróżnicowania. Ustalenie czy „oporność” ta jest warunkowana przez cząsteczkę CD25, czy też obserwowana korelacja jest przypadkowa, wymaga podjęcia dalszych badań.

Deksametazon zwiększał odsetek komórek IL-10⁺ w obrębie limfocytów NK, natomiast redukował odsetek komórek produkujących IL-10 wśród wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i WC1⁺, a ponadto w obrębie komórek CD25^{low}CD8⁺. Tak więc paradoksalnie lek o niepodważalnych właściwościach przeciwzapalnych i immunosupresyjnych upośledza produkcję głównej cytokiny przeciwzapalnej i immunosupresyjnej przez limfocyty T bydła. Efekt ten był niespodzianką, gdyż w świetle wyników wskazujących, że glikokortykosteroidy indukują ekspresję genu dla IL-10 w limfocytach człowieka (Unterberger et al., 2008) oczekiwano, że ekspozycja na deksametazon zwiększy odsetek komórek IL-10⁺ w obrębie badanych limfocytów T. Co więcej, taki kierunek działania leku pozostaje w kontraście z wynikami dotyczącymi jego wpływu na produkcję IL-10 przez ludzkie i mysie limfocyty T. Wykazano bowiem, że deksametazon wywierał hamujące oddziaływanie na produkcję IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ człowieka (Richards et al., 2000) oraz limfocyty T CD8⁺ myszy (Noble et al., 2006). Hipotetyczne wyjaśnienie takiego kierunku

wpływu leku na produkcję IL-10 jest analogiczne z tym, opisanym wyżej dla indukowanego deksametazonem wzrostu odsetka komórek $\text{IFN-}\gamma^+\text{WC1}^+$. Niezależnie od wpływu na poziomie genowym, glikokortykosteroidy mogą ograniczać produkcję IL-10 poprzez zmniejszanie syntezy PGE_2 , gdyż autakoid ten jest silnym induktorem produkcji IL-10 i odgrywa kluczową rolę w regulacji wzajemnej równowagi między wydzielaniem IL-10 i IL-12 (Stolina et al., 2000; Harizi et al., 2002). Tak więc u człowieka w zakresie wpływu deksametazonu na produkcję IL-10 ścierają się dwa przeciwstawne kierunki działania leku - indukcja ekspresji genu dla IL-10 *versus* hamowanie syntezy PGE_2 - przy czym do głosu najwyraźniej dochodzi pierwszy z nich. Być może w limfocytach T bydlą dominuje drugi kierunek oddziaływania leku, lub glikokortykosteroidy w ogóle nie stymulują ekspresji genu dla IL-10.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt, że w zakresie wpływu deksametazonu na produkcję $\text{TGF-}\beta$ jedyną stwierdzoną zmianą był wzrost odsetka komórek produkujących tę cytokinę wśród limfocytów T z subpopulacji $\text{CD25}^-\text{WC1}^+$, należy wnioskować, że zdolność oddziaływania deksametazonu (i najprawdopodobniej innych SLPZ) na produkcję IL-10, $\text{IFN-}\gamma$ i $\text{TGF-}\beta$ przez komórki NK i limfocyty T bydlą oraz kierunek tego oddziaływania nie są jednolite, lecz zależą od typu limfocytu, a w niektórych przypadkach pozostają w związku z obecnością cząsteczki CD25.

Należy brać pod uwagę, że zachodzące pod wpływem deksametazonu zmiany w zakresie odsetka komórek produkujących badane cytokiny (oraz być może i inne obserwowane efekty) mogły nie być wynikiem bezpośredniego oddziaływania leku na badane komórki, lecz mogły mieć charakter pośredni. Efekty te mogły pozostawać w związku z indukowaną lekiem zmienioną liczebnością, proliferacją i apoptozą komórek NK i limfocytów T, lecz również mogły być konsekwencją wpływu deksametazonu na inne typy komórek immunokompetentnych. Zważywszy na całą sieć wzajemnych powiązań w układzie immunologicznym, jest bardziej niż prawdopodobne, że w odpowiedzi na tak duże zakłócenia w jego funkcjonowaniu jakie zachodzą w obecności deksametazonu, dochodzi do zmian w zakresie przebiegu różnych procesów immunologicznych oraz do inicjowania procesów niewystępujących w organizmie nieekspozowanym na działanie leku. Redukcja liczebności komórek produkujących IL-10 (a więc cytokinę antyzapalną, która hamuje odpowiedź immunologiczną typu komórkowego) wśród limfocytów T CD4^+ , CD8^+ i WC1^+ oraz wzrost odsetka limfocytów T WC1^+ syntetyzujących $\text{IFN-}\gamma$ (a więc cytokinę prozapalną, która odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego) mogły nie być wynikiem bezpośredniego oddziaływania leku na produkcję tych cytokin, lecz mogły stanowić mechanizm kompensujący/próbkę kompensacji upośledzenia odporności komórkowej, jako następstwa ubytku komórek NK i limfocytów T oraz depresji produkcji $\text{IFN-}\gamma$ przez komórki NK i limfocyty T CD4^+ i CD8^+ .

Efekt pośredni a efekt bezpośredni

W prezentowanych badaniach oceniano wpływ deksametazonu i meloksykamu na poszczególne komórki NK oraz limfocyty T CD4^+ , CD8^+ i WC1^+ , w tym ich subpopulacje $\text{CD25}^{\text{high}}$, CD25^{low} i CD25^- . Poszczególne populacje i subpopulacje nie były sortowane, lecz badania prowadzono na PBMCs oraz *in vivo*. W toku badań wykazano, że badane leki wywoływały różne zmiany dotyczące w/w limfocytów. Jak wyżej wspomniano, niektóre z obserwowanych efektów mogły mieć charakter wtórny/pośredni, tj. mogły nie być wynikiem bezpośredniego oddziaływania leku na badane komórki. Niektórzy badacze uważają, że o wpływie leku (lub innej badanej substancji)

na dany typ komórek możemy mówić tylko wtedy, kiedy ma on charakter bezpośredni, a więc wynika wyłącznie z bezpośredniego oddziaływania leku na te komórki. Dlatego też wskazują na konieczność prowadzenia badań z użyciem wysortowanych komórek określonego typu lub określonej subpopulacji, tak aby wykluczyć wpływy pośrednie badanej substancji. W związku z tym sprzeciwiają się określaniu wpływów leku wykazanych w badaniach *in vitro* z zastosowaniem PBMCs (lub niesortowanej, tj. całkowitej populacji limfocytów) jako „wywołanych lekiem”, lecz każą je określać jako „zachodzące w obecności leku”, „wywołane ekspozycją na lek” etc. Jest to rozumowanie zupełnie niepoważne, gdyż w jego świetle efekty leku występujące w warunkach *in vivo* nie mogłyby również zostać określone jako wywołane przez niego. Następuje tutaj pomieszanie pojęć i niezrozumienie idei przyświecającej badaniom z zastosowaniem komórek sortowanych. Tego rodzaju badania służą do wyjaśniania poszczególnych etapów mechanizmów różnych zjawisk immunologicznych i mechanizmów działania leków, a nie do ustalania tego, jakie efekty farmakologiczne wywołuje przyżyciowo dany lek, lub inna badana substancja. Nie można bowiem mieć pewności, że brak lub obecność danego efektu stwierdzonego w badaniach z użyciem określonej wysortowanej subpopulacji komórek faktycznie wystąpi w organizmie, jeżeli bowiem dana substancja działa na jeden typ komórek immunokompetentnych, to najprawdopodobniej działa także i na inne tego typu komórki, bezpośrednio lub pośrednio. Z tym z kolei wiąże się mnóstwo wzajemnych oddziaływań między różnymi typami komórek immunokompetentnych, a tym samym między różnymi procesami immunologicznymi (znoszenie działań, wzmaganie, kompensacja etc.; efekt finalny zwykle stanowi tego wypadkową). Interakcje te są nieobecne w warunkach badań na komórkach sortowanych, natomiast mają miejsce przyżyciowo, a ponadto w znacznym zakresie występują w przypadku badań prowadzonych na PBMCs lub niesortowanej, tj. całkowitej populacji limfocytów. Należy z całą mocą podkreślić, że w oczach medycyny bezsporne jest, że efekty (zarówno te pożądane, jak i niepożądane) zachodzące pod wpływem leku, bez względu na to czy mają charakter bezpośredni (czyli stanowią bezpośredni skutek uruchomienia określonego mechanizmu działania), czy pośredni (czyli stanowią daleko idące skutki efektu bezpośredniego: zwykle jako „efekt kaskadowy”, lub efekt jakiegoś procesu uruchamianego w odpowiedzi na lek) są traktowane jako efekty farmakologiczne lub działania niepożądane tego leku. Z takiego punktu widzenia pisany jest niniejszy autoreferat, a także przygotowywane były artykuły stanowiące moją rozprawę habilitacyjną.

Wszystkie zjawiska stanowiące następstwo oddziaływania leku to jego efekty, bez względu na to, jakimi drogami do nich dochodzi

Deksametazon: klasyfikacja wpływów leku na układ immunologiczny byłą w kontekście przeprowadzonych badań

Immunosupresyjny i przeciwwzapalny efekt deksametazonu oraz innych SLPZ na organizm byłą jest niepodważalny. Tym niemniej, jak pokazują prezentowane badania, oddziaływanie deksametazonem na limfocyty T byłą indukuje nie tylko efekty o charakterze immunosupresyjnym, lecz również wyzwała działania, które należy raczej wiązać z regulacją w górę aktywności układu immunologicznego. Do pierwszego typu efektów należy zaliczyć proapoptotyczne działanie leku wobec komórek NK oraz limfocytów T CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺, CD25⁻WC1⁺, antyproliferacyjne działanie wobec komórek NK oraz limfocytów T CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺, upośledzanie produkcji IFN- γ przez komórki NK oraz limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, wzrost odsetka komórek NK syntetyzujących IL-10

oraz odsetka komórek TGF- β^+ wśród limfocytów T WC1 $^+$. Z kolei upośledzenie produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4 $^+$, CD8 $^+$ i WC1 $^+$, wzrost odsetka komórek wydzielających IFN- γ wśród limfocytów T WC1 $^+$ oraz indukcję ekspresji CD25 na limfocytach T należy zakwalifikować do oddziaływań związanych z regulacją w górę aktywności układu immunologicznego. Do takiego typu oddziaływań należy także przypisać antyapoptotyczne działanie leku wobec limfocytów T CD4 $^+$, CD8 $^+$, WC1 $^+$ wykazujących obecność CD25, gdyż, zważywszy na wręcz śladową ekspresję Foxp3 w obrębie dwóch pierwszych populacji, należy je postrzegać przede wszystkim jako komórki efektorowe, a nie regulatorowe (przynajmniej w świetle dzisiejszego stanu wiedzy; ta kwestia została omówiona w dalszej części autoreferatu).

Deksametazon: interpretacja wyników w kontekście klinicznym

Biorąc pod uwagę fakt, że deksametazon indukował apoptozę i w konsekwencji ubytek komórek NK i limfocytów T CD8 $^+$ i WC1 $^+$, jasne staje się, że lek wywiera niszczący efekt przede wszystkim na cytotoksyczne komórki efektorowe ze zdolnością do produkcji IFN- γ . Co więcej, lek nie tylko powodował ubytek producentów tej cytokiny, ale wywierał hamujące działanie na sam proces jej syntezy przez limfocyty T CD8 $^+$ i komórki NK. Deksametazon redukował także liczbę limfocytów T CD4 $^+$ wydzielających IFN- γ (a także liczebność tej populacji), co wskazuje, że lek wpływa negatywnie na działanie limfocytów Th1. Wyniki te jednoznacznie dowodzą, że u bydła deksametazon wywiera destrukcyjne działanie na komórki determinujące odpowiedź typu komórkowego. Zważywszy na mocno wyrażone działanie antyproliferacyjne leku wobec wszystkich ocenianych subpopulacji limfocytów T należy wychodzić z założenia, że jego stosowanie wiąże się z upośledzoną proliferacją tych komórek występującą w odpowiedzi na zakażenia bakteryjne, wirusowe i grzybicze; dotyczy to również komórek NK, ponieważ, jak wykazano, i one proliferują w odpowiedzi na pewne zakażenia wirusowe (Zhao & French, 2013).

