

Rada Naukowa Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

za pośrednictwem:

Rady Doskonałości Naukowej

pl. Defilad 1

00-901 Warszawa

(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Dr n. wet. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wniosek

z dnia 24.06.2025

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia **doktora habilitowanego**
w dziedzinie **nauk weterynaryjnych** w dyscyplinie **weterynaria**.

Wnoszę – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~tajnym~~/jawnym^{*1}

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu.

Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/klauzula-informacyjna-rodo.html

...*Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk*
(podpis wnioskodawcy)

¹ * Niepotrzebne skreślić.

Załączniki:

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia Dyplomu Doktorskiego
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
5. Deklaracje współautorów wskazujące na ich wkład w cykl powiązanych tematycznie artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
6. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego
7. Kopie dokumentów potwierdzających kierownictwo lub udział w grantach
8. Kopie dokumentów potwierdzających staże w zagranicznych jednostkach naukowych
9. Kopie dokumentów potwierdzających współpracę naukową
10. Kopie dokumentów potwierdzających otrzymanie nagród naukowych

Autoreferat

dr n. wet. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk

**Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**

Olsztyn 2025

1. IMIĘ I NAZWISKO

Agnieszka Jasińska-Mikołajczyk

**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE LUB ARTYSTYCZNE –
Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA
ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

- 25.11.2023** Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauk Ekonomicznych
Studia Podyplomowe: Zarządzanie zasobami ludzkimi
- 10.02.2017** Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Stopień naukowy: **doktor nauk weterynaryjnych**
Specjalność: farmakologia weterynaryjna
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Opracowanie i walidacja metody oznaczania tigeocykliny oraz farmakokinetyka tego leku u indyków*
Promotor: prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski,
Recenzenci pracy doktorskiej: prof. dr hab. Cezary Kowalski i prof. dr hab. Andrzej Posyniak
- 22.06.2010** Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii
Tytuł: **magister biotechnologii**
Specjalność: biotechnologia w medycynie weterynaryjnej
- 31.06.2010** Policealne Studium Farmaceutyczne Stopka w Olsztynie
Tytuł: **technik farmaceutyczny**

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH

- 2017 - obecnie** Stanowisko: **Adiunkt**
Jednostka: Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2016 - 2017** Stanowisko: **Asystent**
Jednostka: Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2013 - 2020** Stanowisko: **Technolog/Koordinator systemu zapewniania jakości
w zakresie Dobrej Praktyki Laboratoryjnej**
Jednostka: Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2014 - 2016** Stanowisko: **Kierownik projektu**
Jednostka: Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
- 2011 - 2017** Stanowisko: **Doktorant**
Jednostka: Katedra Farmakologii i Toksykologii, Wydział Medycyny
Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŻN. ZM.)

4.1. Osiągnięcie, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 lit. B Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz 478 z późn. zm), tj. osiągnięcie stanowiące cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Ocena wpływu oklacytynibu, inhibitora kinaz Janusowych, na efektorowe i regulatorowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ – badania w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku oraz mechanizmów immunologicznych leżących u podstaw jego skuteczności klinicznej”

4.1.1. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w poszczególnych publikacjach, jak i w powstaniu tych publikacji

Cykl publikacji stanowiących zgłaszane osiągnięcie obejmuje 4 oryginalne artykuły naukowe opublikowane w latach 2018 – 2024 w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR):

4.1.1.1. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk*, Jerzy J. Jaroszewski, Tomasz Maślanka. *Oclacitinib depletes canine CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro*. Research in Veterinary Science, 2018, 121: 124-129.

Punktacja MNiSW₂₀₁₈ = 35; IF₂₀₁₈ = 1,751

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

4.1.1.2. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk*, Jerzy J. Jaroszewski, Tomasz Maślanka. *Oclacitinib, a Janus kinase inhibitor, reduces the frequency of IL-4- and IL-10-, but not IFN-γ-, producing murine CD4⁺ and CD8⁺ T cells and counteracts the induction of type 1 regulatory T cells*. Molecules, 2021, 26: 1-19.

Punktacja MEiN₂₀₂₁ = 140; IF₂₀₂₁ = 4,927

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

- 4.1.1.3. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk*, Tomasz Maślanka.** *Depletion of T and B cells in lymphoid tissues of mice induced by oclacitinib, a Janus kinase inhibitor.* Polish Journal of Veterinary Sciences, 2023, 26: 431-440.

Punktacja MEiN₂₀₂₃ = 100; IF₂₀₂₃ = 0,800

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

- 4.1.1.4. Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk*, Piotr Socha.** *Treatment with oclacitinib, a Janus kinase inhibitor, down-regulates and up-regulates CD25 and Foxp3 expression, respectively, in peripheral blood T cells of dogs with atopic dermatitis.* BMC Veterinary Research, 2024, 20: 489.

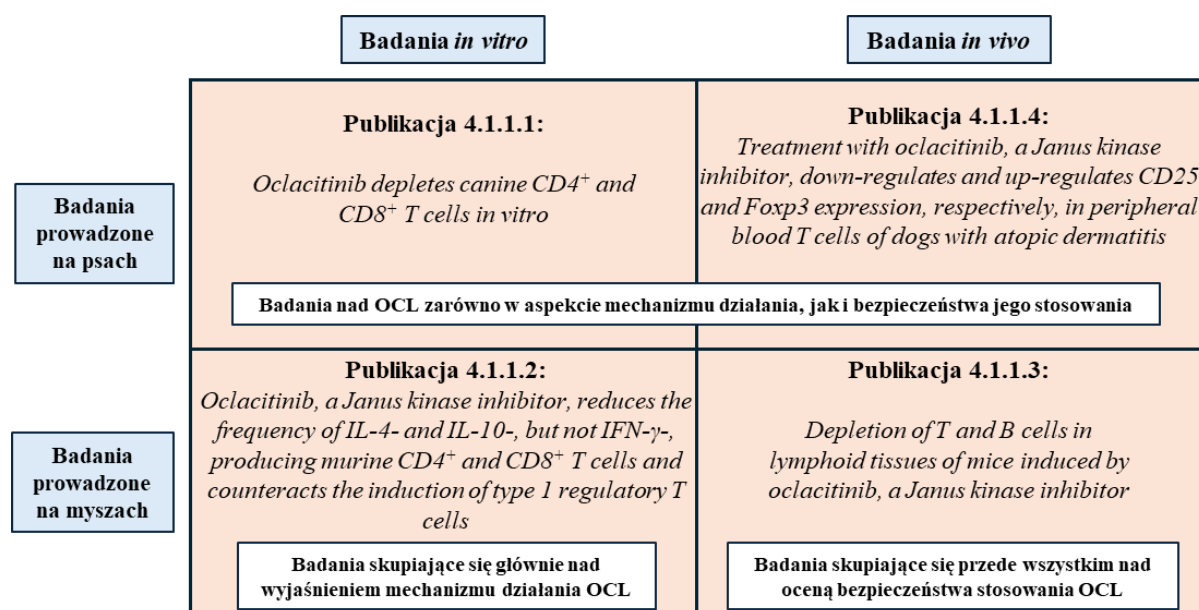
Punktacja MNiSW₂₀₂₃ = 140; IF₂₀₂₃ = 2,300

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków oraz przygotowaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

**autor korespondencyjny*

Wartość ważniejszych parametrów bibliometrycznych przedmiotowego cyklu publikacji:

- ❖ Łączna liczba punktów MNiSW/MEiN to **415** (punktację MNiSW/MEiN podano zgodnie z rokiem publikacji artykułu, tj. według komunikatu MNiSW obowiązującego dla danego roku).
- ❖ Łączny IF to **9,778** (IF podano dla roku, w którym opublikowano pracę. Dla artykułu opublikowanego w roku 2024 podano ostatni ustalony IF, tj. dla roku 2023).
- ❖ Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład powyższego cyklu: **49**, w tym **42** bez autocytowań (wg. Google Scholar).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający główne cele naukowe publikacji wchodzących w skład przedmiotowego osiągnięcia naukowego.

4.1.2. Omówienie osiągnięcia

4.1.2.1. Wprowadzenie

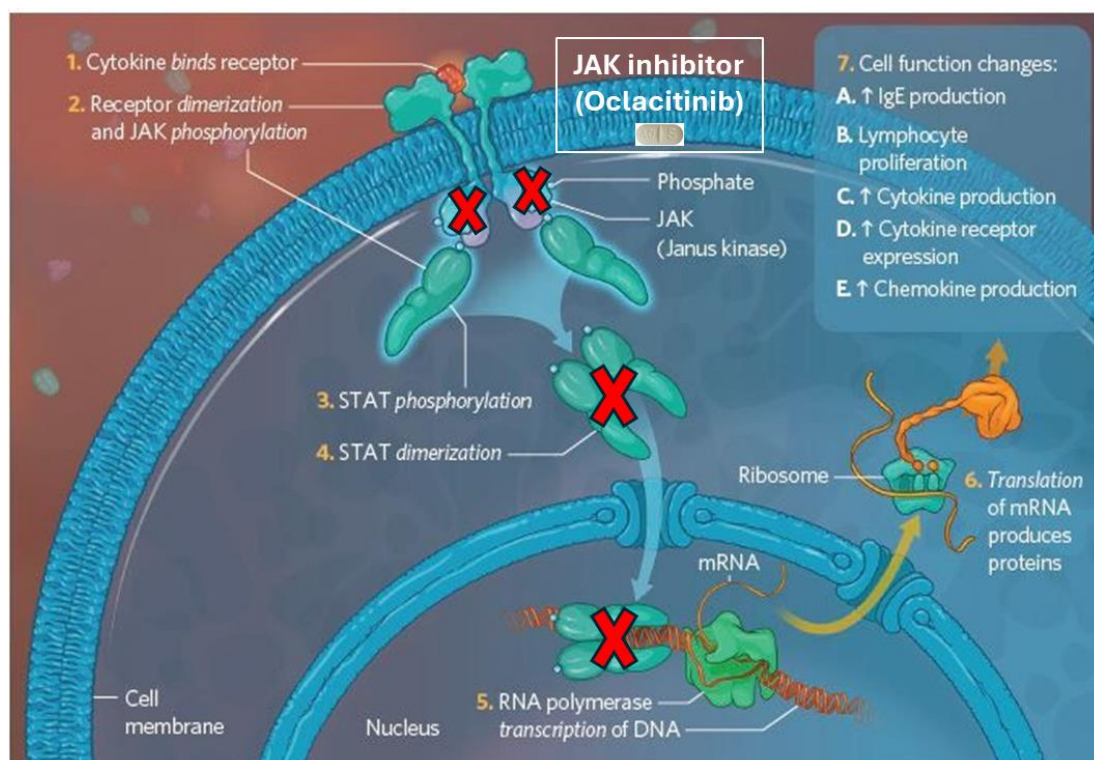
4.1.2.1.1. Ogólna charakterystyka farmakologiczna oklacytynibu