Bez wątpienia powyższe efekty w ogromnej mierze są odpowiedzialne za występującą w czasie stosowania deksametazonu oraz innych SLPZ podatność pacjentów na zakażenia, szczególnie wewnątrzkomórkowe. Tym samym uzyskane wyniki potwierdzają słuszność zalecenia, że obecność u pacjenta zakażenia, szczególnie wywołanego przez patogeny wewnątrzkomórkowe, powinna stanowić przeciwwskazanie do stosowania deksametazonu. Choć to zagadnienie zasadniczo nie dotyczy terapii chorób bydła, należy zauważyć, że proapoptotyczne i antyproliferacyjne działanie deksametazonu wobec limfocytów T oraz jego zdolność do upośledzenia produkcji IFN- γ pozostają w związku ze skutecznością kliniczną leku w terapii wielu chorób i zaburzeń autoimmunologicznych, gdyż limfocyty T CD4 $^+$, CD8 $^+$ i $\gamma\delta$ T są zaangażowane w patogenezę tego typu zaburzeń (Kidd, 2003; Tsai et al., 2008; Schirmer et al., 2013). Jak już wspomniano wcześniej, istnieją doniesienia wskazujące, że innym mechanizmem partycypującym w tworzeniu immunosupresyjnego działania deksametazonu oraz innych SLPZ ma być generowanie komórek regulatorowych o fenotypie Foxp3 $^+$ CD25 $^+$ CD4 $^+$ (Karagiannidis et al., 2004; Braitch et al., 2009; Provoost et al., 2009; Xie et al., 2009). Uzyskane wyniki wskazują, że u bydła deksametazon nie oddziałuje w ten sposób. Być może u tego gatunku lek wpływa na inne komórki regulatorowe, jednakże dopóki nie zostaną one odpowiednio zidentyfikowane pod względem fenotypowym, nie będzie możliwe zweryfikowanie tej kwestii. Bydło różni się od człowieka i myszy również pod względem udziału IL-10 w wywoływaniu przeciwwzapalnego i immunosupresyjnego oddziaływania deksametazonu. Prezentowane badania

jednoznacznie wskazują, że w wywoływanie tego działania u bydła nie jest zaangażowany wzrost produkcji IL-10 przez limfocyty T, tak jak ma to mieć miejsce u człowieka i myszy (Richards et al., 2000; Noble et al., 2006). Mimo że wykazano, iż deksametazon zwiększał odsetek komórek produkujących IL-10 wśród komórek NK oraz komórek TGF- β^+ w obrębie limfocytów T z subpopulacji CD25^{low}WC1⁺, to należy zachować ostrożność w interpretacji tego efektu. Jest bowiem niejasne czy efekt ten znajduje przełożenie w realnie zwiększonej produkcji tych cytokin, gdyż, jak wykazano, lek indukuje poważny ubytek zarówno komórek NK, jak i limfocytów T CD25^{low}WC1⁺. Tak więc kwestia udziału wzrostu produkcji IL-10 przez komórki NK oraz TGF- β^+ przez limfocyty T WC1⁺ w kształtowaniu przeciwwzapalnego i immunosupresyjnego działania deksametazonu jest niepewna. Bez wątpienia w wielu przypadkach klinicznych indukowane deksametazonem upośledzenie produkcji IFN- γ przez komórki NK oraz limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ jest jednym z elementów składających się na przeciwwzapalne działanie leku.

Przy dzisiejszym stanie wiedzy w zasadzie niemożliwa jest interpretacja kliniczna wzrostu liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ z ekspresją cząsteczki CD25 w odpowiedzi na stosowanie deksametazonu u bydła. Naturalnym jest postawienie pytania: jaki rodzaj komórek reprezentują bydłące limfocyty T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺? Jak już wspomniano, cząsteczka CD25 występuje przejściowo na aktywowanych limfocytach T oraz konstytutywnie na ludzkich i mysich Foxp3⁺ komórkach regulatorowych z populacji limfocytów CD4⁺ i prawdopodobnie CD8⁺. Tak więc w świetle tego, generowane przez deksametazon limfocyty T CD25⁺CD4⁺ i T CD25⁺CD8⁺ powinny stanowić albo komórki regulatorowe, albo aktywowane komórki efektorowe. W przeszłości w taki właśnie sposób interpretowano indukowane glikokortykosteroidami limfocyty T o fenotypie CD25⁺CD4⁺, tj. niektórzy badacze uznawali je za komórki regulatorowe (Karagiannidis et al., 2004; Braitch et al., 2009; Provoost et al., 2009; Xie et al., 2009), inni, w tym nasz zespół, za komórki aktywowane (Anderson et al., 1999; Maślanka & Jaroszewski, 2012), a wreszcie kolejni rozważali obie możliwości (Menge & Dean-Nystrom, 2008). Należy zauważyć, że już od dawna wiadomo, iż indukcja ekspresji CD25 na limfocytach T CD25⁺CD4⁺ sama przez się nie nadaje tym komórkom właściwości regulatorowych (Thornton & Shevach, 1998). W ogóle nie jest pewne, czy cząsteczka CD25 bierze udział w tworzeniu właściwości regulatorowych Tregs, gdyż dane na ten temat nie są zgodne (Thornton & Shevach, 1998; McNally et al., 2011); obecnie należy brać pod uwagę, że współwystępowanie właściwości regulatorowych i ekspresji cząsteczki CD25 na ludzkich i mysich Tregs może być tylko przypadkową korelacją. W związku z tym, że prezentowane badania nie wykazały, aby deksametazon zwiększał liczbę limfocytów T CD25⁺ o fenotypach regulatorowych, czyli Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺ należy wykluczyć, że generowane lekiem limfocyty T CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺ reprezentowały sobą komórki regulatorowe. Świadczy o tym również fakt, że deksametazon zwiększał liczbę limfocytów T CD25^{low}WC1⁺ i CD25^{high}WC1⁺, a więc komórek, które z natury nie wykazują ekspresji Foxp3 (Maślanka et al., 2012). W świetle tego indukowane lekiem limfocyty T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺ należałoby uznać za komórki aktywowane. Jeżeli rzeczywiście takimi są, to ich powstanie stanowiłoby raczej wtórne następstwo stosowania leku (mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na wyniszczenie limfocytów T?), a nie jego efekt bezpośredni, gdyż wiadomo, że deksametazon, tak jak i inne glikokortykosteroidy, hamuje aktywację limfocytów T, m.in. poprzez depresyjny wpływ na NF- κ B (Ayroldi et al., 2001). Istnieje

jeszcze inne wytłumaczenie genezy zjawiska, o którym mowa i moim zdaniem jest ono najbardziej prawdopodobne. Lek mógł indukować ekspresję CD25 w sposób bezpośredni, tj. niezwiązany z procesem aktywacji. Hipotezę tę wspierają wyniki badań, w których dowiedziono, że glikokortykosteroidy wzmagają ekspresję CD25 na różnych liniach mysich limfocytów T (Lamas et al., 1993); wykazano, że sekwencja promotorowa genu dla CD25 zawiera elementy oddziałujące z glikokortykosteroidami (Lamas et al., 1997). W świetle tej hipotezy, indukowane deksametazonem limfocyty T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺ należy rozpatrywać jako nieaktywowane i nieregulatorowe limfocyty T wyposażone w receptor o wysokim powinowactwie do IL-2. Trzeba jednak jasno powiedzieć, że status i znaczenie tych komórek, tak samo jak i konstytutywnie występujących u bydła limfocytów o takim fenotypie, w chwili obecnej należy uznać za nieznane; ustalenie tej kwestii wymaga podjęcia dalszych badań, szczególnie o charakterze czynnościowym.

Meloksykam: omówienie i interpretacja wyników w kontekście farmakodynamicznym

W przeciwieństwie do deksametazonu, stosowanie u bydła meloksykamu nie prowadziło do ubytku limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ (Maślanka, 2014), co znajduje pokrycie w adekwatnych badaniach *in vitro* (Maślanka & Jaroszewski, 2013cd; Maślanka et al., 2013), gdyż nie stwierdzono w nich, aby lek wpływał na liczebność całkowitych populacji w/w komórek. Pozostaje to w zgodzie z wynikami badań nad wpływem meloksykamu na apoptozę i proliferację limfocytów T CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013ac), CD8⁺ (Maślanka et al., 2013) i WC1⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013d), gdyż nie wykazano, aby lek oddziaływał na te procesy. W badaniach *in vivo* jedyne uchwycone zmiany dotyczące limfocytów T obejmowały redukcję odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T z subpopulacji o fenotypach CD25^{low}CD4⁺, CD25^{high}CD4⁺ i CD25^{high}WC1⁺. Należy raczej wykluczyć, że efekt ten był wynikiem zwiększonej śmiertelności lub zmniejszonej proliferacji tych komórek, gdyż badania *in vitro* nie wykazały, aby meloksykam wpływał na nie proapoptotycznie (Maślanka & Jaroszewski, 2013cd; Maślanka et al., 2013) lub antyproliferacyjnie (Maślanka & Jaroszewski, 2013ad; Maślanka et al., 2013). Z uwagi na to oraz na fakt, że podawanie meloksykamu nie zmieniało liczebności bezwzględnej całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺ i WC1⁺ (Maślanka, 2014) należy wnioskować, że lek regulował w dół ekspresję CD25 na limfocytach T CD4⁺ i WC1⁺. Ten wniosek jest częściowo zgodny z wynikami badań *in vitro*, w których wykazano, że następstwem oddziaływania meloksykamu na PBMCs była redukcja liczebności limfocytów T CD25^{high}CD8⁺ (Maślanka et al., 2013), CD25^{low}WC1⁺, CD25^{high}WC1⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013d) i CD25^{high}CD4⁺ (Maślanka & Jaroszewski, 2013c). Bez wątpienia regulacja w dół ekspresji CD25 nie była następstwem podstawowego mechanizmu działania meloksykamu, czyli redukcji syntezy PGE₂, gdyż w naszych ostatnich badaniach dowiedliśmy, że PGE₂ za pośrednictwem receptora EP4 zmniejsza ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ bydła (Maślanka et al., 2014b). Tak więc uzyskane wyniki wskazują, że albo meloksykam wykazuje jakiś dodatkowy mechanizm działania, za pośrednictwem którego reguluje w dół ekspresję CD25 lub jest to efekt wtórny, czyli stanowi następstwo jakichś innych oddziaływań leku.

Stosowanie meloksykamu prowadziło do wzrostu odsetka komórek wykazujących ekspresję Foxp3 wśród limfocytów T z subpopulacji CD25^{high}CD4⁺ (Maślanka, 2014), co również wykazano w hodowlach PBMCs eksponowanych na lek (Maślanka & Jaroszewski, 2013c). Analiza wyników badań *in vitro* wskazywała wyraźnie, że ekspozycja PBMCs na meloksykam prowadziła do wzrostu

liczby bezwzględnej komórek o fenotypie $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ (Maślanka & Jaroszewski, 2013c), podczas gdy nie znalazło to potwierdzenia w warunkach *in vivo* (Maślanka, 2014). Brak przełożenia indukowanego meloksykalem wzrostu odsetka komórek Foxp3^+ na wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T o fenotypie $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ wynikał z tego, że lek jednocześnie powodował ubytek komórek z subpopulacji $\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$. Wyniki te wskazują, że wnioskowanie, iż meloksykam zwiększa ekspresję Foxp3 wśród komórek o fenotypie $\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$, prawdopodobnie jest nadinterpretacją. Skoro podawanie meloksykamu nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów T $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$, a redukowało liczbę bezwzględną limfocytów T $\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ (Maślanka, 2014), to obserwowany wzrost odsetka komórek z ekspresją Foxp3 wśród limfocytów T $\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ miał najwyraźniej charakter względny, tj. wynikał ze zmniejszenia liczby bezwzględnej limfocytów z subpopulacji $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD4}^+$. Tak więc jest to sytuacja odwrotna względem tej, która dotyczyła wpływu deksametazonu na liczebność komórek z w/w populacji.

Badania *in vivo* (Maślanka, 2014) potwierdziły wyniki badań *in vitro* (Maślanka, 2013) w zakresie wpływu meloksykamu na proliferację i liczbę komórek NK. W badaniach *in vitro* wykazano, że tygodniowa, ale nie 2-dniowa, ekspozycja PBMCs na lek prowadziła do istotnego wzrostu liczby komórek NK (Maślanka, 2013). Znalazło to pełne potwierdzenie w badaniach *in vivo*, gdyż stosowanie meloksykamu znacząco zwiększyło liczbę bezwzględną komórek NK, przy czym nie był to efekt szybko występujący, lecz jego rozwinięcie się wymagało czasu. Wszystko wskazuje na to, że za wystąpienie tego efektu odpowiadała zwiększona proliferacja komórek NK, gdyż w badaniach *in vitro* wykazano, że meloksykam wzmacniał istotnie ich proliferację (indukowaną mitogenem). Komórki te jednak nie proliferują w zdrowym organizmie (według mojej wiedzy), lecz proces ten ma miejsce w przypadku pewnych zakażeń. Sugeruje to więc, że meloksykam wyzwała jakiś proces/czynnik, który inicjuje proliferację komórek NK bydła. Czyżby był nim spadek poziomu PGE_2 ? Mechanizm działania meloksykamu polega na hamowaniu syntezy PGE_2 . W naszych ostatnich badaniach (Maślanka et al., 2014b) wykazaliśmy, że PGE_2 w stężeniach wyższych niż fizjologiczne ($> 10^{-8}$ M) wywiera hamujące działanie na proliferację komórek NK. Nie można jednak twierdzić, że PGE_2 jest fizjologicznym inhibitorem proliferacji komórek NK, skoro taki proces nie występuje w zdrowym organizmie, a PGE_2 w stężeniu fizjologicznym (10^{-8} M) nie wpływa na indukowaną mitogenem proliferację tych limfocytów (Maślanka et al., 2014b). Tak więc w świetle tego oraz uzyskanych wyników można raczej stawiać hipotezę, że obniżona produkcja PGE_2 stanowi czynnik inicjujący proliferację komórek NK. Trzeba dodać, że założenie to wcale nie stoi w kolizji z faktem, że meloksykam preferencyjnie blokuje COX-2, gdyż wiele badań wskazuje, że enzym ten nie odgrywa tylko prozapalnej roli, lecz również pełni funkcje fizjologiczne. Jest bardzo prawdopodobne, że PGE_2 działa jako inhibitor proliferacji komórek NK bydła, ale dotyczy to sytuacji, w których zaistnieje czynnik inicjujący ten proces (tj. pewne zakażenia wirusowe, biorąc pod uwagę współczesny stan wiedzy w tym zakresie) z towarzyszącym wzrostem produkcji PGE_2 (tj. reakcja zapalna), co z zasady jest ze sobą sprzężone. Takie założenie pozostaje w łączności z wynikami wskazującymi, że PGE_2 jest inhibitorem takich funkcji komórek NK człowieka i myszy, jak migracja i cytotoksyczność (Martinet et al., 2010; Holt et al., 2011). W przytaczanych wyżej badaniach (Maślanka et al., 2014b) stwierdzono także, że PGE_2 indukuje apoptozę komórek NK. Należy jednak wykluczyć, że

generowany meloksykalem w warunkach *in vitro* wzrost liczby komórek NK mógł wynikać z ich zmniejszonej apoptozy, ponieważ nie stwierdzono, aby lek wpływał na ten proces (Maślanka, 2013).