Przedmiotem badań stanowiących niniejsze osiągnięcie naukowe był oklacytynib (OCL), należący do inhibitorów kinaz Janusowych (JAK; Janus kinases). Lek ten został po raz pierwszy zarejestrowany do stosowania u psów w Europie i Stanach Zjednoczonych w 2013 roku w preparacie Apoquel (Zoetis) i obecnie jest to jedyny produkt leczniczy weterynaryjny zawierający OCL (w postaci maleinianu oklacytynibu). OCL klasyfikowany jest zarówno jako lek immunomodulujący [Charakterystyka Weterynaryjnego Produktu Leczniczego (CHPL) Apoquel], jak również immunosupresyjny (US Food and Drug Administration Apoquel Information Summary; FDA Apoquel IS), choć na podstawie danych literaturowych należałoby go klasyfikować jako lek immunomodulujący, wykazujący pewne właściwości immunosupresyjne (Banovic i wsp. 2019; Marsella i wsp. 2023). Wskazania rejestracyjne preparatu zawierającego OCL obejmują leczenie świądu związanego z alergicznym zapaleniem skóry oraz objawów klinicznych atopowego zapalenia skóry (AZS) u psów i jest to lek pierwszego rzutu w terapii tych schorzeń (Aleo i wsp. 2023). OCL wykazuje skuteczność w leczeniu świądu związanego z AZS u psów powyżej dwunastego miesiąca życia i zalecany jest do leczenia przypadków ostrych oraz do zapobiegania nawrotom świądu. Prowadząc

badania kliniczne na 436 psach z AZS Cosgrove i wsp. (2013) zaobserwowali ponad 50% redukcję świądu i zapalenia skóry u ponad 70% leczonych zwierząt już po 7 dniach.

OCL należy do grupy leków będących inhibitorami JAK, a więc inhibitorów ścieżki sygnałowej JAK/STAT (signal transducer and activators of transcriptions; przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji). W szlaku sygnałowym JAK/STAT wyróżnia się trzy kinazy janusowe: JAK1, JAK2, JAK3 i kinazę tyrozynową TYK2 oraz siedem białek sygnałowych: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6. Wykazano, że OCL najsilniej hamuje kinazę JAK1 (1,8 razy silniej niż JAK2 oraz 9,9 razy silniej niż JAK3), stąd badany lek klasyfikowany jest najczęściej jako inhibitor JAK1 (Gonzales i wsp. 2014, Roskoski Jr 2016). Ścieżka sygnałowa JAK/STAT jest plejotropową drogą transdukcji sygnału dla wielu biochemicznych substancji, m.in. cytokin, czynnika wzrostu, leptyny, erytropoetyny czy też interferonów i z jednej strony ścieżka ta jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania m. in. układu immunologicznego, a z drugiej strony stanowi również szlak sygnałowy dla wielu cytokin o działaniu prozapalnym czy proalergicznym, które są zaangażowane w patogenezę wielu chorób alergicznych, autoimmunologicznych i zapalnych, w tym AZS (Igaz i wsp. 2001). W AZS dominującym objawem jest nasilony śwąd skóry, który stanowi ważne kryterium diagnostyczne tej choroby. Jedną z głównych cytokin związanych z występowaniem świądu jest interleukina (IL) 31 (Dillon i wsp. 2004). IL-31 jest cytokiną, która pełni ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej, szczególnie w reakcjach alergicznych i zapalnych skóry. Wykazano, że w odpowiedzi na ekspozycję na alergen lub antygeny bakteryjne u myszy (Dillon i wsp. 2004), ludzi (Cevikbas i wsp. 2014) i psów (Gonzales i wsp. 2016) dochodziło do indukcji produkcji IL-31 przez limfocyty T w skórze. Przyjmuje się, że głównymi producentami IL-31 są limfocyty pomocnicze typu 2 (T helper type 2; Th₂), ale jest ona również produkowana przez limfocyty T CD8⁺, monocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, keratynocyty, eozynofile, bazofile, komórki tuczne i fibroblasty oraz skórne nerwy obwodowe (Nakashima i wsp. 2018). Cytokina ta wiąże się z receptorami IL-31RA i OSMR β i poprzez aktywację szlaku JAK/STAT i PI3K/AKT (kinaza fosfatydylinozytolu 3/kinaza białkowa) napędza kaskadę zapalną (Cornelissen i wsp. 2012a). Ponadto, IL-31 indukuje aktywację szlaku MAPK-JAK/p38 (kinaza białkowa aktywowana mitogenami-kinaza Janus/p38), jak również stymuluje eozynofile do wydzielania znacznych ilości cytokin prozapalnych (IL-1 β i IL-6) oraz chemokin związanych z patofizjologią AZS (CXCL1, CXCL8, CCL2 i CCL18) (Borgia i wsp. 2022). Wyniki badań przeprowadzonych przez Borgia i wsp. (2022) sugerują również, że IL-4 bierze udział w ekspresji receptora dla IL-31, tj. IL-31RA, zwiększając tym samym produkcję

chemokin CCL17 i CCL22 przez komórki dendrytyczne pochodzące ze szpiku kostnego, co dodatkowo napędza oś Th₂. Ponadto, w synergii z IL-33, IL-31 jest również zdolna do indukcji produkcji także innych prozapalnych cytokin i chemokin. Wykazano, że IL-31 utrwała cykl swędzenia/drapania u pacjentów z AZS także poprzez bezpośrednią modulację funkcji keratynocytów, a ponadto, zmniejsza ekspresję filagryny i kładyny-1, upośledzając tym samym funkcję bariery skórnej i zwiększając ekspozycję na antygeny (Cornelissen i wsp. 2012b). W obecności OCL dochodzi do zahamowania kinazy JAK1, co w konsekwencji prowadzi do zablokowania aktywacji kaskady zapalnej szlaku JAK/STAT (nie dochodzi do fosforylacji białek STAT), indukowanej m. in. przez IL-31, u pacjentów cierpiących na AZS, co skutkuje zmniejszeniem aktywności i/lub produkcji tej i innych cytokin odpowiedzialnych za powstawanie świądu i stanu zapalnego. Tak więc, zahamowanie kinazy JAK1 jest odpowiedzialne za działanie przeciwświądowe, przeciwalergiczne oraz przeciwzapalne OCL.



Ryc. 2. Mechanizm działania oklacytynibu, inhibitora kinaz JAK, i jego wpływ na szlak sygnałowy JAK/STAT. Źródło: modyfikacja własna na podstawie: <https://www2.zoetis.co.uk/products-solutions/dogs/apoquel>.

Działanie terapeutyczne leku zaczyna się już po godzinie od podania, stąd OCL określany jest jako lek szybki i skuteczny (Cosgrove i wsp. 2013). Zalecana przez producenta dawka leku

podawanego *per os* wynosi 0,4-0,6 mg/kg masy ciała (m. c.) (CHPL Apoquel), co przekłada się na maksymalne stężenie ($C_{\max}$) OCL w osoczu na poziomie 337 ng/ml (Collard i wsp. 2014). $C_{\max}$ leku osiągnięte w osoczu odpowiada w warunkach *in vitro* stężeniu 1 μM (10^{-6} M) (Banovic i wsp. 2019). Po podaniu leku u psów *per os*, OCL (w postaci maleinianu oklacytynibu) jest szybko i dobrze wchłaniany z przewodu pokarmowego, z czasem osiągnięcia $C_{\max}$ w osoczu krótszym niż 1 godzina (Collard i wsp. 2014). Okres półtrwania OCL wynosi od 4 do 5,9 godzin, zaś jego biodostępność waha się od 79% do 89%. Nie wykazano interakcji leku z pokarmem (Collard i wsp. 2014). Według zaleceń producenta należy początkowo podawać OCL dwa razy dziennie przez 14 dni, natomiast po uzyskaniu efektu leczniczego w postaci redukcji świądu można podawać lek raz dziennie, nawet przez kilka miesięcy.