Analogicznie jak w przypadku deksametazonu, zdolność oddziaływania meloksykamu na produkcję IFN- γ i IL-10 przez komórki NK i limfocyty T bydła oraz kierunek tego oddziaływania nie są jednolite, lecz zależą od typu limfocytu i mogą pozostawać w związku z obecnością cząsteczki CD25. Wzrost odsetka komórek produkujących IFN- γ w obrębie limfocytów T CD25⁺CD4⁺ oraz redukcja odsetka komórek IL-10⁺ wśród limfocytów T WC1⁺ pod wpływem meloksykamu najwyraźniej wynika z podstawowego mechanizmu działania leku, gdyż, jak już wzmiankowano, wykazano, że hamowanie COX-2 wzmacnia produkcję IFN- γ (Sharma et al., 2005), a PGE₂ działa z jednej strony jako inhibitor produkcji tej cytokiny przez limfocyty T CD4⁺ krwi człowieka (Katamura et al., 1995), a z drugiej jest silnym induktorem syntezy IL-10 (Stolina et al., 2000; Harizi et al., 2002). Brak wpływu leku na produkcję IFN- γ przez limfocyty T CD8⁺ i limfocyty T CD4⁺ i WC1⁺ wykazujące ekspresję CD25 oraz na syntezę IL-10 przez komórki NK oraz limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ sugeruje, że COX-2 i PGE₂ wytwarzana przy jej udziale nie są zaangażowane w regulację produkcji obu cytokin przez te komórki. Zaskakujące są wyniki dotyczące hamującego wpływu meloksykamu na syntezę IFN- γ przez komórki NK i limfocyty T CD25⁺WC1⁺, gdyż uderzają w bieżące poglądy na temat udziału COX-2 i PGE₂ w regulacji syntezy tej cytokiny. Tak więc, albo w przypadku bydłych komórek NK i limfocytów T CD25⁺WC1⁺ PGE₂ działa albo jako stymulator wytwarzania IFN- γ , lub też meloksykam uruchamia jakiś inny mechanizm (tj. niezwiązany z hamowaniem syntezy PGE₂), poprzez który upośledza produkcję IFN- γ przez te komórki, bądź wreszcie zjawisko, o którym mowa, jest efektem pośrednim, tj. stanowiącym następstwo innych wpływów leku; jest prawdopodobne, że redukcja produkcji IFN- γ jest mechanizmem uruchamianym wtórnie w celu kompensacji/utrzymania równowagi Th1/Th2 zakłóconej depresyjnym wpływem meloksykamu na produkcję IL-10 przez limfocyty T WC1⁺.

Meloksykam: klasyfikacja wpływów leku na układ immunologiczny bydła w kontekście przeprowadzonych badań

Przeprowadzone badania wykazały, że u bydła meloksykam w bardzo niewielkim stopniu oddziałuje na limfocyty stanowiące istotę odporności typu komórkowego. Tym niemniej stosowanie leku może wiązać się z pewnymi wpływami na te komórki, a w ich obrębie da się zaobserwować zarówno działania o charakterze immunosupresyjnym, jak i immunostymulującym. Chociaż rola i status bydłych limfocytów T z konstytutywną ekspresją CD25 są niejasne, to redukcję ekspresji tej cząsteczki, zważywszy na jej rolę w procesie aktywacji limfocytów T, należy traktować jako działanie związane z regulacją w dół aktywności układu immunologicznego. Do działań o charakterze immunosupresyjnym należy również zaliczyć upośledzenie produkcji IFN- γ przez komórki NK oraz limfocyty T WC1⁺. Z kolei wzrost liczby limfocytów T CD4⁺ produkujących IFN- γ oraz zwiększanie proliferacji i liczebności komórek NK stanowią bez wątpienia efekty o charakterze immunostymulującym. Tego rodzaju efekt stanowi również upośledzenie produkcji IL-10 przez limfocyty T WC1⁺, gdyż taki kierunek wpływu wiąże się z regulacją w górę odpowiedzi komórkowej, zależnej od limfocytów typu Th1.

Meloksykam: interpretacja wyników w kontekście klinicznym

Na wstępie należy zaznaczyć, że preparaty z meloksykalem przeznaczone do stosowania u bydła posiadają określone wskazania rejestracyjne, czego w żadnym stopniu nie negują (ani nie mogą negować) niniejsze badania. Nie zmienia to jednak faktu, że wpływ leku na limfocyty T oraz komórki NK bydła (tak samo jak i innych zwierząt oraz człowieka) przed podjęciem badań własnych był prawie nieznany. Celowym wydało się wypełnienie tej luki wiedzy, chociażby ze względu na to, że najczęstsze zastosowanie kliniczne NLPZ to łagodzenie reakcji zapalnej towarzyszącej różnym zakażeniom. Oczywiście pełne oszacowanie bezpieczeństwa stosowania meloksykamu w celu zwalczania objawów zapalenia u zwierząt cierpiących z powodu określonych infekcji (szczególnie wewnątrzkomórkowych) wymagałoby wykonania nieporównanie szerszych badań z udziałem zwierząt zakażonych. Jestem świadomy ograniczeń przeprowadzonych badań i zdaję sobie sprawę, że pozwalają one tylko na wyciąganie ostrożnych wniosków, zawężonych do badanych zagadnień. Mam jednak nadzieję, że uzyskane wyniki mają nie tylko znaczenie poznawcze, ale również pewne znaczenie kliniczne, gdyż dają jakiś pogląd w zakresie wpływu leku na odporność komórkową, a tym samym pomogą optymalizować/poprawiać ocenę bilansu korzyść/ryzyko związanego ze stosowaniem meloksykamu u bydła ze wskazań rejestracyjnych, a przede wszystkim w związku z jego stosowaniem w trybie pozarejestracyjnym, co nierzadko ma miejsce w praktyce weterynaryjnej.

Uzyskane wyniki wskazują, że pod względem wpływu na liczebność, apoptozę i proliferację limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ oraz komórek NK, meloksykam wydaje się być lekiem relatywnie bezpiecznym do stosowania u bydła. W przeciwieństwie do deksametazonu, lek nie wywiera destrukcyjnego działania na limfocyty leżące u podstaw odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego. Co prawda meloksykam może zmniejszać ekspresję CD25 na limfocytach T bydła, ale z uwagi na niewielką skalę tego zjawiska, nie jest pewne, czy jest ono w ogóle znaczące klinicznie. Za faktyczny mankament leku należy uznać możliwość hamowania produkcji IFN-γ przez komórki NK i limfocyty T WC1⁺, co nakazuje zachować ostrożność w przypadku jego stosowania u pacjentów z zakażeniami wywołanymi przez patogeny wewnątrzkomórkowe. Z drugiej jednak strony przeprowadzone badania wskazują, że meloksykam promuje proliferację komórek NK, może zwiększać ich liczebność, a ponadto może nasilać produkcję IFN-γ przez limfocyty T CD4⁺, co z kolei jest bardzo cenne u pacjentów z tego rodzaju infekcjami. Prawdopodobnie powyższe efekty o charakterze immunostymulującym mogą w jakimś zakresie wyrównywać działania o naturze immunosupresyjnej. Trzeba podkreślić, że zaobserwowane efekty o charakterze immunosupresyjnym należy traktować jako mankament (w kontekście stosowania leku u pacjentów z zakażeniami lub z immunosupresją), natomiast nie dają one najmniejszych podstaw do „etykietowania” leku, jako działającego immunosupresyjnie w rozumieniu efektu farmakologicznego wykorzystywanego w leczeniu zaburzeń alergicznych i autoimmunologicznych. Pojedyncze oddziaływania o takim charakterze zupełnie nie stanowią o immunosupresyjnej naturze leku w takim rozumieniu. Wszystko wskazuje na to, że nie należy oczekiwać, aby meloksykam mógł w istotny sposób znosić/hamować zaburzenia o charakterze autoimmunologicznym, gdyż wywieranie takiego efektu wymaga zwykle działania antyproliferacyjnego i/lub proapoptotycznego wobec limfocytów T. Co więcej, z uwagi na to, że meloksykam może zmniejszać produkcję IL-10 zasadna wydaje się sugestia, aby zachować

ostrożność przy jego stosowaniu (lub nawet unikać jego podawania) u pacjentów cierpiących z powodu zaburzeń o charakterze alergicznym i autoimmunologicznym.

Pod względem ocenianych parametrów meloksykam okazuje się lekiem nieporównanie bezpieczniejszym od deksametazonu. Tym samym słuszne jest jego stosowanie, jako alternatywnego leku przeciwzapalnego względem deksametazonu w terapii tych chorób bydła, które wymagają hamowania reakcji zapalnej, ale które jednocześnie stanowią przeciwwskazanie do stosowania leków o tak znaczącym działaniu immunosupresyjnym, jakie wywiera deksametazon i inne SLPZ. Uzyskane wyniki wskazują, że nie ma żadnych podstaw, aby sądzić, że lek ten może w jakimkolwiek zakresie stanowić alternatywę względem immunosupresyjnego działania deksametazonu, rozumianego w kategorii działania terapeutycznego, tj. wykorzystywanego w leczeniu zaburzeń o naturze autoimmunologicznej.

Podsumowanie & Wnioski*

- Stosowanie deksametazonu u bydła wywołuje znaczącą utratę limfocytów T $CD4^+$, $CD8^+$ i $WC1^+$ krwi obwodowej, ale kierunek wpływu leku na liczebność tych komórek jest selektywny, tj. pozostaje w związku z obecnością i intensywnością ekspresji cząsteczki CD25.
- Indukowana deksametazonem redukcja liczebności limfocytów T $CD4^+$, $CD8^+$ i $WC1^+$ nie jest wynikiem ubytku komórek o fenotypie $CD25^+CD4^+$, $CD25^+CD8^+$ i $CD25^+WC1^+$, lecz stanowi następstwo utraty komórek z subpopulacji $CD25^-CD4^+$, $CD25^-CD8^+$ i $CD25^-WC1^+$.
- Przyczyną wywołanego przez deksametazon ubytku limfocytów T o fenotypach $CD25^-CD4^+$, $CD25^-CD8^+$ i $CD25^-WC1^+$ jest najwyraźniej indukowana lekiem apoptoza tych komórek.
- Dojrzałe limfocyty T oraz komórki NK bydła są wrażliwe na proapoptotyczne działanie deksametazonu, przy czym działanie to:
 - ma charakter szybko występujący, lecz krótkotrwały, co każe podejrzewać, że tylko pewna pula komórek o których mowa, jest podatna na takie działanie leku, lub ma ono charakter samoograniczający się,
 - dotyczy limfocytów T $CD4^+$, $CD8^+$ i $WC1^+$ niewykazujących ekspresji CD25.
- Deksametazon upośledza proliferację komórek NK oraz limfocytów T $CD4^+$, $CD8^+$ i $WC1^+$, zarówno wykazujących, jak i niewykazujących ekspresji CD25.
- Wrażliwość komórek NK oraz limfocytów T $CD25^-CD4^+$, $CD25^-CD8^+$ i $CD25^-WC1^+$ na cytoredukcyjne działanie deksametazonu jest zróżnicowana, zarówno w odniesieniu do czasu trwania tego efektu, jak również w zakresie jego skali; stosunkowo najmniej podatne na to działanie wydają się być dwa pierwsze rodzaje komórek, w większym stopniu dotyczy to limfocytów T o fenotypie $CD25^-CD8^+$, a największy ubytek dotyczy limfocytów T $CD25^-WC1^+$. W przypadku limfocytów T efekt ten wykazuje mniejszą lub większą (zależnie od rodzaju komórek) tendencję ku powrotowi do normy, jeszcze w trakcie ekspozycji na lek.
- Deksametazon redukuje liczebność komórek produkujących IFN- γ , zarówno wśród komórek NK, jak i w obrębie limfocytów T $CD25^-CD4^+$ i $CD25^-CD8^+$.

*Powyższe wnioski odnoszą się wyłącznie do limfocytów T i komórek NK bydła.

- Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że u bydła deksametazon wywiera destrukcyjne działanie na komórki determinujące odpowiedź typu komórkowego, co bez wątpienia stanowi kluczowy element złożonej mozaiki oddziaływań leku składających się na jego immunosupresyjne i przeciwzapalne działanie.
- Być może w wywoływaniu tych działań ma jakiś udział indukowany lekiem wzrost odsetka komórek NK syntetyzujących IL-10 oraz zwiększenie odsetka komórek TGF- β ⁺ wśród limfocytów CD25⁻WC1⁺.
- W wywoływaniu przeciwzapalnego i immunosupresyjnego działania deksametazonu u bydła nie ma udziału wpływ leku na produkcję IL-10 przez limfocyty T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺, ani też na syntezę TGF- β przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺.
- Deksametazon paradoksalnie redukuje liczebność komórek syntetyzujących IL-10 w obrębie limfocytów T CD25⁺CD4⁺, CD25⁻CD4⁺, CD25^{low}CD8⁺, CD25⁺WC1⁺ i CD25⁻WC1⁺, a zwiększa odsetek komórek produkujących IFN- γ wśród limfocytów T CD25⁺WC1⁺ i CD25⁻WC1⁺.
- Zdolność oddziaływania deksametazonu na produkcję IL-10, IFN- γ i TGF- β przez komórki NK i limfocyty T bydła oraz kierunek tego oddziaływania nie są jednolite, lecz zależą od typu limfocytu, a w niektórych przypadkach pozostają w związku z obecnością cząsteczki CD25.
- Bydłęce limfocyty T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ wykazujące ekspresję cząsteczki CD25, są niewrażliwe na proapoptotyczne działanie deksametazonu; uzyskane wyniki sugerują, że lek może zmniejszać ich apoptozę w przypadku zaistnienia czynnika indukującego ten typ śmierci komórkowej.
- Deksametazon zwiększa liczebność limfocytów T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺, co nie jest wynikiem ich zwiększonej proliferacji, lecz stanowi następstwo indukcji ekspresji CD25 na limfocytach T CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺; w warunkach *in vitro* w wywoływaniu tego efektu dodatkowo uczestniczy antyapoptotyczne oddziaływanie leku wobec komórek o takim fenotypie.
- Status i znaczenie generowanych deksametazonem limfocytów T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺ i CD25⁺WC1⁺ - tak samo jak i naturalnie występujących u bydła limfocytów o tym fenotypie - w chwili obecnej należy uznać za nieznane.
- Indukcja ekspresji CD25 na limfocytach T CD25⁻CD4⁺, CD25⁻CD8⁺ i CD25⁻WC1⁺ odgrywa marginalną rolę w generowaniu ich ubytku.
- W przeciwieństwie do człowieka i myszy, u bydła tylko niewielki odsetek limfocytów T CD25^{high}CD4⁺ i CD25^{low}CD4⁺ wykazuje ekspresję Foxp3. Tak więc komórki te pod względem ekspresji Foxp3, a także i zdolności proliferacyjnej, zupełnie nie stanowią odpowiedników ludzkich i mysich komórek o takim fenotypie.
- Stosowanie deksametazonu u bydła nie prowadzi do wzrostu liczebności komórek o fenotypach regulatorowych, tj. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺; tak więc indukowanie Tregs nie bierze udziału w wywoływaniu przeciwzapalnego i immunosupresyjnego działania leku u tego gatunku.
- Mimo niepodważalnego immunosupresyjnego działania, deksametazon wywala u bydła także efekty, które należy zaliczać do oddziaływań związanych z regulacją w górę aktywności układu immunologicznego; należą tutaj: indukcja ekspresji CD25 na limfocytach T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺,

upośledzenie produkcji IL-10 przez te komórki, wzrost odsetka komórek produkujących IFN- γ wśród limfocytów T WC1⁺ oraz oddziaływanie antyapoptotyczne względem CD25⁺ limfocytów T. Być może są to działania stanowiące mechanizmy kompensujące indukowane deksametazonem upośledzenie odporności komórkowej.

- Meloksykam nie wpływa na liczebność, apoptozę i proliferację limfocytów T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺.
- Stosowanie meloksykamu może prowadzić do wzrostu liczebności komórek NK.
- Meloksykam zwiększa proliferację komórek NK indukowaną mitogenem.
- W przeciwieństwie do deksametazonu, meloksykam nie wpływa destrukcyjnie na limfocyty leżące u podstaw odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego.
- Meloksykam może zmniejszać ekspresję CD25 na limfocytach T bydła, ale z uwagi na niewielką skalę tego zjawiska, nie jest pewne, czy jest ono w ogóle znaczące klinicznie.
- Meloksykam nie wpływa na liczbę bezwzględną limfocytów T o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺.
- Meloksykam nie wpływa na produkcję TGF- β przez limfocyty T.
- Ekspozycja na meloksykam: a) zwiększa odsetek komórek produkujących IFN- γ w obrębie limfocytów T CD25⁺CD4⁺; b) redukuje odsetek komórek IFN- γ ⁺ wśród limfocytów T CD25⁺WC1⁺ oraz komórek NK; c) nie wpływa na produkcję IFN- γ przez limfocyty T CD8⁺ oraz komórki z subpopulacji o fenotypach CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺WC1⁺; d) redukuje odsetek komórek produkujących IL-10 wśród limfocytów T WC1⁺; e) nie wpływa na produkcję IL-10 przez komórki NK oraz limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺.
- Analogicznie jak w przypadku deksametazonu, zdolność oddziaływania meloksykamu na produkcję IL-10 i IFN- γ przez komórki NK i limfocyty T bydła oraz kierunek tego oddziaływania nie są jednolite, lecz zależą od typu limfocytu, a w niektórych przypadkach pozostają w związku obecnością cząsteczki CD25.
- W kontekście stosowania meloksykamu u pacjentów cierpiących na zakażenia wewnątrzkomórkowe za cenny atrybut leku należy uznać jego wpływ na liczebność i proliferację komórek NK oraz wzrost liczby limfocytów T CD4⁺ produkujących IFN- γ , natomiast jego mankamentem jest zdolność do upośledzania produkcji tej cytokiny przez komórki NK oraz limfocyty T WC1⁺. Być może działania o charakterze immunostymulującym mogą w jakimś zakresie wyrównywać działania o naturze immunosupresyjnej.
- Z uwagi na to, że meloksykam może zmniejszać produkcję IL-10 należy zachować ostrożność przy stosowaniu leku u pacjentów cierpiących z powodu zaburzeń o charakterze alergicznym i autoimmunologicznym.
- Należy brać pod uwagę, że pewne efekty wywołane przez deksametazon i meloksykam (szczególnie w zakresie produkcji cytokin) mogą nie być wynikiem ich bezpośredniego oddziaływania na badane komórki, lecz mogą mieć charakter pośredni.
- Pod względem ocenianych parametrów, meloksykam okazuje się lekiem nieporównywalnie bezpieczniejszym od deksametazonu. Tym samym słuszne jest jego zastosowanie jako alternatywnego leku przeciwzapalnego względem deksametazonu w terapii tych chorób bydła, które wymagają hamowania reakcji zapalnej, ale które jednocześnie stanowią przeciwwskazanie do

stosowania leków o tak znaczącym działaniu immunosupresyjnym, jakie wywiera deksametazon i inne SLPZ.

- Wyniki uzyskane w warunkach *in vivo* są w większości zgodne z wynikami adekwatnych badań prowadzonych *in vitro*, co potwierdza, że ten sposób oceny wpływu SLPZ i NLPZ na komórki immunokompetentne stanowi wartościowe i wiarygodne narzędzie badawcze.

Piśmiennictwo

- Amadori M., Archetti I.L., Verardi R., Berneri C. (1995) Role of a distinct population of bovine $\gamma\delta$ T cells in the immune response to viral agents. *Viral. Immunol.*, 8, 81-91.
- Anastassiou E.D., Paliogianni F., Balow J.P., Yamada H., Boumpas D.T. (1992) Prostaglandin E_2 and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2R α gene expression at multiple levels. *J. Immunol.*, 148, 2845-2852.
- Anderson B.H., Watson D.L., Colditz I.G. (1999) The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet. Res. Commun.*, 23, 399-413.
- Atarashi K., Mori T., Yoshiki R., Kabashima K., Kuma H., Tokura Y. (2009) Skin application of ketoprofen systemically suppresses contact hypersensitivity by inducing $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci.*, 53, 216-221.
- Auphan N., DiDonato J.A., Rosette C., Helmborg A., Karin M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science*, 270, 286-290.
- Ayrolti E., Migliorati G., Bruscoli S., Marchetti C., Zollo O., Cannarile L., D'Adamio F., Riccardi C. (2001) Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κ B. *Blood*, 98, 743-753.
- Baratelli F., Lin Y., Zhu L., Yang S.C., Heuzé-Vourc'h N., Zeng G., Reckamp K., Dohadwala M., Sharma S., Dubinett S.M. (2005) Prostaglandin E_2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human $CD4^+$ T cells. *J. Immunol.*, 175, 1483-1490.
- Bartels L.E., Jorgensen S.P., Agnholt J., Kelsen J., Hvas C.L., Dahlerup J.F. (2007) 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone increase interleukin-10 production in $CD4^+$ T cells from patients with Crohn's disease. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 1755-1764.
- Bednarek D., Zdzisińska B., Kondracki M., Kandefer-Szerszeń M. (2003) Effect of steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs in combination with long-acting oxytetracycline on non-specific immunity of calves suffering from enzootic bronchopneumonia. *Vet. Microbiol.*, 96, 53-67.
- Braitich M., Harikrishnan S., Robins R.A., Nichols C., Fahey A.J., Showe L., Constantinescu C.S. (2009) Glucocorticoids increase $CD4^+CD25^{high}$ cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta. Neurol. Scand.*, 119, 239-245.
- Broere F., Apasov S.G., Sitkovsky M.V., van Eden W. (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: *Principles of Immunopharmacology*. Nijkamp F.P. and Parnham M.J. (eds.). Springer Basel AG., Basel, Switzerland, 15-27.
- Brown W.C., Davis W.C., Choi S.H., Dobbelaere D.A., Splitter G.A. (1994) Functional and phenotypic characterization of $WC1^+$ $\gamma\delta$ T-cells isolated from *Babesia bovis*-stimulated T cell lines. *Cell. Immunol.*, 153, 9-27.
- Bucy R.P., Chen C.L., Cooper M.D. (1989) Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J. Immunol.*, 142, 3045-3049.
- Burton J.L., Kehrli M.E. (1996) Effects of dexamethasone on bovine circulating T lymphocyte populations. *J. Leukoc. Biol.*, 59, 90-99.
- Chávez E., Segovia J., Shibayama M., Tsutsumi V., Vergara P., Castro-Sánchez L., Salazar E.P., Moreno M.G., Muriel P. (2010) Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat. *Liver Int.*, 30, 969-978.
- Chen X., Murakami T., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. (2004) Differential response of murine $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur. J. Immunol.*, 34, 859-869.
- Chen L., Yang P., Zhou H., He H., Ren X., Chi W., Wang L., Kijlstra A. (2008) Diminished frequency and function of $CD4^+CD25^{high}$ regulatory T cells associated with active uveitis in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 49, 3475-3482.
- Choy D.K., Ko F., Li S.T., Ip L.S., Leung R., Hui D., Lai K.N., Lai C.K. (1999) Effects of theophylline, dexamethasone and salbutamol on cytokine gene expression in human peripheral blood $CD4^+$ T-cells. *Euro. Respir. J.*, 14, 1106-1112.