Badania kliniczne potwierdzają, że lek jest dobrze tolerowany i nie powoduje poważnych działań niepożądanych, nawet w przypadku długotrwałego stosowania. Wśród efektów ubocznych OCL najczęściej zgłaszane są sporadyczne biegunki i wymioty (Cosgrove i wsp. 2013; 2015). Natomiast warto zaznaczyć, że w porównaniu do leczenia cyklosporyną, wymioty występowały u zwierząt otrzymujących OCL 3-krotnie rzadziej (Cosgrove i wsp. 2015, Little i wsp. 2015). Producent preparatu Apoquel w CHPL podaje, że po 16 dniach terapii, u większej niż 1% liczby psów otrzymujących OCL, diagnozowano ropne zapalenia skóry, niespecyficzne guzki skórne, zapalenie ucha, histiocytomę, zapalenie pęcherza moczowego, drożdżakowe zakażenie skóry, *pododermatitis*, łuszczyki, uogólnione powiększenie węzłów chłonnych, nudności, wzmożony apetyt i agresję. Również Denti i wsp. (2022) potwierdzili wystąpienie takich działań niepożądanych jak nużyca, ropne zapalenie skóry i zapalenie ucha u psów długotrwale leczonych OCL (ponad 100 dni). Badano również wpływ leku na parametry biochemiczne, gdzie wykazano, że po podaniu OCL doszło jedynie do spadku średniej liczby leukocytów (nie miało ono jednak postępującego charakteru i dotyczyło wszystkich subpopulacji leukocytów z wyjątkiem limfocytów) oraz podwyższenia średnich wartości cholesterolu w surowicy (Denti i wsp. 2022). Efektywność i bezpieczeństwo OCL (w zakresie wpływu leku na parametry hematologiczne i biochemiczne) zostało potwierdzone w trakcie cztero- (Denti i wsp. 2022) oraz dziewięciomiesięcznej terapii (Herrmann i wsp. 2023). Co ciekawe, skuteczność OCL w redukcji świądu i towarzyszących AZS zmian skórnych była zbliżona do skuteczności stosowania glikokortykosteroidów czy cyklosporyny (Gadeyne i wsp. 2014, Little i wsp. 2015, Gonzales i wsp. 2016).

4.1.2.1.2. Komórki będące przedmiotem badań w kontekście AZS

Jak już wspomniano, OCL jest lekiem zarejestrowanym do leczenia AZS u psów. AZS jest to przewlekła, alergiczna, zapalno-świądowa choroba skóry, w której dochodzi do reakcji nadwrażliwości w stosunku do antygenów środowiskowych i/lub pokarmowych i jest jedną z najczęstszych chorób dermatologicznych diagnozowanych u psów (Hillier & Griffin 2001). Patogeneza AZS jest bardzo złożona i nadal pozostaje nie do końca poznana. Na skutek przenikania drogą przeznaskórkową określonych alergenów środowiskowych lub kontaktu z alergenem pokarmowym w skórze pojawiają się różne populacje komórek zapalnych, następuje aktywacja komórek rezydualnych skóry oraz lokalna produkcja szeregu mediatorów odpowiedzialnych za zapalenie i świąd, w tym wielu cytokin prozapalnych (Banovic i wsp. 2019). Kluczową rolę w mechanizmie immunologicznym w patogenezie AZS odgrywają komórki Langerhansa występujące w naskórku, komórki dendrytyczne obecne w skórze właściwej, immunoglobuliny E (IgE) oraz limfocyty T i B.

W niniejszych badaniach nad mechanizmem i bezpieczeństwem stosowania OCL skupiono się na zbadaniu wpływu leku na wybrane subpopulacje limfocytów T oraz limfocyty B. Tradycyjnie limfocyty T dzieli się na limfocyty T pomocnicze (T helper, Th), limfocyty T cytotoksyczne (T cytotoxic, Tc) oraz limfocyty regulatorowe (T regulatory, Treg):

- Limfocyty Th (tj. pełniące funkcje efektorowe) mają na swojej powierzchni marker białkowy CD4 i modulują odpowiedź immunologiczną na infekcje wirusowe i bakteryjne (Honda i wsp. 2014). Swoiście pobudzony limfocyt Th₀ różnicuje się w kierunku limfocytów Th₁, Th₂ lub Th₁₇. Limfocyty Th₁ wzmacniają immunologiczną odpowiedź komórkową przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym, głównie wirusom, poprzez produkcję takich cytokin prozapalnych jak interferon γ (IFN- γ), czy IL-2. Limfocyty Th₂ z kolei wzmacniają odpowiedź humoralną na patogeny zewnątrzkomórkowe, w tym wielokomórkowe pasożyty, i wydzielają cytokiny IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13, które są czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B. Cytokiny wytwarzane przez Th₁ wpływają ujemnie na rozwój komórek Th₂ i *vice versa*. Limfocyty Th₁₇ wspomagają rozwój odpowiedzi humoralnej przeciw zewnątrzkomórkowym bakteriom, grzybom i pierwotniakom, a główną cytokiną produkowaną przez te limfocyty jest IL-17 (Lückel i wsp. 2020).

Aby dziewicze limfocyty T mogły spełniać swoją funkcję, muszą zostać aktywowane. Kluczowym etapem aktywacji limfocytów T jest indukcja ekspresji cząsteczki CD25 (łańcuch α wchodzący w skład receptora dla IL-2) na ich powierzchni (Liao i wsp. 2013). Cząsteczka CD25 jest więc niezbędna dla właściwej czynności limfocytów efektorowych.

- Limfocyty Tc dzielą się m. in. na limfocyty posiadające na swojej powierzchni marker CD8 (cytotoxic T lymphocytes, CTL), limfocyty T $\gamma\delta$, limfocyty NKT oraz komórki NK i biorą udział w odpowiedzi komórkowej na zakażenia bakteryjne i wirusowe oraz pełnią dominującą rolę w przeciwnowotworowej odpowiedzi komórkowej (Barry & Bleackley 2002). Przedmiotem niniejszych badań były limfocyty CTL, a profil wytwarzanych przez te komórki cytokin można porównać do limfocytów Th. Wśród CTL wyróżnia się limfocyty Tc₁ (produkujące IFN- γ), Tc₂ (produkujące IL-4), Tc₉ (produkujące IL-9) oraz Tc₁₇ (produkujące IL-17).
- Limfocyty Treg (dawniej określane również jako supresorowe) jest to subpopulacja limfocytów T odpowiedzialna za tłumienie zbyt nasilonej lub autoreaktywnej odpowiedzi immunologicznej w sposób swoisty lub nieswoisty dla danego antygeny, jednak nie wywołujący ogólnego upośledzenia odporności (Lin i wsp. 2021). Czynnikiem transkrypcyjnym determinującym funkcję limfocytów Treg jest Foxp3 (skurfina; forkhead box P3) (Wing i wsp. 2019). Mutacje tego czynnika wywołują zespół zaburzenia odporności. Limfocyty Treg zazwyczaj identyfikowane są z fenotypem Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ (Treg CD4⁺) lub Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺ (Treg CD8⁺). Należy jednak zaznaczyć, że fenotyp ten dotyczy komórek ludzkich oraz mysich (Goldstein i wsp. 2016). Na obwodzie limfocyty Treg mogą indukować przekształcenie dziewiczych limfocytów T CD4⁺, rozpoznających te same lub inne od nich antygeny, w obwodowe Treg (indukowalne, iTreg). Oprócz limfocytów regulatorowych zawierających czynnik Foxp3, do tej grupy zalicza się również limfocyty regulatorowe typu 1 (Type one regulatory T cells; Tr₁) o fenotypie CD49b⁺CD223⁺CD4⁺, które pełnią kluczową rolę w hamowaniu reakcji ludzkich limfocytów T na alergenów środowiskowe i ochronie przed chorobami alergicznymi (Chihara i wsp. 2016, Tousa i wsp. 2017).

Mimo biologicznej funkcji, jaką jest wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym, nie ulega wątpliwości, że to właśnie limfocyty T efektorowe CD4⁺ (Teff CD4⁺) i wytwarzane przez nie cytokiny odgrywają również kluczową rolę w patogenezie AZS (i jest to rola promująca rozwój choroby) zarówno u ludzi (Guttman-Yassky i wsp. 2017, Langan i wsp. 2020, Eapen i wsp. 2022), jak i u psów (Olivry i wsp. 1999; 2016, Pucheu-Haston i wsp. 2015, Tamamoto-Mochizuki i wsp. 2024, Eisenschenk i wsp. 2024). Ponadto, nieprawidłowa/niewłaściwa aktywacja tych limfocytów również sprzyja reakcji alergicznej, co może stanowić jeden z elementów patofizjologii AZS (Sowden i wsp. 1992, Beccati i wsp. 2016). Chociaż to limfocyty T CD4⁺ odgrywają

dominującą rolę w patogenezie AZS, istnieją doniesienia potwierdzające, że również limfocyty T CD8⁺ są zaangażowane w powstawanie tej choroby u psów (Olivry i wsp. 1997, Sinke i wsp. 1997, Majewska i wsp. 2016). Kwestia, czy również limfocyty regulatorowe mogą mieć związek z występowaniem AZS u psów nie jest jednak ustalona. Hauck i wsp. (2016), opisali zwiększoną liczbę bezwzględną limfocytów Treg CD4⁺, zaś Majewska i wsp. (2022) wykazali zwiększony odsetek tych limfocytów w krwi obwodowej psów ze zdiagnozowanym AZS. Z kolei Jassies-Van Der Lee i wsp. (2014) wykazali niższy odsetek limfocytów Treg CD8⁺ u psów chorych na AZS w porównaniu do psów zdrowych. Istnieją również doniesienia kliniczne, w których zwiększenie liczebności limfocytów Treg (pełniących funkcję immunosupresyjną), jak również limfocytów Tr₁ (pełniących funkcję ochronną przed alergią), wydaje się być atrakcyjnym celem terapeutycznym leczenia AZS (Keppel i wsp. 2008, Lee i wsp. 2014).