- Collins R.A., Werling D., Duggan S.E., Bland A.P., Parsons K.R., Howard C.J. (1998) $\gamma\delta$ T cells present antigen to CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 63, 707-714.
- Collins R.A., Sopp P., Gelder K.I., Morrison W.I., Howard C.J. (1996) Bovine $\gamma\delta$ TcR⁺ T lymphocytes are stimulated to proliferate by autologous *Theileria annulata*-infected cells in the presence of interleukin-2. *Scand. J. Immunol.*, 44, 444-452.
- Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., Vignali D.A. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-569.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 22, 633-640.
- Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. (2009) Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30, 626-635.
- Distelhorst C.W. (2002) Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, 9, 6-19.
- Ferrarini M., Delfanti F., Gianolini M., Rizzi C., Alfano M., Lazzarin A., Biswas P. (2008) NF- κ B modulates sensitivity to apoptosis, proinflammatory and migratory potential in short- versus long-term cultured human $\gamma\delta$ lymphocytes. *J. Immunol.*, 181, 5857-5864.
- Fikri Y., Denis O., Pastoret P., Nyabenda J. (2001) Purified bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes are activated by staphylococcal enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 superantigens: proliferation response, TCR V γ profile and cytokines expression. *Immunol. Lett.*, 77, 87-95.
- Filep J.G., Delalandre A., Payette Y., Földes-Filep E. (1997) Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation*, 96, 295-301.
- French A.R., Yokoyama W.M. (2003) Natural killer cells and viral infections. *Curr. Opin. Immunol.*, 15, 45-51.
- Guizani L., Perrin-Wolff M., Breard J., Binetruy B., Bertoglio J. (1996) Mechanisms in interleukin-2 protection against glucocorticoid-induced apoptosis: regulation of AP-1 and glucocorticoid receptor transcriptional activities. *J. Interferon Cytokine Res.*, 16, 601-609.
- Guzman E., Price S., Poulosom H., Hope J. (2012) Bovine $\gamma\delta$ T cells: Cells with multiple functions and important roles in immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 148, 161-167.
- Harizi H., Juzan M., Pitard V., Moreau J.F., Gualde N. (2002) Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E₂ enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J. Immunol.*, 168, 2255-2263.
- Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. (2005) Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.*, 6, 1123-1132.
- Hinrichs C.S., Palmer D.C., Rosenberg S.A., Restifo N.P. (2005) Glucocorticoids do not inhibit antitumor activity of activated CD8⁺ T cells. *J. Immunother.*, 28, 517-524.
- Hoek A., Rutten V.P., Kool J., Arksteijn G.J., Bouwstra R.J., Van Rhijn I., Koets A.P. (2009) Subpopulations of bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells rather than CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells act as immune regulatory cells *ex vivo*. *Vet. Res.*, 40: 06.
- Holt D., Ma X., Kundu N., Fulton A. (2011) Prostaglandin E₂ (PGE₂) suppresses natural killer cell function primarily through the PGE₂ receptor EP4. *Cancer Immunol. Immunother.*, 60, 1577-1586.
- Inngjerdingen M., Damaj B., Maghazachi A.A. (2001) Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood*, 97, 367-375.
- Itohara S., Nakanishi N., Kanagawa O., Kubo R., Tonegawa S. (1989) Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta: analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5094-5098.
- Javeed A., Zhang B., Qu Y., Zhang A., Sun C., Zhang L., Liu J., Zeng C., Zhao Y. (2009) The significantly enhanced frequency of functional CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells in therapeutic dose aspirin-treated mice. *Transpl. Immunol.*, 20, 253-260.
- Karagiannidis C., Akdis M., Holopainen P., Woolley N.J., Hense G., Rückert B., Mantel P.Y., Menz G., Akdis C.A., Blaser K., Schmidt-Weber C.B. (2004) Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 114, 1425-1433.
- Katamura K., Shintaku N., Yoriko Y., Fukui T., Ohshima Y., Mayumi M., Furusho K. (1995) Prostaglandin E₂ priming of naïve CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN- γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J. Immunol.*, 155, 4604-4612.
- Kidd P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, 8, 223-426.

- Kim E.J., Cho D., Hwang S.Y., Kim T.S. (2001) Interleukin-2 fusion protein with anti-CD3 single-chain Fv (sFv) selectively protects T cells from dexamethasone-induced apoptosis. *Vaccine*, 20, 608-615.
- Lamas M., Sanz E., Martin-Parras L., Espel E., Sperisen P., Collins M., Silva A.G. (1993) Glucocorticoid hormones upregulate interleukin 2 receptor α gene expression. *Cell. Immunol.*, 151, 437-450.
- Lamas M., Campos J.R., Silva A.G. (1997) Identification of a novel glucocorticoid response unit (GRU) in the 5'-flanking region of the mouse IL-2 receptor α gene. *Cytokine*, 9, 973-981.
- Lanier L.L. (2005) NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 225-274.
- Létourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 123, 758-762.
- Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. (2013) Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38, 13-25.
- Lönnroth C., Andersson M., Arvidsson A., Nordgren S., Brevinge H., Lagerstedt K., Lundholm K. (2008) Preoperative treatment with a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) increases tumor tissue infiltration of seemingly activated immune cells in colorectal cancer. *Cancer Immunol.*, 8: 5.
- Mahic M., Yaqub S., Johansson C.C., Tasken K., Aandahl E.M. (2006) FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ Adaptive Regulatory T Cells Express Cyclooxygenase-2 and Suppress Effector T Cells by a Prostaglandin E₂-Dependent Mechanism. *J. Immunol.*, 177, 246-254.
- Martinet L., Jean C., Dietrich G., Fournié J.J., Poupot R. (2010) PGE2 inhibits natural killer and gamma delta T cell cytotoxicity triggered by NKR and TCR through a cAMP-mediated PKA type I-dependent signaling. *Biochem. Pharmacol.*, 80, 838-845.
- Marwaha A.K., Leung N.J., McMurchy A.N., Levings M.K. (2012) TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front. Immunol.*, 3: 129.
- Maślanka T. (2013) Dexamethasone inhibits and meloxicam promotes proliferation of bovine NK cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 35, 225-234.
- Maślanka T. (2014) Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle – In vivo investigations. *Res. Vet. Sci.*, 96, 338-346.
- Maślanka T. (2010) Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD4⁺. *Med. Weter.*, 66, 827-832.
- Maślanka T. (2011) Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD8⁺. *Med. Weter.*, 67, 91-96.
- Maślanka T., Chrostowska M., Rękawek W., Zuśka-Prot M., Jasiecka A., Jaroszewski J.J. (2014a) In vitro exposure to prostaglandin E₂ inhibits proliferation and enhances apoptosis of bovine NK cells. XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Wrocław, 2014. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 39 (Suppl.), 71 (abstract).
- Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2013a) Dexamethasone, but not meloxicam, suppresses proliferation of bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ T cells. *Pol. J. Vet. Sci.*, 16, 219-222.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2013b) Foxp3 expression in bovine CD8⁺ T cells is associated with the intensity of CD25 expression. *J. Vet. Med. Sci.*, 75, 241-244.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2012) *In Vitro* effects of dexamethasone on bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ cells. *Res. Vet. Sci.*, 93, 1367-1379.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2013c) *In Vitro* effects of meloxicam on the number, Foxp3 expression, production of selected cytokines and apoptosis of bovine CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺ cells. *J. Vet. Sci.*, 14, 125-134.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2013d) *In vitro* studies on the influence of dexamethasone and meloxicam on bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 151, 248-262.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Jakubowski P. (2010) Evaluation of the influence of meloxicam and flunixin meglumine on the apoptosis of peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells in calves. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13, 3-12.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Jasiecka A., Ziółkowski H., Jędrzkiewicz D. (2013) Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁻CD8⁺ T cells – *in vitro* study. *Res. Vet. Sci.*, 94, 662-674.
- Maślanka T., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Ziółkowski H., Barski D. (2012) The presence of CD25 on bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells is positively correlated with their production of IL-10 and TGF- β , but not IFN- γ . *Pol. J. Vet. Sci.*, 15, 11-20.
- Maślanka T., Spodniewska A., Barski D., Jasiecka A., Zuśka-Prot M., Ziółkowski H., Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2014b) Prostaglandin E₂ down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 160, 192-200.
- McKeever D.J., Taracha E.L., Innes E.L., MacHugh N.D., Awino E., Goddeeris B.M., Morrison W.I. (1994) Adoptive transfer of immunity to *Theileria parva* in the CD8⁺ fraction of responding efferent lymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1959-1963.

- McNally A., Hill G.R., Sparwasser T., Thomas R., Steptoe R.J. (2011) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 7529-7534.
- Michelin M.A., Figueiredo F., Cunha F.Q. (2002) Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Exp. Parasitol.*, 102, 170-177.
- Najjar I., Baran-Marszak F., Le Clorennec C., Laguillier C., Schischmanoff O., Youlyouz-Marfak I., Schlee M., Bornkamm G.W., Raphaël M., Feuillard J., Fagard R. (2005) Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-κB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.*, 79, 4936-4943.
- Noble A., Giorgini A., Leggat J.A. (2006) Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood*, 107, 4475-4483.
- Okosieme O.E., Parkes A.B., Premawardhana L.D., Thomas A.W., Evans L.M., Lazarus J.H. (2006) Peripheral cytokine expression in autoimmune thyroiditis: effects of in vitro modulation by rosiglitazone and dexamethasone. *Thyroid*, 16, 953-960.
- Oldham G., Howard C.J. (1992) Suppression of bovine lymphocyte responses to mitogens following in vivo and in vitro treatment with dexamethasone. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 30, 161-177.
- Papich M.G. (2011a). Meloxicam. In: Saunders Handbook of Veterinary Drugs. Small and Large Animal. Papich M.G. (ed.). Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 469-470.
- Papich M.G. (2011b). Dexamethasone. In: Saunders Handbook of Veterinary Drugs. Small and Large Animal. Papich M.G. (ed.). Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 207-209.
- Pollock J.M., Welsh M.D. (2002) The WC1⁺ γδ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89, 105-114.
- Provoost S., Maes T., van Durme Y.M., Gevaert P., Bachert C., Schmidt-Weber C.B., Brusselle G.G., Joos G.F., Tournoy K.G. (2009) Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy*, 64, 1539-1546.
- Quenby S., Kalumbi C., Bates M., Farquharson R., Vince G. (2005) Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.*, 84, 980-984.
- Ramirez. R. (1998) Glucocorticoids induce a Th2 response in vitro. *Dev. Immunol.*, 6, 233-243.
- Richards D.F., Fernandez M., Caulfield J., Hawrylowicz C.M. (2000) Glucocorticoids drive human CD8⁺ T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur. J. Immunol.*, 30, 2344-2354.
- Rhen T., Cidlowski J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, 353, 1711-1723.
- Rogers A.N., VanBuren D.G., Hedblom E.E., Tilahun M.E., Telfer J.C., Baldwin C.L. (2005) γδ T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *J. Immunol.*, 174, 3386-3393.
- Schirmer L., Rothhammer V., Hemmer B., Korn T. (2013) Enriched CD161^{high} CCR6⁺ γδ T Cells in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.*, 70, 345-351.
- Seo K.S., Davis W.C., Hamilton M.J., Park Y.H., Bohach G.A. (2009) Development of monoclonal antibodies to detect bovine FOXP3 in PBMCs exposed to a staphylococcal superantigen. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 128, 30-36.
- Seo K.S., Lee S.U., Park Y.H., Davis W.C., Fox L.K., Bohach G.A. (2007) Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Infect. Immun.*, 75, 260-269.
- Sharma S., Zhu L., Yang S.C., Zhang L., Lin J., Hillinger S., Gardner B., Reckamp K., Strieter R.M., Huang M., Batra R.K., Dubinett S.M. (2005) Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-γ-dependent enhancement of antitumor responses. *J. Immunol.*, 175, 813-819.
- Stolina M., Sharma S., Lin Y., Dohadwala M., Gardner B., Luo J., Zhu L., Kronenberg M., Miller P.W., Portanova J., Lee J.C. Dubinett S.M. (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J. Immunol.*, 164, 361-370.
- Taylor G., Thomas L.H., Wyld S.G., Furze J., Sopp P., Howard C.J. (1995) Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves. *J. Virol.*, 69, 6658-6664.
- Thornton A.M., Shevach E.M. (1998) CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.*, 188, 287-296.
- Tsai S., Shameli A., Santamaria P. (2008) CD8⁺ T cells in Autoimmunity. *Immunologia*, 27, 11-21.
- Unterberger C., Staples K.J., Smallie T., Williams L., Foxwell B., Schaefer A., Kempkes B., Hofer T.P., Koeppl M., Lohrum M., Stunnenberg H., Frankenberger M., Ziegler-Heitbrock L. (2008) Role of STAT3 in glucocorticoid-induced expression of the human IL-10 gene. *Mol. Immunol.*, 45, 3230-3237.
- Vane J.R., Botting R.M. (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb. Res.*, 110, 255-258.

- Villarreal-Ramos B., McAulay M., Chance V., Martin M., Morgan J., Howard C.J. (2003) Investigation of the role of CD8⁺ T cells in bovine tuberculosis *in vivo*. *Infect. Immun.*, 71, 4297-4303.
- Walker P.R., Kwast-Welfeld J., Gourdeau H., Leblanc J., Neugebauer W., Sikorska M. (1993) Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1. *Exp. Cell. Res.*, 207, 142-151.
- Wan Y.Y., Flavell R.A. (2009) How diverse - CD4 effector T cells and their functions. *J. Mol. Cell. Biol.*, 1, 20-36.
- Weber P.S., Toelboell T., Chang L.C., Tirrell J.D., Saama P.M., Smith G.W., Burton J.L. (2004) Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 75, 815-827.
- Wilson R.A., Zolnai A., Rudas P., Frenyo L.V. (1996) T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 53, 49-60.
- Workman C.J., Szymczak-Workman A.L., Collison L. W., Pillai M.R., Vignali D.A. (2009) The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66, 2603-2622.
- Wu J., Lanier L.L. (2003) Natural killer cells and cancer. *Adv. Cancer Res.*, 90, 127-156.
- Wyatt C.R., Madruga C., Cluff C., Parish S., Hamilton M.J., Goff W., Davis W.C. (1994) Differential distribution of $\gamma\delta$ T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40, 187-199.
- Xie H., Seward R.J., Huber B.T. (1997) Cytokine rescue from glucocorticoid induced apoptosis in T cells is mediated through inhibition of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. *Mol. Immunol.*, 34, 987-994.
- Xie Y., Wu M., Song R., Ma J., Shi Y., Qin W., Jin Y.A. (2009) A glucocorticoid amplifies IL-2-induced selective expansion of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells *in vivo* and suppresses graft-versus-host disease after allogeneic lymphocyte transplantation. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 41, 781-791.
- Yaqub S., Henjum K., Mahic M., Jahnsen F.L., Aandahl E.M., Bjørnbeth B.A., Taskén K. (2008) Regulatory T cells in colorectal cancer patients suppress anti-tumor immune activity in a COX-2 dependent manner. *Cancer Immunol. Immunother.*, 57, 813-821.
- Yokoyama T., Aramaki O., Takayama T., Takano S., Zhang Q., Shimazu M., Kitajima M., Ikeda Y., Shirasugi N., Niimi M. (2005) Selective cyclooxygenase 2 inhibitor induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates CD4⁺ regulatory cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.*, 130, 1167-1174.
- Zhao Y.M., French A.R. (2013) Mechanistic model of natural killer cell proliferative response to IL-15 receptor stimulation. *PLoS Comput. Biol.*, 9, e1003222.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Badania, w prowadzeniu i opisanu których odegrałem pierwszoplanową rolę & Prace przeglądowe, których byłem wyłącznym autorem, lub w których przygotowaniu odegrałem pierwszoplanową rolę

W ostatnim okresie prowadziłem badania nad wpływem PGE₂ na różne procesy i funkcje limfocytów T i komórek NK bydła. Efektem tych badań było m.in. ustalenie, że:

- PGE₂ może upośledzać proliferację bydlęcych komórek NK oraz indukować ich apoptozę; pierwszy z tych efektów jest wywierany za pośrednictwem receptora EP4, podczas gdy w wywołaniu drugiego nie pośredniczą receptory EP (czyli receptory dla PGE₂), więc najprawdopodobniej ma on charakter pośredni,
- proapoptotyczne i antyproliferacyjne działanie PGE₂ najwyraźniej nie występuje przy jej fizjologicznym poziomie, natomiast może mieć miejsce w trakcie reakcji zapalnej,
- występowanie i natężenie proapoptotycznego działania PGE₂ jest zależne od dawki.