W AZS i innych chorobach alergicznych skóry u ludzi dochodzi do nadmiernej produkcji cytokin przez limfocyty Th₁ (IFN- γ , TNF- α) oraz Th₂ (IL-4, IL-5, IL-13, IL-31), które odgrywają ważną rolę w patogenezie tych chorób (Ong i wsp. 2006, Carmi-Levy i wsp. 2011, Hijnen i wsp. 2013). Z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że również u psów cierpiących z powodu alergicznych chorób skóry dochodzi do dysregulacji produkcji cytokin (Gonzales i wsp. 2016, Arcique & Bajwa 2020). Występowanie AZS u psów związane jest bowiem również, tak jak ma to miejsce u ludzi, z nadmierną produkcją IL-4 (Olivry i wsp. 1999, Nuttall i wsp. 2002) oraz IFN- γ (Nuttall i wsp. 2002, Schlotter i wsp. 2011). Ponadto, Chaudhary i wsp. (2019) potwierdzili również wzrost stężenia IL-17 w krwi psów z AZS. IL-17 produkowana jest przez limfocyty Th₁₇ i jest cytokiną prozapalną, która ułatwia migrację limfocytów T do skóry (Arican i wsp. 2005). Tak więc, powyższe wyniki wyraźnie wskazują na to, że zarówno odpowiedź Th₁-, Th₂-, jak i Th₁₇-zależna przyczynia się do rozwoju AZS u psów. W dostępnej literaturze znajdują się również wyniki badań, w których wykazano zmniejszoną ekspresję IL-10 u ludzi (Koning i wsp. 1997) oraz u psów (Majewska i wsp. 2016, Maeda i wsp. 2007) chorujących na AZS. IL-10 jest to kluczowa cytokina o silnych właściwościach immunosupresyjnych i przeciwzapalnych, która odgrywa supresyjną rolę w AZS i jest zaangażowana w tolerancję obwodowych limfocytów T na alergeny i autoantygeny (Boyman i wsp. 2012). IL-10 jest produkowana przez różne typy komórek odpornościowych, w tym limfocyty Th₂, limfocyty T CD4⁺ Treg, limfocyty Tr₁ oraz przez limfocyty T CD8⁺ (Chen i wsp. 2016). Ponieważ limfocyty Tr₁ odgrywają kluczową rolę w hamowaniu odpowiedzi ludzkich limfocytów T na alergeny środowiskowe oraz ochronie

przed chorobami alergicznymi, mogą stanowić atrakcyjny cel terapeutyczny w leczeniu AZS (Chihara i wsp. 2016, Tousa i wsp. 2017). Wykazano również, że niektóre leki immunosupresyjne generowały limfocyty Tr_1 z naiwnych limfocytów T $CD4^+$ (Barrat i wsp. 2002). Tak więc, regulacja w górę produkcji IL-10 i/lub generowanie indukowanych limfocytów Tr_1 powinno być tożsame z osłabieniem/zahamowaniem rozwoju immunologicznej i zapalnej odpowiedzi w AZS. Biorąc pod uwagę powyższe, IL-4, IL-17, IL-10 oraz IFN- γ , jak również limfocyty Tr_1 należy traktować jako potencjalne cele w nowych strategiach terapii AZS u psów.

Limfocyty B odpowiadają z kolei za humoralną odpowiedź immunologiczną. Główną funkcją tych limfocytów jest produkcja przeciwciał oraz sekrecja cytokin; pełnią one również funkcję komórek prezentujących antygen (Wang i wsp. 2023). Stymulowane antygenem, limfocyty B mogą się różnicować w komórki produkujące przeciwciała lub w limfocyty B pamięci. Według najnowszych doniesień literaturowych również limfocyty B są zaangażowane w patofizjologię AZS u psów (Majewska i wsp. 2022). Zaburzenie równowagi pomiędzy limfocytami Th_1 i Th_2 (co ma miejsce w AZS zarówno u ludzi, jak i u psów) prowadzi bowiem do aktywacji limfocytów B, które zaczynają produkować IgE, co w konsekwencji prowadzi do degranulacji mastocytów i uwolnienia mediatorów stanu zapalnego (Majewska i wsp. 2022).

Oprócz limfocytów T i B, również inne subpopulacje leukocytów biorą udział zarówno w odpowiedzi immunologicznej (pełniąc funkcje fizjologiczne), jak również w patofizjologii AZS. Zarówno eozynofile, jak i bazofile pełnią różne funkcje w reakcjach zapalnych oraz obronie przed różnymi patogenami, a ich liczba bezwzględna w krwi obwodowej i w niektórych tkankach zwiększa się również podczas infekcji pasożytniczych (Wada i wsp. 2010, Weller & Spencer 2017, Ramirez i wsp. 2018). Z drugiej jednak strony eozynofile i bazofile pełnią również kluczową rolę w patofizjologii chorób alergicznych (Plager i wsp. 2012). Kilka alergicznych chorób dermatologicznych, w tym AZS, jest związanych z występowaniem eozynofilii (w krwi obwodowej i w tkankach) (Stosović & Bogić 1998, Ramirez i wsp. 2018). U pacjentów chorujących na AZS wykazano również, że za nadmierną produkcję histaminy oraz innych eikozanoidów odpowiadały bazofile (James i wsp. 1993). Ponadto, Hashimoto i wsp. (2023) potwierdzili, że bazofile pełnią wiodącą rolę w patogenezie świądu w AZS.

4.1.2.2. Cele naukowe/podjęte problemy badawcze i uzasadnienie badań

Cel nr 1

Zbadanie wpływu OCL na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku u psów, tj. w kontekście możliwości jego negatywnego oddziaływania na te komórki. Cel ten można także zdefiniować jako ustalenie możliwości, mechanizmów i skali negatywnego wpływu OCL na limfocyty T, a więc kluczowe komórki zaangażowane w kształtowanie i utrzymywanie prawidłowej swoistej odporności komórkowej.

Implikacja kliniczna związana z realizacją tego celu

Uzyskanie nowych, oryginalnych danych dotyczących oceny bezpieczeństwa stosowania OCL u psów i innych zwierząt, które umożliwią ocenę współczynnika korzyści do ryzyka stosowania leku u pacjentów, szczególnie tych, u których stwierdzono infekcję bakteryjną czy wirusową.

Tło i uzasadnienie badań związanych z realizacją tego celu

W ciągu ostatniej dekady Apoquel zrewolucjonizował krajobraz dermatologii psów zapewniając lekarzom weterynarii nową możliwość leczenia alergicznego zapalenia skóry i AZS, stanowiąc jednocześnie bezpieczniejszą opcję leczniczą niż steroidowe leki przeciwzapalne, których stosowanie obarczone jest poważnymi działaniami niepożądanymi. Efekt immunosupresyjny wywołany podawaniem leku immunomodulującego lub immunosupresyjnego ma zawsze dwa oblicza - stanowi tzw. „miecz obosieczny”. Z jednej strony efekt immunosupresyjny warunkuje skuteczność kliniczną leku, jako że odpowiada za przerywanie/hamowanie patogenezę chorób alergicznych i/lub eliminuje/ogranicza jej objawy, ale z drugiej strony działanie immunosupresyjne zwiększa podatność pacjentów na infekcje bakteryjne, wirusowe czy pasożytnicze w trakcie leczenia. Mimo, iż OCL jest stosowany w medycynie weterynaryjnej od 10 lat i uznaje się go za lek bezpieczny, jego wpływ na układ immunologiczny w aspekcie działania niepożądanego, przed podjęciem niniejszych badań, był, o ile w ogóle, śladowo poznany. Według producenta, OCL poprzez immunomodulujące działanie może zwiększać podatność na zakażenia i zaostrzać choroby nowotworowe (CHPL Apoquel). Dlatego psy otrzymujące lek powinny być monitorowane pod kątem rozwoju stanów zapalnych i chorób nowotworowych (CHPL Apoquel). Ponadto, badania bezpieczeństwa przeprowadzone na psach otrzymujących duże dawki OCL dostarczyły klinicznych dowodów na immunosupresję, w tym na wystąpienie działań niepożądanych w postaci bakteryjnego zapalenia płuc i uogólnionych zakażeń świerzbem wywołanym przez nużeńce (FDA Apoquel IS). Co więcej, bardzo częstym skutkiem ubocznym stosowania OCL jest piodermia, czyli

ropne bakteryjne zakażenie skóry (CHPL Apoquel, Hillier i wsp 2014, Bajwa 2016). Informacja w CHPL preparatu Apoquel i powyższe dane wskazują, że OCL może wywierać działanie immunosupresyjne w rozumieniu działania niepożądanego usposabiającego do zakażeń bakteryjnych i inwazji pasożytniczych. W dostępnej literaturze brak jest danych na temat wpływu OCL na prawidłowe limfocyty T i B w narządach limfatycznych i krwi obwodowej psów, bądź innych zwierząt. Generalnie przed podjęciem niniejszych badań stan wiedzy w tym zakresie sprowadzał się do wyników badań dotyczących wpływu OCL wyłącznie na odsetek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi psów z AZS (De Caro Martins i wsp. 2022; Denti i wsp. 2022). De Caro Martins i wsp. (2022) wykazali, że długotrwałe podawanie OCL prowadziło do wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺, ale nie CD8⁺, w krwi obwodowej psów z AZS. W CHPL Apoquel producent twierdzi, że podawanie OCL nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów w krwi obwodowej psów. Również Denti i wsp. (2022) nie zanotowali żadnego wpływu OCL na liczbę bezwzględną całkowitej subpopulacji limfocytów w krwi obwodowej u psów chorych na AZS. Należy jednak zaznaczyć, że brak wpływu określonej substancji na liczbę bezwzględną limfocytów w krwi obwodowej nie musi jednocześnie oznaczać, że lek nie ma wpływu na liczebność tych komórek w narządach limfatycznych.

Jeżeli chodzi o stan wiedzy na temat wpływu OCL na produkcję cytokin, to przegląd literatury wskazuje, że przed rozpoczęciem badań stanowiących niniejsze osiągnięcie naukowe dostępne były jedynie dwa doniesienia naukowe dotyczące tego tematu. W pracach tych stwierdzono, że w warunkach *in vitro*: (a) ekspozycja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (Peripheral Blood Mononuclear cells; PBMCs) na OCL w stężeniu odzwierciedlającym stężenie uzyskiwane przy stosowaniu dawek terapeutycznych prowadziła do zahamowania produkcji IL-2 (Gonzales i wsp. 2014); (b) ekspozycja PBMCs na OCL w stężeniu 40 nM prowadziła do obniżenia produkcji IL-31, nie wpływając jednak na produkcję IFN- γ i IL-4 (Rugg i wsp. 2014).

Podsumowując, przed podjęciem niniejszych badań istniała istotna luka w wiedzy w zakresie badań eksperymentalnych (nie wspominając już o badaniach klinicznych), które oceniałyby wpływ OCL na liczbę bezwzględną limfocytów T oraz B w tkankach limfoidalnych u zwierząt i ludzi. W dostępnej literaturze brak było danych oceniających wpływ OCL na całkowitą liczbę bezwzględną limfocytów T i B, jak również liczbę bezwzględną poszczególnych subpopulacji limfocytów T w węzłach chłonnych, śledzionie oraz w krwi obwodowej u ludzi i zwierząt.

Biorąc pod uwagę powyższe, pierwszym celem niniejszych badań było zbadanie wpływu OCL na liczebność limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku u psów, tj. w kontekście możliwości, mechanizmów i skali negatywnego wpływu OCL na limfocyty T, a więc kluczowe komórki zaangażowane w kształtowanie i utrzymywanie prawidłowej swoistej odporności komórkowej. W jednych z badań oceniano również wpływ na liczebność limfocytów B, jakkolwiek nie był to wiodący cel niniejszych badań.

W pierwszych badaniach *in vitro* poświęconych m.in. temu zagadnieniu, wykazano, że OCL może wykazywać efekt deplecyjny wobec psich limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (praca 4.1.1.1.). W związku z tym, postawiono hipotezę, że OCL może doprowadzać do spadku liczebności tych limfocytów, jak również limfocytów B, w tkankach limfoidalnych oraz w krwi obwodowej. Zważywszy na kluczowe znaczenie limfocytów T i B w efektywnej odpowiedzi immunologicznej na patogeny, za stosowne uznano zweryfikowanie tej hipotezy. Z przyczyn etycznych niemożliwe było przeprowadzenie tego typu eksperymentu z użyciem tkanek limfoidalnych czy wątroby pozyskanych od psów, stąd badania te przeprowadzono na myszach, a więc na typowym gatunku wykorzystywanym w badaniach immunologicznych (praca 4.1.1.3.). Badania te wykazały, że OCL obniżał liczbę bezwzględną limfocytów T w tkankach limfoidalnych. Wyniki obu przeprowadzonych badań wyraźnie sugerują, że leczenie ASZ u psów za pomocą OCL może wiązać się z obniżeniem liczebności limfocytów T u tych pacjentów. Dlatego też kolejnym etapem prowadzonych badań była weryfikacja uzyskanych wyników w warunkach klinicznych, tj. zbadanie liczebności limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi obwodowej psów chorujących na AZS leczonych OCL. Badania z tego zakresu tematycznego omawianego osiągnięcia dostarczyły nowych, oryginalnych danych dotyczących bezpieczeństwa stosowania OCL u psów, co z kolei może pomóc w ocenie współczynnika korzyści do ryzyka stosowania tego leku o właściwościach immunosupresyjnych u pacjentów, szczególnie u tych cierpiących na infekcje bakteryjne i wirusowe.

Cel nr 2

Ocena wpływu OCL na regulatorowe i efektorowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w aspekcie ich zaangażowania w mechanizmy immunologiczne leżące u podstaw skuteczności klinicznej leku. Realizacja tego celu z zasady ma znaczenie poznawcze, ale również niesie pewne możliwości aplikacyjne.

Implikacja kliniczna związana z realizacją tego celu

Ustalenie wpływu OCL na liczebność, apoptozę oraz proliferację limfocytów T (ze szczególnym uwzględnieniem subpopulacji limfocytów T CD4⁺) oraz zdolność do produkcji

przez nie ważnych cytokin może rzucać światło na możliwości zastosowania tego leku w leczeniu innych chorób niż te, stanowiące wskazania rejestracyjne do jego stosowania.

Tło i uzasadnienie badań związanych z realizacją tego celu

Ustalenie wpływu OCL na liczebność, apoptozę oraz proliferację limfocytów T oraz zdolność do produkcji przez nie ważnych cytokin może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale może również rzucać światło na możliwość zastosowania tego leku w leczeniu innych chorób niż te, stanowiące wskazania rejestracyjne do jego stosowania. Konfrontując rolę i zaangażowanie limfocytów Th₁, Th₂, Th₁₇, Treg CD4⁺ oraz Tr₁, produkcję IL-10 przez limfocyty T CD4⁺, jak również znaczenie procesu regulacji w górę cząsteczki CD25 w procesie aktywacji limfocytów T i proliferacji tych komórek w etiopatogenezie chorób alergicznych i autoimmunologicznych z ustaleniem tego, jak na te komórki i procesy wpływa OCL, uzyskane wyniki rzucają światło na kwestię potencjału terapeutycznego leku w leczeniu innych chorób alergicznych niż AZS. Dziś, kiedy znamy już bardzo dobrze poszczególne ogniwa w łańcuchu patogenezy chorób alergicznych i autoimmunologicznych, w przypadku niepowodzenia terapeutycznego/braku oczekiwanej odpowiedzi na leczenie konwencjonalne tego rodzaju chorób (tj. po wyczerpaniu możliwości leczniczych wskazanych w stosownych wytycznych), lekarze zmuszeni są wdrażać inne opcje lecznicze i sięgać po leki, które wg. literatury mogą hamować/blokować ogniwo/ogniwa patogenezy danej choroby, a więc mieć potencjał do jej leczenia, ale nie zostały zarejestrowane do leczenia tej choroby. Stosowanie w leczeniu chorób alergicznych i autoimmunologicznych u psów i kotów leków immunomodulujących lub immunosupresyjnych w trybie pozarejestracyjnym (tzw. extra-label lub off label use) nie jest rzadkością, bowiem częstotliwość występowania tych chorób u tej grupy pacjentów z roku na rok narasta, stanowiąc coraz większy problem i wyzwanie dla lekarzy weterynarii, a typowe sposoby ich leczenia nie są zawsze skuteczne lub ich skuteczność jest niewystarczająca. Wyniki kilku badań klinicznych (ClinicalTrials.gov) i eksperymentalnych (Georas i wsp. 2021, Kravčenia & Maślanka 2024) wskazują, że inhibitory JAK wykazują wysoki potencjał terapeutyczny w leczeniu astmy alergicznej. Należy zauważyć, że hamowanie/blokowanie szlaku sygnałowego JAK/STAT zaczęło być wdrażane jako nowa strategia terapeutyczna w leczeniu niektórych chorób autoimmunologicznych. W 2011 roku FDA zatwierdziła do użytku pierwszy inhibitor JAK, ruxolitynib, zarejestrowany do leczenia pierwotnego włóknienia szpiku (Coricello i wsp. 2020). Rok później zarejestrowano tofacytynib do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów (Coricello i wsp. 2020); w ciągu ostatnich lat jego zastosowanie kliniczne zostało poszerzone o łuszczykowe zapalenie stawów, wrzodziejące

zapalenie jelita grubego, łysienie plackowate i młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów o przebiegu wielostawowym (Lv i wsp. 2024). W 2017 roku FDA zarejestrowała baricytinib, a jego wskazanie kliniczne obejmuje reumatoidalne zapalenie stawów (Markham 2017). Kolejne trzy inhibitory JAK zostały zarejestrowane w 2019 roku: federatynib do leczenia mielofibrozy (Blair 2019) oraz upadacytinib i peficytinib do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów (Duggan & Keam 2019, Markham & Keam 2019). W 2020 zarejestrowano filgotynib, a jego wskazania rejestracyjne również obejmują leczenie reumatoidalnego zapalenia stawów (Dhillon & Keam 2020).

Kwestia interpretacji wyników w aspekcie ich odniesienia do OCL jako konkretnej substancji czynnej lub jako narzędzia do blokady JAK1

Z ostrożności naukowej, uzasadnionej niżej, w niniejszych badaniach oba cele zasadniczo odnoszą się do konkretnej substancji czynnej, czyli do OCL. Niezależnie od tego, obydwie cele mogą być rozpatrywane przez wielu naukowców szerzej, tj. nie tylko jako badanie/ocena wpływu OCL jako takiego na limfocyty T, ale również jako badanie/ocena wpływu selektywnej blokady JAK1 na te komórki; w tym drugim ujęciu OCL byłby traktowany jako narzędzie do oceny następstw wpływu selektywnej blokady JAK1 na limfocyty T. Jednakże zdecydowano, aby wyniki uzyskane w toku niniejszych badań odnosić do OCL jako takiego, a nie w sposób szeroki, tj. odnoszący się w sposób uniwersalny do następstw blokady JAK1 (tak to przedstawiono w artykułach wchodzących w skład omawianego osiągnięcia, jak i w niniejszym opracowaniu). Uczyniono tak z ostrożności naukowej, ponieważ:

- 1) OCL nie jest „czystym” selektywnym inhibitorem JAK1, gdyż ma także pewne działanie hamujące JAK2 i JAK3, a co się z tym wiąże, może wywoływać efekty związane z blokadą tych dwóch kinaz, co, przy szerszej interpretacji, mogłoby być mylnie przypisywane efektowi blokady JAK1.
- 2) Jest wiele przykładów w immunofarmakologii, wskazujących, że substancje wpływające na identyczny cel terapeutyczny (tj. mając ten sam punkt uchwytu w danym szlaku sygnalizacyjnym, enzymatycznym itp.), nie wykazują tożsamego wpływu na poszczególne komórki immunokompetentne i ich funkcję, co może być związane z różnicami w budowie tych związków, która ma wpływ na ich biotransformację i możliwość wpływania na inne punkty uchwytu.