Uzyskane wyniki sugerują, że stosowanie NLPZ u zwierząt z zakażeniami wirusowymi może chronić komórki NK przed indukowanymi przez PGE₂ apoptozą oraz upośledzeniem proliferacji. Rezultaty te referowałem podczas tegorocznego (tj. XV-stego) Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej we Wrocławiu (aktualnie przygotowuję pełnotekstową pracę przedstawiającą całokształt wyżej przytaczanych badań):

Maślanka T., Chrostowska M., Rękawek W., Zuśka-Prot M., Jasiecka A., Jaroszewski J.J. (2014) *In vitro exposure to prostaglandin E₂ inhibits proliferation and enhances apoptosis of bovine NK cells*. XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Wrocław, 2014. Centr. Eur. J. Immunol., 39 (Suppl.), 71 (abstract).

Inne badania z tego obszaru tematycznego dotyczyły wpływu PGE₂ na ekspresję łańcucha α receptora dla IL-2, czyli cząsteczki CD25 na limfocytach T bydła. Badania te wykazały, że PGE₂ zmniejsza ekspresję CD25 na limfocytach T CD4⁺, CD8⁺ i WC1⁺ bydła, a selektywna blokada receptora EP4, ale nie EP1 i EP3, zapobiegała temu efektowi. Dowodzi to, że PGE₂ reguluje w dół ekspresję CD25 za pośrednictwem receptora EP4. Nieoczekiwanie stwierdzono, że ekspozycja badanych komórek na selektywnego agonistę receptora EP2 prowadziła do wzrostu ekspresji CD25 na ich powierzchni. Wyniki te wskazują, że pod względem wpływu PGE₂ na ekspresję CD25 na limfocytach T bydła receptor EP4 służy jako receptor hamujący, podczas gdy receptor EP2 pełni funkcję receptora pobudzającego. Fakt, że nieselektywna, tj. wywołana przez PGE₂, aktywacja receptorów EP zmniejsza ekspresję CD25 dowodzi, że oddziaływania hamujące przeważają nad oddziaływaniami pobudzającymi. Upośledzenie indukcji ekspresji CD25 na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ i WC1⁺ bydła należy rozpatrywać jako działanie o charakterze immunosupresyjnym, ponieważ limfocyty te reprezentują przede wszystkim komórki efektorowe, a odpowiednia ekspresja badanej cząsteczki jest niezbędna dla ich czynności (kluczowy etap aktywacji limfocytów T). Uzyskane wyniki wskazują na możliwość farmakologicznej manipulacji ekspresją CD25 na limfocytach T bydła z użyciem selektywnych antagonistów i agonistów receptorów EP2 i EP4. Należy podkreślić, że jest to pierwsze doniesienie (nie tylko w odniesieniu do bydła, ale w ogóle) identyfikujące receptory

zaangażowane we wpływ PGE₂ na ekspresję cząsteczki CD25. Potwierdzenie tych wyników w odniesieniu do człowieka otwierałoby nowe możliwości/kierunki w leczeniu chorób i zaburzeń autoimmunologicznych poprzez farmakologiczną manipulację ekspresją CD25 na limfocytach T z użyciem selektywnych antagonistów i agonistów receptora EP1 i EP2 (najprawdopodobniej: antagonistów receptora EP2 i agonistów receptora EP4). Powyższe ustalenia uważam za swoje najwartościowsze odkrycie. Wyniki tych badań zostały niedawno opublikowane:

Maślanka T., Spodniewska A., Barski D., Jasiecka A., Zuśka-Prot M., Ziółkowski H., Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2014) *Prostaglandin E2 down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor*. Vet. Immunol. Immunopathol., 160, 192-200 (punktacja MNiSW: 30; IF: 1,748).

Ważne miejsce w moich zainteresowaniach naukowych zajmują komórki regulatorowe, szczególnie w znaczeniu celu terapeutycznego. Farmakologiczna manipulacja funkcją i liczebnością tych komórek może być wartościowym elementem nowych strategii leczenia wielu chorób. Efektem tych zainteresowań była publikacja cyklu prac charakteryzujących najlepiej poznane komórki regulatorowe u ludzi i współczesny stan wiedzy na temat tych komórek u bydła, świni i psa. Według mojej wiedzy było to pierwsze w Polsce tak szerokie opracowanie przeglądowe dotyczące tego zagadnienia. W oparciu o dostępne bazy danych mogę też stwierdzić, że jest to jedyna publikacja przedstawiająca stan wiedzy na temat komórek regulatorowych bydła, świni i psa.

Maślanka T. (2010) *Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD4⁺*. Med. Weter., 66, 827-832 (punktacja MNiSW: 15).

Maślanka T. (2011) *Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD8*. Med. Weter., 67, 91-96 (punktacja MNiSW: 15).

Maślanka T. (2011) *Aktualne poglądy na temat komórek regulatorowych bydła, świni i psa*. Med. Weter., 67, 172-176 (punktacja MNiSW: 15).

W tym obszarze tematycznym prowadziłem także własne badania. Jak wspomniano wcześniej, według danych literaturowych limfocyty T WC1⁺ bydła cechują się zarówno aktywnością regulatorową, jak i efektorową, jakkolwiek nie zostało poznane, czy wykazują one tak dużą plastyczność, że obie te aktywności koegzystują w jednej komórce, czy też w ich obrębie występują odrębne subpopulacje komórek efektorowych i regulatorowych. Jako że z funkcją efektorową i regulatorową komórek WC1⁺ wydaje się być związana, odpowiednio, produkcja IFN- γ i IL-10, podjęto badania nad ustaleniem, czy cytokiny te produkowane są przez odrębne subpopulacje limfocytów WC1⁺, czy też są koprodukowane przez te komórki. Ze względu na postulowaną rolę zużycia IL-2 w mechanizmie supresorowego działania mysich limfocytów regulatorowych o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ dokonano oceny ekspresji cząsteczki CD25 na bydlęcych limfocytach T WC1⁺. W badaniach tych ustalono, że zarówno w obrębie subpopulacji CD25⁻WC1⁺, jak i CD25⁺WC1⁺ komórki produkujące IFN- γ i IL-10 stanowiły w dominującej mierze odrębne subpopulacje. Stwierdzono ponadto dodatnią korelację między obecnością cząsteczki CD25 na limfocytach T WC1⁺ a produkcją IL-10 i TGF- β . Uzyskane wyniki wskazują, że pod względem produkcji IFN- γ , IL-10

i TGF- β , limfocyty T CD25⁺WC1⁺ okazują się mieć bardziej supresorowy profil niż komórki o fenotypie CD25⁺WC1⁺. Wyniki tych badań znalazły się w następującej publikacji:

Maślanka T., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Ziółkowski H., Barski D. (2012) *The presence of CD25 on bovine WC1⁺ $\gamma\delta$ T cells is positively correlated with their production of IL-10 and TGF- β , but not IFN- γ .* Pol. J. Vet. Sci., 15, 11-20 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,570).

W kolejnych badaniach wykazano we krwi bydła naturalne występowanie limfocytów T o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺. Najprawdopodobniej są to komórki regulatorowe, ponieważ wszystko wskazuje na to, że obecność czynnika Foxp3 nadaje komórce właściwości regulatorowych. Dostępne są badania świadczące, że u ludzi i myszy komórki o takim fenotypie pełnią funkcje regulatorowe. Wyniki te zostały przedstawione w publikacji:

Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2013) *Foxp3 expression in bovine CD8⁺ T cells is associated with the intensity of CD25 expression.* J. Vet. Med. Sci., 75, 241-244 (punktacja MNiSW: 25; IF: 0,875).

Moje pierwsze badania dotyczące limfocytów T bydła miały na celu ocenę wpływu stosowania meloksykamu i fluniksyny (NLPZ) na odsetek i apoptozę limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ u cieląt. Były to badania pilotażowe do szerszych badań na wpływem meloksykamu na limfocyty T i komórki NK bydła, które stanowią część mojej rozprawy habilitacyjnej. Wyniki tych badań zostały omówione w następującej pracy:

Maślanka T., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Jakubowski P. (2010) *Evaluation of the influence of meloxicam and flunixin meglumine on the apoptosis of peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells in calves.* Pol. J. Vet. Sci., 13, 3-12 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,507).

Wobec niepoznanego zagadnienia chondrotoksyczności chinolonów u drobiu, podczas studiów doktoranckich podjąłem badania nad ustaleniem wpływu enrofloksacyny na tkankę chrzęstną szklistą chrząstek stawowych i pierścieni tchawicy brojlerów kurzych. Wstępem do tej pracy było zgłębienie zagadnienia patogenezy i epidemiologii chondrotoksyczności chinolonów u ludzi i zwierząt, czego efektem było przygotowanie publikacji przeglądowej przedstawiającej bieżący (na owe czasy) stan wiedzy w tym zakresie:

Maślanka T., Jaroszewski J., Chrostowska M. (2004) *Pathogenesis of quinolone-induced arthropathy. Review of hypotheses*. Pol. J. Vet. Sci., 7, 323-331 (punktacja MNiSW: 20)

We wzmiankowanych wyżej badaniach wykazałem m.in., że:

- stosowanie enrofloksacyny u rosnących brojlerów kurzych, w zalecanej dawce i przez rutynowy czas terapii, a nawet przez okres dłuższy, jest bezpieczne z punktu widzenia możliwości chondrotoksycznego oddziaływania leku,
- enrofloksacyna wywiera działanie chondrotoksyczne u rosnących brojlerów kurzych po jej jednokrotnym podaniu, ale tylko w przypadku 10-krotnego przekroczenia zalecanej dawki,
- enrofloksacyna wywiera niekorzystne oddziaływanie względem chrząstki stawowej u rosnących brojlerów kurzych po jej kilkukrotnym podaniu, ale tylko w przypadku 5-krotnego przekroczenia zalecanej dawki.

- natężenie chondrotoksycznego oddziaływania enrofloksacyny narasta wraz ze zwiększaniem wielkości i liczby dawek leku, a ponadto jest uzależnione od lokalizacji chrząstki stawowej,
- oddziaływanie chondrotoksyczne fluorochinolonów u ptaków jest zdecydowanie słabiej wyrażone w porównaniu do ssaków.

Wyniki powyższych badań przedstawiłem w rozprawie doktorskiej pt. „*Wpływ enrofloksacyny na tkankę chrzęstną szklistą wybranych stawów oraz tchawicy u kurcząt brojlerów*”, którą obroniłem 16.12.2005 roku na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wyniki tych badań zostały opublikowane w późniejszym okresie w dwóch artykułach:

Maślanka T., Jaroszewski J.J. (2009) *Effect of long-term treatment with therapeutic doses of enrofloxacin on chicken articular cartilage*. Pol. J. Vet. Sci., 12, 363-367 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,435).

Maślanka T., Jaroszewski J.J., Mikołajczyk A., Rotkiewicz T. (2009) *Effect of increasing doses of enrofloxacin on chicken articular cartilage*. Pol. J. Vet. Sci., 12, 21-33 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,435).

W czasie studiów doktoranckich przygotowałem także pracę oryginalną przedstawiającą zbiorcze wyniki badań pozostałości substancji hamujących w mleku i antybiotyków w tkankach zwierzęcych, które były wykonywane w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Olsztynie. Badania te prowadzono w ramach krajowego programu badań monitoringowych pozostałości antybiotyków w tkankach zwierzęcych i mleku oraz jako rutynowe badania nadzoru sanitarno-weterynaryjnego nad pozyskiwaniem i przetwórstwem żywności pochodzenia zwierzęcego.

Maślanka T., Jaroszewski J., Gonkiewicz B., Sobczak J. (2004) *Pozostałości substancji hamujących w mleku i antybiotyków w tkankach zwierzęcych*. Med. Weter., 60, 320-322 (punktacja MNiSW: 15; IF: 0,285).

Obok immunofarmakologii do moich głównych zainteresowań naukowych należy farmakologia okulistyczna. Niestety, nie dane mi było prowadzić badań w tym obszarze, jednakże zainteresowanie to zaowocowało kilkoma publikacjami przeglądowymi dotyczącymi tej tematyki. Pierwsze opracowanie stanowiło charakterystykę farmakologiczną antybiotyków i fluorochinolonów w kontekście okulistycznym:

Maślanka T. (2004) *Antybiotyki i fluorochinolony stosowane w okulistyce weterynaryjnej małych zwierząt*. Życie Wet., 79, 220-224 (punktacja MNiSW: 4).

W kolejnej pracy scharakteryzowałem udział metaloproteinaz macierzy (MMPs) w patogenezie wrzodziejącego zapalenia rogówki oraz przedstawiłem bieżący stan wiedzy na temat stosowania inhibitorów MMPs w leczeniu tej choroby.

Maślanka T. (2004) *Metaloproteinazy macierzy oraz ich inhibitory a wrzodziejące zapalenie rogówki u zwierząt*. Życie Wet., 79, 676-681 (punktacja MNiSW: 4).

Następna praca dotyczyła NLPZ pod kątem ich zastosowania w okulistyce weterynaryjnej:

Maślanka T., Jaroszewski J., Barszczewska B. (2005) *Niesteroidowe leki przeciwzapalne stosowane w okulistyce weterynaryjnej*. Magazyn Wet., 14 (101), 68-70 (punktacja MNiSW: 3).

W ostatnim czasie pracowałem nad cyklem prac przeglądowych dotyczących leków obniżających ciśnienie wewnątrzgałkowe (IOP). Prace te stanowią kompilację danych na temat mechanizmu działania tych leków oraz ich skuteczności w obniżaniu IOP u psów i kotów, a ponadto omawiają miejsce i rolę tych środków w terapii poszczególnych typów jaskry u małych zwierząt. Pierwsza z tych prac została przyjęta do druku w Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, a pozostałe znajdują się w recenzji w innych czasopismach.

Maślanka T. (2014) *Pharmacology of topical prostaglandin F_{2α} analogs and their place in the treatment of glaucoma in small animals*. J. Vet. Pharmacol. Ther., doi: 10.1111/jvp.12161 (punktacja MNiSW: 30; IF: 1,323).

W czasie studiów doktoranckich opublikowałem prace przeglądowe przedstawiające charakterystykę farmakologiczną klindamycyny oraz chinolonów w kontekście weterynaryjnym:

Maślanka T., Jaroszewski J., Barszczewska B. (2004) *Charakterystyka klindamycyny stosowanej w farmakoterapii psów i kotów*. Med. Weter., 60, 461-464 (punktacja MNiSW: 15; IF: 0,285).

Maślanka T., Jankowski M., Jaroszewski J. (2003) *Charakterystyka 4-chinolonów stosowanych w farmakoterapii weterynaryjnej*. Magazyn Wet., 12 (80), 54-57 (punktacja MNiSW: 3).

Maślanka T., Jankowski M., Jaroszewski J. (2003) *Charakterystyka 4-chinolonów stosowanych w farmakoterapii weterynaryjnej*. Cz. II. Magazyn Wet., 12 (82), 69-70 (punktacja MNiSW: 3).

5.2. Pozostałe prace oryginalne i przeglądowe

W czasie studiów doktoranckich oraz w trakcie pracy na stanowisku adiunkta uczestniczyłem w licznych doświadczeniach prowadzonych w Katedrze Farmakologii i Toksykologii (wcześniej noszącej nazwę Katedry lub Zespołu Farmakologii), których tematyka dotyczyła przede wszystkim farmakologii układu rozrodczego zwierząt oraz farmakokinetyki leków weterynaryjnych. Byłem także zaangażowany w przygotowanie trzech publikacji przeglądowych, które zostały opracowane w Katedrze. W trakcie pobytu na stażu podoktorskim w Department of Veterinary Molecular Biology (Montana State University, Bozeman, MT, USA) uczestniczyłem w eksperymentach szeroko zakrojonego projektu nad zastosowaniem białka $\sigma 1$ w wywoływaniu tolerancji immunologicznej. Efektem udziału w tych pracach badawczych jest współautorstwo w licznych publikacjach:

5.2.1. Publikacje oryginalne

Ziółkowski H., Jaroszewski J.J., **Maślanka T.**, Grabowski T., Katolik K., Pawęska J., Siemianowska M., Jasińska A., Markiewicz W., Spodniewska A. (2014) *Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics*. Res. Vet. Sci., 97, 99-104 (punktacja MNiSW: 35; IF: 1,511).

- Jasiecka A., Grabowski T., **Maślanka T.**, Ziółkowski H., Jaroszewski J.J. (2013) *Pharmacokinetics of orally administered simvastatin in turkeys*. Pol. J. Vet. Sci., 16, 377-379 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,712).
- Markiewicz W., Kamińska K., Bogacki M., **Maślanka T.**, Jaroszewski J. (2012) *Participation of analogues of lysophosphatidic acid (LPA): oleoyl-sn-glycero-3-phosphate (L-alpha-LPA) and 1-oleoyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphothionate (OMPT) in uterine smooth muscle contractility of the pregnant pigs*. Pol. J. Vet. Sci., 15, 635-643 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,570).
- Grabowski T., Jaroszewski J.J., Świerczewska A., Sawicka R., **Maślanka T.**, Markiewicz W., Ziółkowski H. (2011) *Application of ultra performance columns in high performance liquid chromatography for albendazole and its metabolites determination in turkeys*. Biomed Chromatogr., 25, 1159-1167 (punktacja MNiSW: 20; IF: 1,545).
- Jakubowski P., Jaroszewski J.J., Grabowski T., Markiewicz W., **Maślanka T.** (2010) *Determination of enrofloxacin in chicken plasma by high-performance liquid chromatography for pharmacokinetic study*. Acta Vet-Beograd, 60, 563-572 (punktacja MNiSW: 15; IF: 0.169).
- Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Maślanka T., Skarzyński D.J. (2009) *Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on progesterone production by cultured bovine luteal cells*. Pol. J. Vet. Sci., 12, 305-310 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,435).
- Rynda A., Maddolani M., Mierzejewska D., Ochoa-Raparaz J., **Maślanka T.**, Crist K., Riccardi C., Barszczewska B., Fujihashi K., Mc Ghee J.R., Pascual D.W. (2008) *Low-dose Tolerance is mediated by the M cell ligand reovirus protein sigma1*. J. Immunol., 180, 5187-5120 (punktacja MNiSW: 35; IF: 6.0).
- Wójcik R., Markiewicz W., Małaczewska J., Chrostowska M., **Maślanka T.**, Rotkiewicz Z., Jaroszewski J.J., Siwicki J.K. (2006) *Wpływ meloksykamu na nieswoiste komórkowe i humoralne mechanizmy obronne u bydła*. Med. Weter., 62, 1400-1402 (punktacja MNiSW: 15).
- Jaroszewski J.J., Markiewicz W., Barszczewska B., **Maślanka T.**, Chrostowska M., Janiuk J. (2006) *Wpływ peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) na przepływ krwi w tętnicy macicznej świni*. Med. Weter., 62, 1164-1166 (punktacja MNiSW: 15).
- Barszczewska B., Jaroszewski J.J., Markiewicz W., **Maślanka T.**, Chrostowska M. (2005) *Influence of nitric oxide on the blood flow in the porcine uterine artery; an in vivo study*. Pol. J. Vet. Sci., 8, 195-200 (punktacja MNiSW: 20).
- Korzekwa A., Jaroszewski J. J., Bogacki M., Deptuła K., **Maślanka T. S.**, Acosta T. J., Okuda K., Skarzyński D. J. (2004) *Effects of prostaglandin F2α and nitric oxide on the secretory function of the bovine luteal cells*. J. Reprod. Dev., 50, 411-417 (punktacja MNiSW: 25; IF: 0, 420).
- Markiewicz W., Jaroszewski J. J., Barszczewska B., **Maślanka T.**, Majewski M. (2004) *The distribution and influence calcitonin gene-related peptide (CGRP) on the perfusion pressure in the isolated ovarian artery in the pig*. Folia Morphol., 63, 99-101 (punktacja MNiSW: 15).

5.2.2. Publikacje przeglądowe

Jasiecka A., **Maślanka T.**, Jaroszewski J.J. (2014) *Pharmacological characteristics of metamizole*. Pol. J. Vet. Sci., 17, 207-214 (punktacja MNiSW: 20; IF: 0,712).

Chrostowska M., Jaroszewski J.J., **Maślanka T.** (2005) *Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na owulację i tworzenie ciałka żółtego*. Med. Weter., 61, 865-869 (punktacja MNiSW: 15; IF: 0,259).

Barszczewska B., Jaroszewski J.J., **Maślanka T.** (2004) *Rola tlenu azotu w układzie krążenia – regulacja przepływu krwi w narządzie rodym*. Med. Weter., 60, 920-923 (punktacja MNiSW: 15; IF: 0,285).

6. Udział w konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych

W moim dorobku naukowym znajduje się 31 doniesień konferencyjnych, z czego w 15 przypadkach jestem ich pierwszym lub wyłącznym autorem. Doniesienia te były prezentowane na 17 konferencjach krajowych i międzynarodowych. Szczegółowe dane na ich temat znajdują się w Załączniku nr 3 dołączonym do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego. W 11 konferencjach uczestniczyłem czynnie (obecność na konferencji wraz z prezentacją wyników w formie plakatu lub wystąpienia ustnego); należą tutaj:

- Konferencja szkoleniowo-naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego pt. „Człowiek, żywność, środowisko - problemy współczesnej toksykologii”, Olsztyn 2014.
- XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Wrocław 2014.
- Konferencja naukowa pt. „Biologia medyczna - dyscyplina wielu dziedzin”, Jurata 2014.
- XVIII Międzynarodowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego, Kazimierz Dolny 2013.
- XIV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Wrocław 2012
- Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego pt. „Toksykologia w służbie publicznej”, Jurata 2011.
- XIV Kongres Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, Gdańsk 2011.
- Konferencja naukowa pt. „Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków”, Olsztyn 2010.
- XIII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Olsztyn 2008.
- The 94th Annual Meeting of the American Association of Immunologists, Miami, USA, 2007.
- XII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych, Warszawa 2004.

7. Inna aktywność naukowa

Wygłosiłem następujące referaty:

Maślanka T. *Leki przeciwwjaskrowe - charakterystyka farmakologiczna z uwzględnieniem zastosowania klinicznego w terapii jaskry małych zwierząt*. Wykład wygłoszony na zaproszenie organizatorów III Konferencji studenckiej pt. „Okulistyka i kardiologia małych zwierząt”. Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, 16.02.2013.

Maślanka T. *Toksyczność narządowa wybranych leków przeciwbakteryjnych*. Wykład wygłoszony na zaproszenie Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego. Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, 07.12.2012.

Maślanka T. *Wpływ steroidowych i niesteroidowych leków przeciwzapalnych na wybrane subpopulacje limfocytów T*. Wykład wygłoszony na zaproszenie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego. Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, 22.03.2012.

Byłem jednym z tłumaczy kompendium leków pt. „*Saunders Handbook of Veterinary Drugs. Small and Large Animal*” autorstwa Marka G. Papicha (Elsevier Saunders, St. Louis, 2011), które zostało wydane w Polsce (Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2013; redakcja naukowa: prof. dr hab. B. Obmińska-Mrukowicz i prof. dr hab. M. Światała) jako „*Leki w weterynarii. Małe i duże zwierzęta*”. Przetłumaczyłem następujące monografie: acepromazyna, acetylocyteina, alprazolam, atowakwon, atrakurium, betanecchol, bromek N-butyloskopolaminy, bupiwikaina, chlorek potasu, cyzapryd, cynk, dantrolen, dekstran żelaza, diklazuril, dinoprost, doksapram, domperidon, fenylefryna, fosforan potasu, glukonian potasu, imidokarb, izotretynoina, kłopidogrel, kloprostenol, mepiwakaina, metokarbamol, metoksamina, metronidazol, metylonaltrekson, mitotan, nalokson, naltrekson, nitazoksanid, olej MCT, pankrelipaza, pankuronium, pirymetamina + sulfadiazyna, ponazuril, ronidazol, siarczan żelaza, tauryna, tegaserod, tinidazol, toltrazuril, wazopresyna, wodorotlenek glinu i węglan glinu.

8. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego (dotyczy tylko publikacji pełnotekstowych)

8.1. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego pod kątem rodzaju publikacji oraz tego, czy zostały opublikowane w czasopismach z naliczonym IF (lista JCR = lista „A” MNiSW), czy też nieposiadających tego wskaźnika (obecnie lista „B” MNiSW)

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punktacja MNiSW	IF
Prace oryginalne w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW) (w tym wykorzystane w rozprawie habilitacyjnej)	22 (7)	535 (195)	25,724 (9,507)
Prace oryginalne w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	5	68	-
Prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR (lista „A” MNiSW)	5	95	2,864
Prace przeglądowe w czasopismach z listy „B” MNiSW (tj. czasopisma bez naliczonego IF)	9	82	-
Łącznie	41	780	28,588

8.2. Zestawienie liczbowe dorobku naukowego w kontekście: pierwsze (lub wyłączne) autorstwo versus inne miejsca w szeregu autorskim

	Liczba publikacji		Punktacja MNiSW		IF	
	Suma	Odsetek	Suma	Odsetek	Suma	Odsetek
Publikacje oryginalne*						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	14	51,85%	345	57,21%	14,362	55,83%
Pozostałe publikacje	13	48,15%	258	42,79%	11,362	44,17%
Publikacje przeglądowe**						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	11	78,57%	127	71,75%	1,608	56,15%
Pozostałe publikacje	3	21,43%	50	28,25%	1,256	43,85%
Łącznie***						
Publikacje, których jestem pierwszym lub wyłącznym autorem	25	60,98%	472	60,51%	15,97	55,86%
Pozostałe publikacje	16	39,02%	308	39,49%	12,618	44,14%

- Punktację MNiSW podano według komunikatu MNiSW z dn. 17 grudnia 2013 r. ws. wykazu czasopism naukowych.
- IF (Impact Factor / Współczynnik wpływu) podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułów opublikowanych w roku 2014 podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2013.
- Wartość odsetka odnosi się do całkowitej wartości poszczególnych parametrów dotyczących albo artykułów oryginalnych*, albo przeglądowych**, bądź też wszystkich publikacji***.

8.3. Pozostałe dane bibliograficzne

- Liczba cytowań:
 - ❖ Według bazy „Thomson Reuters Web of Science”: 104 (78 bez autocytowań),
 - ❖ Według bazy danych „Scopus” (Elsevier): 119 (92 bez autocytowań),
- Indeks Hirscha: 4 (według baz „Thomson Reuters Web of Science” oraz “Scopus”)

9. Udział w projektach badawczych

9.1. Projekty badawcze prowadzone w ramach działalności statutowej

- ❖ Temat statutowy nr 0533-0807 pt. „*Farmakokinetyka i immunofarmakologia leków weterynaryjnych*”. Eksperymenty prowadzone w ramach badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących moją rozprawę habilitacyjną były finansowane z tego tematu, tak jak i doświadczenia opisane w innych pracach: Maślanka et al., 2012, Maślanka & Jaroszewski, 2013b i Maślanka et al., 2014ab.

9.2. Projekty badawcze KBN i NCN

- ❖ KBN (2 P06K 025 30) „*Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na funkcję wydzielniczą jajnika krowy*” - wykonawca.
- ❖ NCN (198893) „*Odpowiedź immunologiczna komórkowa i humoralna na zakażenie pestiwirusami bydła poprzez stosowanie zanieczyszczonych nimi szczepionek*” - wykonawca.

10. Nagrody/wyróżnienia w obszarze działalności naukowej

- ❖ Wyróżnienie Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za rozprawę doktorską, Olsztyn 2005.
- ❖ Nagroda III stopnia PTNW za rok 2009 [za współautorstwo w pracy: Maślanka T., Jaroszewski J.J, Mikołajczyk A., Rotkiewicz T. (2009) *Effect of increasing doses of enrofloxacin on chicken articular cartilage*. Pol. J. Vet. Sci., 12, 21-33], Warszawa 2010.
- ❖ Nagroda indywidualna III stopnia Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za osiągnięcia w dziedzinie naukowej, Olsztyn 2011.

11. Działalność dydaktyczna i osiągnięcia w tym obszarze

11.1. Zajęcia dydaktyczne ze studentami kierunku „weterynaria” na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie:

- ❖ Od roku 2002 (z przerwą w okresie od kwietnia 2006 do maja 2008) prowadzę ćwiczenia z przedmiotu „Farmakologia weterynaryjna”.
- ❖ Od dwóch lat jestem kierownikiem przedmiotu „Farmacja”; od roku 2009 prowadzę ćwiczenia z tego przedmiotu (tj. od roku rozpoczęcia jego realizacji na Wydziale), a od dwóch lat również wykłady.
- ❖ Jestem kierownikiem i jedynym prowadzącym przedmiot fakultatywny „Farmakologia kliniczna” od momentu jego wprowadzenia na Wydziale, tj. od roku 2012.

11.2. Inne zajęcia dydaktyczne

- ❖ W okresie od września 2004 do marca 2006 byłem wykładowcą przedmiotu „Farmakologia z elementami chemii leków” na kierunku „technik farmaceutyczny” realizowanym w Policealnym Studium Farmaceutycznym przy Zespole Szkół Chemicznych i Ogólnokształcących w Olsztynie.
- ❖ W okresie od września 2009 do czerwca 2012 byłem wykładowcą przedmiotu „Farmakologia z elementami chemii leków” na kierunku „technik farmaceutyczny” realizowanym w Medycznej Szkole Zawodowej „Promedica” w Olsztynie.

11.3. Osiągnięcia w zakresie wyników badania ankietowego prowadzonego wśród studentów IV roku kierunku „weterynaria” realizowanego na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie oraz w ramach rokrocznie organizowanego plebiscytu „Belfer roku”, a więc plebiscytu na najlepszego nauczyciela akademickiego UWM.

- ❖ W wyżej wymienionym badaniu ankietowym zajmowałem pierwsze (badanie ankietowe prowadzone wśród absolwentów rocznika 2006-2012) i drugie (badania ankietowe prowadzone wśród absolwentów roczników: 2005-2011 i 2007-2013) miejsce w kategorii „Najlepsi nauczyciele prowadzący ćwiczenia”. Wyniki tych badań są dostępne na stronie Wydziału: (<http://www.uwm.edu.pl/wmww/specjalizacja/wszjk/ankiety6rok.htm>)
- ❖ W roku 2010 oraz 2012 zająłem drugie miejsce (głosowanie tajne wśród studentów kierunku „weterynaria”) w wydziałowym etapie plebiscytu, odpowiednio, „Belfer 2010” i „Belfer 2012”.
- ❖ W roku 2009 i 2013 zająłem pierwsze miejsce (głosowanie tajne wśród studentów kierunku „weterynaria”) w wydziałowym etapie plebiscytu, odpowiednio, „Belfer 2009” i „Belfer 2013”, w związku z czym byłem przedstawicielem Wydziału do drugiego etapu konkursu, który spośród kandydatów wydziałowych w drodze głosowania internetowego wyłania zwycięzcę. Wygrałem plebiscyt „Belfer 2009”, tym samym otrzymującego tytuł najlepszego nauczyciela akademickiego UWM roku 2009, a w zeszłorocznej edycji konkursu zająłem drugie miejsce. Te dwa wyróżnienia są dla mnie szczególnie cenne, gdyż ich uzyskanie wynikało wyłącznie z dobrej woli studentów. Rekompensują mi one wiele.

11.4. W bieżącym roku opublikowałem następującą pozycję:

Maślanka T. *Farmakologia kliniczna małych zwierząt – wybrane zagadnienia*. ISBN: 978-83-63503-17-8, Wydawnictwo Druk-24h.com.pl, Białystok 2014.

Podręcznik został przygotowany i wydany w ramach projektu pt. „*Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UWM w Olsztynie*” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, realizowanego przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Publikacja została wydana w otwartym dostępie; jest dostępna w wersji elektronicznej na stronie Warmińsko-Mazurskiego Portalu Weterynaryjnego: <http://pl.wet.uwm.edu.pl/wiedza-ogolna/artukul/farmakologia-kliniczna-malych-zwierzat-wybrane-zagadnienia/>. Opracowanie to jest przeznaczone dla studentów kierunku „weterynaria”, ma charakter dydaktyczny i stanowi materiał pomocniczy do zajęć z farmakologii klinicznej. Przygotowując tę pozycję moim głównym zamysłem było zebranie i przedstawienie bieżących zaleceń/schematów postępowania w zakresie farmakoterapii wybranych chorób małych zwierząt. Publikacja ta obejmuje sześć zasadniczych rozdziałów: (1) Antybiotykoterapia praktyczna; (2) Steroidowe leki przeciwzapalne; (3) Farmakoterapia astmy oskrzelowej kotów; (4) Farmakologia okulistyczna; (5) Farmakoterapia wybranych chorób układu krążenia; (6) Leki stosowane w zaburzeniach behawioralnych. W publikacji tej znalazło się ponad 70 oryginalnych tabel o charakterze kompilacyjnym, tj. opracowanych przeze mnie na podstawie odpowiednich danych literaturowych,

które przedstawiają wytyczne towarzystw naukowych bądź ekspertów, a ponadto moje własne sugestie m.in. w zakresie:

- ❖ doboru antybiotyków i chemioterapeutyków syntetycznych do terapii zakażeń/zapaleń nieswoistych (13 jednostek chorobowych; w wielu przypadkach przedstawiono kilka niezależnych rekomendacji/wytycznych) oraz wybranych chorób zakaźnych (6 jednostek chorobowych) psów i kotów,
- ❖ algorytmów leczenia astmy kotów,
- ❖ zasad farmakoterapii (u małych zwierząt): zakażenia powiek, zapalenia spojówek, wrzodziejącego zapalenia rogówki, bakteryjnego zapalenia wnętrza gałki ocznej, zapalenia rogówki u kotów na tle zakażenia herpeswiryusem typu 1, suchego zapalenia rogówki i spojówek, przewlekłego powierzchownego zapalenia rogówki, zapalenia błony naczyniowej, postępowania w ostrym ataku jaskry z zamkniętym kątem przesączania oraz występującej wtórnie do zapalenia błony naczyniowej,
- ❖ algorytmów doboru leków do terapii nadciśnienia u małych zwierząt, leczenia kardiomiopatii przerostowej u kotów oraz bieżących wytycznych w zakresie zasad i doboru leków do terapii niewydolności serca u psów spowodowanej przewlekłą chorobą zastawek oraz kardiomiopatią rozstrzeniową,
- ❖ doboru leków do terapii zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych, lęku separacyjnego i agresji dominacyjnej u małych zwierząt.

Ponadto opracowałem wiele tabelarycznych zestawień leków w różnych aspektach; należą tu m.in. zestawienia:

- ❖ poszczególnych grup leków przeciwbakteryjnych pod kątem ich spektrum działania,
- ❖ leków przeciwbakteryjnych pod kątem ich dystrybucji w obrębie różnych przestrzeni organizmu,
- ❖ leków przeciwbakteryjnych pod kątem ich toksyczności narządowej,
- ❖ kombinacji leków przeciwbakteryjnych stosowanych w leczeniu skojarzonym zakażeń bakteryjnych u małych zwierząt,
- ❖ sercowo-naczyniowych efektów farmakologicznych leków znajdujących zastosowanie w terapii niewydolności serca i nadciśnienia tętniczego u małych zwierząt,
- ❖ dawkowania leków z różnych grup,
- ❖ dostępności na terenie kraju leków z grup, o których mowa w opracowaniu.

Odminnym od reszty rozdziałem jest ten, który poświęciłem SLPZ. Leki te, obok antybiotyków i fluorochinolonów, stanowią najczęściej stosowaną grupę środków w weterynarii. Wobec braku aktualnego kompleksowego opracowania dotyczącego tych środków (w kontekście ich zastosowania w weterynarii) za celowe uznałem przygotowanie rozdziału poświęconego temu zagadnieniu. Myślę, że rozdział poświęcony farmakologii okulistycznej może być szczególnie przydatny (każdy, kto zajmuje się okulistyką weterynaryjną wie, jak wielką niszę stanowi weterynaryjna farmakologia okulistyczna); bez wątpienia jest to jedyne tego typu polskie opracowanie.

Omawiana pozycja stanowi pierwszy polski podręcznik z zakresu farmakologii klinicznej małych zwierząt. Stanowi ona wynik moich długotrwałych studiów literaturowych i przemyśleń.

Farmakolodzy różnią się po względem wizji/definicji/istoty farmakologii klinicznej. Ja widzę ją tak, jak to przedstawiłem w omawianym opracowaniu. Zdaję sobie sprawę z jego mankamentów, ale myślę, że nie przesadzę jeśli powiem, że pod względem układu i pomysłu, pozycja ta jest dosyć oryginalna. Liczę, że w przyszłości uda mi się ją wydać w poprawionej i rozszerzonej wersji.

12. Działalność organizacyjna, członkostwo w towarzystwach naukowych i inne

- Działalność organizacyjna na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie:
 - ❖ Jestem członkiem Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (jako przedstawiciel nauczycieli akademickich nie będących samodzielnymi pracownikami naukowo-dydaktycznymi).
 - ❖ Jestem członkiem Wydziałowej Komisji ds. Oceny Nauczycieli Akademickich (jako przedstawiciel nauczycieli akademickich nie będących samodzielnymi pracownikami naukowo-dydaktycznymi).
 - ❖ Pełnię funkcję przewodniczącego Komisji skrutacyjnej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.
 - ❖ Pełnię funkcję przewodniczącego Wydziałowego Zespołu ds. Zapewniania Jakości Kształcenia.
- Pełnię funkcję promotora pomocniczego w otwartym przewodzie doktorskim mgr Agnieszki Jasieckiej pod roboczym tytułem „*Farmakokinetyka tigeocykliny i jej interakcje z paszą u indyków*”.
- Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych oraz Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego.
- Byłem członkiem komitetu organizacyjnego konferencji naukowej „*Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków*” (Olsztyn, 24-25 czerwca 2010) oraz konferencji szkoleniowo-naukowej Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „*Człowiek, żywność, środowisko - problemy współczesnej toksykologii*” (Olsztyn, 16-19 września 2014).

Tomasz Maślanka
16 / 08 / 2014