4.1.2.3. Zadania badawcze i powiązane z nimi hipotezy

Zadanie badawcze nr 1: Ocena wpływu OCL na odsetek i liczebność bezwzględną całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺

Jak już wspomniano, według producenta weterynaryjnego produktu leczniczego zawierającego OCL, stosowanie leku może wiązać się ze zwiększeniem podatności na zakażenia i zaostrzać choroby nowotworowe. Inne źródła potwierdziły, że u psów przyjmujących wyższe dawki OCL pojawiały się kliniczne objawy immunosupresji, m.in. ciężko przebiegające zapalenia płuc (FDA Apoquel IS). Ponadto, stosowanie leku u psów pozostawało w łączności z występowaniem bakteryjnego zapalenia skóry (Hillier i wsp. 2014, Bajwa 2016). Niestety, jak dotąd nie były poznane mechanizmy immunologiczne stojące za immunosupresją związaną ze stosowaniem OCL, a ich naświetlenie jest istotą pierwszego celu badań stanowiących niniejsze osiągnięcie. Biorąc pod uwagę opisywane infekcje bakteryjne i inwazje pierwotniacze stanowiące powikłanie stosowania leku oraz rolę limfocytów T w ich zapobieganiu i zwalczaniu, postawiono hipotezę, że efekt immunosupresyjny stojący za występowaniem tego rodzaju zakażeń, może być związany z negatywnym wpływem OCL na liczebność limfocytów T. W dostępnej literaturze brak było danych na temat wpływu OCL na odsetek i liczebność bezwzględną limfocytów T i B w narządach limfatycznych i liczebność bezwzględną tych komórek w krwi obwodowej u jakichkolwiek zwierząt. Generalnie przed podjęciem niniejszych badań cały stan wiedzy w tym temacie sprowadzał się do wyników badań dotyczących wpływu OCL wyłącznie na odsetek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi psów z AZS (De Caro Martins i wsp. 2022; Denti i wsp. 2022). Dlatego też, kluczowym elementem realizacji pierwszego celu niniejszych badań, było określenie wpływu leku na odsetek i liczbę bezwzględną tych komórek. W pierwszych badaniach przedstawionych w przedmiotowym osiągnięciu (publikacja 4.1.1.1.) wykazano, że ekspozycja psich PBMCs na OCL spowodowała głęboki ubytek zarówno limfocytów T CD4⁺, jak i CD8⁺, a efekt ten połączono z proapoptotycznym działaniem leku wobec tych komórek, co również zostało stwierdzone w tych badaniach. Wyniki te potwierdziły wstępnie zasadność postawionej hipotezy i stanowiły uzasadnienie do przeprowadzenia badań *in vivo*. W jednym z etapów badań *in vivo* oceniono wpływ stosowania leku na odsetek i liczebność bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi obwodowej psów chorujących na AZS i leczonych OCL. Zaletą tego rodzaju badań jest to, że były prowadzone na gatunku docelowym (w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku) i do tego w warunkach klinicznych, jednak ich istotnym ograniczeniem było to, że z konieczności dotyczyły one tylko oceny wpływu stosowania leku na liczebność

limfocytów wyłącznie w krwi. Niestety, dobrze wiadomo, że wyniki dotyczące wpływu ksenobiotyku lub braku takiego wpływu na limfocyty w krwi obwodowej, nie odzwierciedlają tego, jaki wpływ ma ten lek na liczebność tych komórek w narządach limfatycznych lub nawet rozmiągają się z tymi wynikami. Dlatego też dla pełnego, ale i na miarę możliwości pewnego ustalenia wpływu OCL na liczebność limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, konieczne było również przeprowadzenie badań określających wpływ stosowania leku na liczebność względną i bezwzględną tych komórek, a niejako „przy okazji” także limfocytów B, w narządach limfatycznych i krwi obwodowej. Aby uzyskać miarodajne wyniki, takie badanie powinno dotyczyć ustalenia wpływu leku na liczebność komórek w całym narządzie, co się wiąże z uśmierceniem zwierząt użytych do badań. Stąd też, niemożliwe było przeprowadzenie tego etapu badań z użyciem gatunku docelowego, któremu poświęcone są niniejsze badania. W związku z tym z konieczności przeprowadzono je z użyciem myszy jako typowych zwierząt doświadczalnych używanych w badaniach immunologicznych.

Podsumowując, w celu zweryfikowania opisanej wyżej hipotezy, przeprowadzono trzy etapy badań, których celami szczegółowymi była ocena wpływu OCL na odsetek i liczbę bezwzględną całych populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ za pomocą cytometrii przepływowej:

- a) w warunkach *in vitro*; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL i ocenie w/w parametrów po 48 godz. i 120 godz. hodowli;
- b) w warunkach eksperymentalnych *in vivo*; badania te polegały na ocenie w/w parametrów (i dodatkowo odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów CD19⁺, czyli B) w krwi obwodowej, śledzionie i węzłach chłonnych u myszy otrzymujących przez 14 dni OCL;
- c) w warunkach klinicznych; badania te polegały na ocenie w/w parametrów u psów chorych na AZS i leczonych OCL w dniu 0, 7, 14 i 28 stosowania leku.

Zadanie badawcze nr 2: Ocena wpływu OCL na apoptozę i proliferację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺

Przed podjęciem niniejszych badań w dostępnej literaturze brak było danych o wpływie OCL na apoptozę i proliferację limfocytów T, ale można było znaleźć dane wskazujące, że inhibitory kinazy JAK mogą wywierać działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne. Wykazano, że WHI-P131, inhibitor JAK3, indukował apoptozę limfocytów T CD4⁺ (Cetkovic-Cvrlje i wsp. 2012), z kolei WHI-P154 i AG490, tj. inne inhibitory tej kinazy, indukowały apoptozę chłoniaka anaplastycznego (Amin i wsp. 2003). Ponadto, Lee i wsp. (2018) wykazali, że ruxolitynib, inhibitor JAK1 i JAK2, zwiększał apoptozę komórek linii chłoniaka. Biorąc to

pod uwagę, oraz fakt, że w pierwszych badaniach przedstawionych w przedmiotowym osiągnięciu (publikacja 4.1.1.1.) stwierdzono, że ekspozycja psich PBMCs na OCL przy braku stymulacji (a więc w warunkach, kiedy limfocyty praktycznie nie proliferują) powodowała bardzo duży ubytek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, postawiono hipotezę badawczą zakładającą, że OCL może wywierać działanie proapoptotyczne wobec tych komórek.

Z dużym uproszczeniem można stwierdzić, że szlak JAK/STAT stanowi pro-proliferacyjną ścieżkę sygnalizacyjną (choć wpływ na proliferację zależy od typu kinazy JAK i białka STAT). Wykazano, że niektóre inhibitory JAK wykazywały antyproliferacyjny efekt wobec limfocytów T (Ito i wsp. 2017, Reddig i wsp. 2021). Dlatego logiczne i uzasadnione, szczególnie w świetle celów niniejszych badań, było postawienie i zweryfikowanie hipotezy, że OCL może wywierać działanie antyproliferacyjne wobec limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. Prawidłowa funkcja i prawidłowy przebieg procesu proliferacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w odpowiedzi na określone patogeny są niezbędne do skutecznej odpowiedzi immunologicznej wobec tych patogenów. Z drugiej strony, limfocyty efektorowe (Teff) CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w patogenezie AZS (jak i innych chorób alergicznych), co stanowi powszechną wiedzę w odniesieniu do patogeny tej choroby u ludzi, ale co również zostało dowiedzione, szczególnie w ostatnich latach, również w odniesieniu do rozwoju AZS u psów, co zostało wcześniej omówione. Dlatego też ustalenie, czy OCL może mieć działanie proapoptotyczne i antyproliferacyjne wpisuje się ściśle w realizację zarówno pierwszego celu niniejszych badań, czyli oceny wpływu OCL na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku u psów, a więc w kontekście możliwości jego negatywnego oddziaływania na te komórki, jak i drugiego celu tych badań, a więc oceny wpływu OCL na Teff i Treg CD4⁺ w aspekcie ich zaangażowania w mechanizmy immunologiczne odpowiedzialne za skuteczność kliniczną leku. Biorąc bowiem pod uwagę rolę limfocytów Teff CD4⁺ w patogenezie AZS, wykazanie wpływu proapoptotycznego i/lub antyproliferacyjnego wobec tych limfocytów mogłoby być rozpatrywane jako kolejna składowa mechanizmu odpowiedzialnego za skuteczność kliniczną OCL w terapii AZS.

W związku z tym kolejnymi celami szczegółowymi niniejszych badań było określenie, za pomocą cytometrii przepływowej, wpływu OCL na:

- a) odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, a więc komórek o fenotypach Annexin⁺7AAD⁻CD4⁺ i Annexin⁺7AAD⁻CD8⁺; badania te polegały na 12 godzinnej ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL bez towarzyszącej aktywacji limfocytów (a więc przy braku ich proliferacji);

- b) odsetek proliferujących limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$, a więc komórek o fenotypach 5-bromo-2'deoksyurydyna (BrdU) $^+$ $CD4^+$ oraz BrdU $^+$ $CD8^+$; badania te polegały na 72 godz. ekspozycji komórek jednojądrzastych ze śledziony myszy na OCL z towarzyszącą stymulacją limfocytów. Badania te zostały przeprowadzone z użyciem limfocytów myszy z uwagi na to, że brak jest na rynku odpowiednich odczynników (tj. przeciwciał i IL-2) specyficznych dla psa, niezbędnych do skutecznej stymulacji proliferacji limfocytów T, a tym samym do optymalnej realizacji tego celu szczegółowego.

Zadanie badawcze nr 3: Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów regulatorowych z populacji limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$

Jak już wspomniano, limfocyty Treg $CD4^+$ i $CD8^+$ są odpowiedzialne za tłumienie (wyciszanie) zbyt nasilonej odpowiedzi immunologicznej, a kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie tych limfocytów i jednocześnie nadającym im właściwości supresorowe jest czynnik transkrypcyjny Foxp3 (Workman i wsp. 2009). Szlak sygnalizacyjny JAK3/STAT5 odgrywa istotną rolę w powstawaniu i utrzymywaniu czynnika Foxp3 w komórkach Treg $CD4^+$ (Goldstein i wsp. 2016). Zważywszy na fakt, że OCL jest również inhibitorem kinazy JAK3 (choć hamuje ją ok. 10 razy słabiej niż JAK1), postawiono hipotezę, że zahamowanie JAK3 przez OCL może regulować w dół ekspresję Foxp3 w psich limfocytach Treg $CD4^+$ i $CD8^+$, tym samym powodując ubytek tych limfocytów. Taki efekt należałoby rozważać w kontekście działania niepożądanego leku, szczególnie u pacjentów z chorobami o podłożu alergicznym, gdyż limfocyty Treg odpowiadają za hamowanie odpowiedzi układu immunologicznego w chorobach alergicznych i autoimmunologicznych. W związku z tym za uzasadnione uznano zweryfikowanie powyższej hipotezy. W pierwszych badaniach poświęconych temu zagadnieniu hipoteza ta została zweryfikowana negatywnie w odniesieniu do oceny wpływu OCL na ekspresję Foxp3 w limfocytach T $CD4^+$ i $CD8^+$ w hodowlach niestymulowanych, tj. w odniesieniu do komórek nie poddanych aktywacji. Niemniej jednak, wyniki kolejnych badań *in vitro* wykazały, że w warunkach aktywacji limfocytów (tj. z towarzyszącą stymulacją limfocytów) OCL paradoksalnie regulował w górę ekspresję Foxp3 w psich limfocytach T $CD4^+$ i $CD8^+$. Ustalenie to miało duże znaczenie, bowiem wyniki niektórych badań sugerują, że generowanie limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ wykazujących ekspresję Foxp3 (tj. iTreg) reprezentuje nowe, obiecujące podejście terapeutyczne leczenia chorób o podłożu alergicznym, w tym AZS (Keppel i wsp. 2008, Agrawal i wsp. 2011, Fyhrquist i wsp. 2012). W związku z tym uznano za celowe, aby

w warunkach klinicznych, tj. u pacjentów chorujących na AZS, zbadać wpływ leku na ekspresję Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ oraz na liczebność bezwzględna limfocytów T Foxp3⁺CD4⁺ oraz Foxp3⁺CD8⁺, a przez to rzucić światło na kwestię tego czy generowanie limfocytów iTreg CD4⁺ i CD8⁺ może stanowić dodatkowy mechanizm (tj. niezależny od hamowania szlaku JAK/STAT) warunkujący efekt immunomodulujący/immunosupresyjny OCL.

Podsumowując, w celu zweryfikowania w/w hipotez przeprowadzono trzy następujące po sobie etapy badań, których celami szczegółowymi była ocena za pomocą cytometrii przepływowej wpływu OCL na odsetek i liczbę bezwzględna limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję Foxp3:

- a) w warunkach *in vitro* bez towarzyszącej aktywacji limfocytów; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL (hodowla 48 godz. i 120 godz.);
- b) w warunkach *in vitro* z towarzyszącą aktywacją limfocytów; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL z towarzyszącą stymulacją (hodowla 24 godz.);
- c) w warunkach klinicznych; badania te polegały na ocenie w/w parametrów u psów chorych na AZS i leczonych OCL (ocena w dniu 0, 7, 14 i 28 podawania leku).

Zadanie badawcze nr 4: Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów efektorowych z populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz na konstytutywną i indukowaną ekspresję cząsteczki CD25 na tych komórkach

Istnieją trzy rodzaje łańcuchów wchodzących/mogących wchodzić w skład receptora dla IL-2 (IL-2R), tj. łańcuch α (IL-2 α , CD25), β (IL-2 β , CD122) i γ (IL-2 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 i wsp. 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 i wsp. 2013). Tak więc indukcja ekspresji CD25 na limfocytach

T jest równoznaczna z posiadaniem przez nie receptora o wysokim powinowactwie dla tej cytokiny, a tym samym nadaje komórce zdolność do intensywnego wychwytu IL-2 ze środowiska, a tym samym do zwiększonej responsywności na działanie tej cytokiny. Powiązanie IL-2 z receptorem o wysokim powinowactwie (CD25⁺CD122⁺CD132⁺) prowadzi do aktywacji i proliferacji limfocytów T i do ich różnicowania w odpowiednie subpopulacje limfocytów Teff i pamięci (Liao i wsp. 2013). Regulacja w dół ekspresji CD25 na limfocytach Teff sprawia, że nie reagują one na IL-2, co może ograniczać autokrynne i parakrynne funkcje zależne od IL-2, w tym aktywność limfocytów Th i Tc, a przede wszystkim proliferację limfocytów T (Cabrera i wsp. 2010). Tak więc, zarówno przeciwdziałanie indukcji ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach Teff w toku ich aktywacji, jak i regulacja w dół już wyindukowanej aktywacją ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach Teff prowadzi do upośledzenia proliferacji i różnicowania tych komórek. Tym samym dochodzi do hamowania odpowiedzi immunologicznej, stąd taki kierunek działania leku należy uznać za działanie immunosupresyjne.

Wiadomo, że u ludzi chorujących na AZS notuje się podwyższoną liczbę aktywowanych limfocytów T CD4⁺ (konkretnie zwiększoną liczbę limfocytów T o fenotypie CD25⁺CD4⁺) w krwi obwodowej (Sowden i wsp. 1992, Walker i wsp. 1993). Również u psów cierpiących na AZS stwierdzono w krwi zwiększenie liczby limfocytów o takim fenotypie (Majewska i wsp. 2022). Przed podjęciem niniejszych badań w dostępnej literaturze brak było jakichkolwiek doniesień na temat wpływu OCL na ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T bądź innego markera aktywacji limfocytów T. Tym niemniej, wykazano, zarówno w badaniach *in vivo* jak i *in vitro*, że inny inhibitor szlaku sygnalizacyjnego JAK/STAT, tj. ruxolitynib (inhibitor kinaz JAK1 i JAK2), hamował aktywację i różnicowanie ludzkich limfocytów T CD4⁺ (Parampalli Yajnanarayana i wsp. 2015). W świetle tego postawiono hipotezę badawczą, że OCL może regulować w dół ekspresję cząsteczki CD25 na powierzchni limfocytów Teff CD4⁺ i w ten sposób upośledzać aktywację tych komórek i powiązaną z tym odpowiedź immunologiczną. Pozytywna weryfikacja tej hipotezy pozwoliłaby odpowiedzieć na pytanie, czy działanie to stanowi jeden z mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za przeciwalergiczne działanie leku. Stąd też kolejnym zadaniem badawczym było zweryfikowanie tej hipotezy. W tym celu przeprowadzono trzy następujące po sobie etapy badań, których celami szczegółowymi była ocena za pomocą cytometrii przepływowej wpływu OCL na liczbę bezwzględną i/lub odsetek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję CD25:

- a) w warunkach *in vitro* bez towarzyszącej aktywacji limfocytów, a więc w tym przypadku oceniano konstytutywną, czyli stałą (tj. niezwiązaną z aktywacją) ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL (hodowla 48 godz. i 120 godz.),
- b) w warunkach *in vitro* z towarzyszącą aktywacją limfocytów, a więc w tym przypadku oceniano indukowaną, czyli przejściową (tj. związaną z aktywacją) ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na OCL z towarzyszącą stymulacją (hodowla 24 godz.),
- c) w warunkach klinicznych; badania te polegały na ocenie w/w parametrów u psów chorych na AZS i leczonych OCL (ocena w dniu 0, 7, 14 i 28 podawania leku).

Zadanie badawcze nr 5: Ocena wpływu OCL na zdolność do produkcji wybranych cytokin przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ oraz na indukowanie komórek Tr₁

Jak to omówiono wcześniej, limfocyty Teff CD4⁺, a konkretnie ich subpopulacje Th₁, Th₂ i Th₁₇ oraz cytokiny przez nie wytwarzane, tj. odpowiednio IFN- γ , IL-4 i IL-17 (z których IFN- γ i IL-17 reprezentują kluczowe cytokiny o działaniu prozapalnym), są zaangażowane w patogenezę AZS, w rozumieniu czynników promujących rozwój tej choroby. Dlatego też, hamowanie zdolności limfocytów Th₁, Th₂ i Th₁₇ do produkcji tych cytokin wydaje się być ważnym celem terapeutycznym dla leków o działaniu przeciwalergicznym i przeciwzapalnym. Odwrotnie jest w przypadku IL-10, w przypadku której uznaje się, że regulacja w górę jej produkcji może stanowić skuteczny mechanizm skutkujący efektem przeciwalergicznym i przeciwzapalnym. Nabiera to szczególnego znaczenia w kontekście tego, że podejrzewa się, że dysfunkcja w produkcji tej cytokiny może być czynnikiem predysponującym do rozwoju AZS u ludzi (Koning i wsp. 1997) i u psów (Maeda i wsp. 2007, Majewska i wsp. 2016). IL-10 jest główną cytokiną o działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym, a indukcja jej produkcji powinna skutkować osłabieniem, bądź hamowaniem rozwoju odpowiedzi immunologicznej i reakcji zapalnej w AZS. Producentami IL-10 są subpopulacje limfocytów T CD4⁺ takie jak limfocyty Treg i Tr₁, a więc komórki regulatorowe, oraz Th₂, a więc komórki efektorowe. Konkretny sposób działania IL-10 będzie zależał od mikrośrodowiska do którego została uwolniona, jednak kierunek jej działania, tj. przeciwzapalny i supresyjny, pozostaje taki sam, bez względu na to, czy jest produkowana przez limfocyty Treg CD4⁺ czy Teff.

Przed podjęciem niniejszych badań w dostępnej literaturze brak było danych o wpływie OCL na zdolność do produkcji przez limfocyty T CD4⁺ takich cytokin jak IL-4, IL-10, IL-17

i IFN- γ . Wiadomo, że w regulację produkcji cytokin zaangażowany jest szlak sygnałowy JAK/STAT, a inhibitory kinaz JAK mogą mieć, w sposób pośredni, hamujący lub pobudzający efekt na ich produkcję (Hodge i wsp. 2016, Hammitzsch i wsp. 2018). Biorąc pod uwagę rolę tych cytokin w patogenezie AZS u ludzi i psów oraz zaangażowanie szlaku sygnalizacyjnego JAK/STAT w regulację produkcji cytokin, za warunek poznania uznano ustalenie, czy OCL może wpływać, a jeżeli tak, to w jakim kierunku, na zdolność do produkcji IL-4, IL-10, IL-17 i IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺. Ponadto, postanowiono sprawdzić, czy OCL ma wpływ na generowanie komórek regulatorowych Tr₁, a więc indukowalne komórki regulatorowe powstające w odpowiedzi na alergen i zaangażowane w tłumienie reakcji alergicznych i kształtowanie tolerancji immunologicznej. Należy dodać, że nie było naukowego uzasadnienia dla tworzenia hipotezy, że OCL może wpływać na generowanie tych komórek, bowiem wg wiedzy na czas, w którym prowadzono przedmiotowe badania, jak i obecnie, nie ma danych na temat bezpośredniej łączności między szlakiem sygnalizacyjnym JAK/STAT a komórkami Tr₁. Tak więc motywacją do przeprowadzenia tych badań była tylko tzw. „ciekawość naukowa”. Ustalenie, czy i jak OCL może wpływać na zdolność do produkcji IL-4, IL-10, IL-17 i IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺ oraz generowanie komórek Tr₁ wpisuje się przede wszystkim w realizację celu nr 2 niniejszych badań, a więc naświetlenia mechanizmów immunologicznych odpowiadających za skuteczność kliniczną leku. Niezależnie od tego, biorąc pod uwagę funkcje biologiczne jakie pełni IFN- γ wydzielany przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, tj. komórki Th₁ i Tc₁, oraz IL-4 wydzielana przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, tj. komórki Th₂ i Tc₂ (a więc przeciwdziałanie i zwalczanie zakażeń bakteryjnych i wirusowych, jak i przeciwdziałanie rozwojowi chorób nowotworowych), ustalenie czy i jak OCL wpływa na zdolność do produkcji IFN- γ i IL-4 przez te komórki, również dostarcza nowych danych na temat bezpieczeństwa stosowania leku w aspekcie jego możliwego niepożądanego wpływu na prawidłową odpowiedź immunologiczną na zakażenia i rozwój nowotworów.

W związku z tym kolejnymi celami szczegółowymi niniejszych badań było określenie, za pomocą cytometrii przepływowej, wpływu OCL na:

- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁻CD4⁺ (Th₂);
- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁻IFN- γ ⁺CD4⁺ (Th₁);
- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁻CD8⁺ (Tc₂);
- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁻IFN- γ ⁺CD8⁺ (Tc₁);
- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-17⁺CD4⁺ (Th₁₇) i IL-17⁺CD8⁺ (Tc₁₇);
- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T IL-10⁺CD4⁺ i IL-10⁺CD8⁺;

- odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T CD49b⁺CD223⁺CD4⁺ (Tr₁).

Badania te polegały na 72 godz. ekspozycji komórek jednojądrzastych pozyskanych ze śledziony myszy na OCL z towarzyszącą stymulacją i re-stymulacją limfocytów w obecności inhibitora wyrzutu cytokin. Badania te zostały przeprowadzone z użyciem limfocytów myszy z uwagi na to, że brak jest na rynku odpowiednich przeciwciał specyficznych dla psa (m.in. przeciwciał służących do skutecznej stymulacji limfocytów T do produkcji cytokin oraz do detekcji komórek Tr₁) umożliwiających zrealizowanie przedmiotowego zadania badawczego.

Zadanie badawcze nr 6: Ocena wpływu OCL na poszczególne subpopulacje leukocytów w krwi obwodowej myszy i psów

Ostatnim zadaniem badawczym prezentowanych badań była ocena wpływu podawania OCL na odsetek i liczbę bezwzględną poszczególnych subpopulacji leukocytów, tj. eozynofilów, neutrofilów, bazofilów, monocytów i całkowitej populacji limfocytów w krwi obwodowej zdrowych myszy oraz psów chorych na AZS. Dla jasności sytuacji należy podkreślić, że ta część badań nie miała charakteru oryginalnego – a przynajmniej nie w odniesieniu do psów - ponieważ producent preparatu Apoquel w CHPL określił jaki wpływ może mieć stosowanie OCL na liczebność tych komórek u psów. Pacjenci, od których pozyskiwano krew do badań opisanych w publikacji 4.1.1.4., na zlecenie lekarza weterynarii mieli wykonywane regularne badania morfologii krwi w celu monitorowania ich stanu zdrowia poprzez ocenę wpływu leczenia OCL na komórki i inne parametry układu biało- i czerwonekrwinkowego. Uznano, że będzie wartością dodaną przedstawienie w niniejszej publikacji tych wyników badań, tym bardziej, że częściowo różniły się one od tego, co w przedmiotowym względzie opisuje producent preparatu Apoquel w CHPL. Za warunek opublikowania uznano także wyniki dotyczące wpływu podawania OCL na liczbę bezwzględną poszczególnych subpopulacji leukocytów w krwi myszy, ponieważ wpływ ten różnił się zasadniczo od tego, jaki ustalono u psów. Podsumowując, w tym zadaniu badawczym oceniano wpływ OCL na odsetek i liczbę bezwzględną eozynofilów, neutrofilów, bazofilów, monocytów i całkowitej populacji limfocytów w krwi obwodowej:

- a) w warunkach eksperymentalnych, tj. u zdrowych myszy otrzymujących lek przez 14 dni;
- b) w warunkach klinicznych; tj. u psów chorych na AZS i leczonych OCL w 0, 7, 14 i 28 dniu podawania leku.

4.1.2.4. Układ eksperymentów

W celu zrealizowania powyższych zadań badawczych przeprowadzono sześć typów eksperymentów (każdy w 2 lub 3 powtórzeniach) w warunkach *in vitro* i dwa doświadczenia *in vivo* z wykorzystaniem zdrowych myszy oraz psów ze zdiagnozowanym AZS, którym podawano OCL *per os* w dawkach terapeutycznych. Najważniejsze dane dotyczące przeprowadzonych doświadczeń przedstawia Tabela 1.

Tabela nr 1. Układ eksperymentów będących przedmiotem opisywanego osiągnięcia naukowego.

UKŁAD EKSPERYMENTÓW			
Material do badań	Warunki eksperymentu	Kombinacja przeciwciał monoklonalnych	Analizowane parametry
Badania <i>in vitro</i>			
Eksperyment 1. Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ regulatorowych i efektorowych psa oraz na konstytutywną (badania bez towarzyszącej aktywacji limfocytów) i indukowaną (badania w warunkach aktywacji limfocytów) ekspresję cząsteczki CD25 na tych komórkach			
PBMCs pozyskane z krwi obwodowej zdrowych psów (n=11; 2 niezależne eksperymenty)	Hodowla niestymulowana 48 godz. oraz 120 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M ^a i 10 ⁻⁷ M	anti-canine CD4 FITC anti-canine CD8a APC anti-canine CD25 PE anti-mouse/rat/dog Foxp3 PerCP-Cy5.5	Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów T: - CD25⁻CD4⁺ - CD25⁻CD8⁺ - CD25⁺CD4⁺ - CD25⁺CD8⁺ - Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ - Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺
	Hodowla stymulowana 24 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M		Odsetek limfocytów T CD25⁺CD4⁺
Eksperyment 2. Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ regulatorowych psa w warunkach aktywacji			
PBMCs pozyskane z krwi obwodowej zdrowych psów (n=15; 3 niezależne eksperymenty)	Hodowla stymulowana 24 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M	anti-canine CD4 FITC anti-canine CD8a APC anti-mouse/rat/dog Foxp3 PerCP-Cy5.5	Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów T: - Foxp3⁺CD4⁺ - Foxp3⁺CD8⁺

Eksperyment 3. Ocena wpływu OCL na apoptozę limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ psa			
PBMCs pozyskane z krwi obwodowej zdrowych psów (n=11; 2 niezależne eksperymenty)	Hodowla niestymulowana 12 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M	anti-canine CD4 FITC anti-canine CD8a APC Annexin V APC 7-AAD	Odsetek limfocytów T: ▪ Annexin ⁺ 7AAD ⁻ CD4 ⁺ ▪ Annexin ⁺ 7AAD ⁻ CD8 ⁺
Eksperyment 4. Ocena wpływu OCL na zdolność do produkcji wybranych cytokin przez limfocyty T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ myszy			
MCs pozyskane ze śledziny zdrowych myszy (n=15; 3 niezależne eksperymenty)	Hodowla stymulowana 72 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M	anti-mouse CD4 FITC anti-mouse CD8a APC-Cy7 anti-mouse IL-4 PE-CF594 anti-mouse IL-10 APC anti-mouse IFN-γ AF 700	Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów T: ▪ IL-4 ⁺ IFN-γ ⁻ CD4 ⁺ (Th2) ▪ IL-4 ⁻ IFN-γ ⁺ CD4 ⁺ (Th1) ▪ IL-4 ⁺ IFN-γ ⁻ CD8 ⁺ (Tc2) ▪ IL-4 ⁻ IFN-γ ⁺ CD8 ⁺ (Tc1) ▪ IL-10 ⁺ CD4 ⁺ ▪ IL-10 ⁺ CD8 ⁺
MCs pozyskane z płuc zdrowych myszy (n=15; 3 niezależne eksperymenty)		anti-mouse CD4 FITC anti-mouse CD8a APC-Cy7 anti-mouse IL-17	Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów T: ▪ IL-17 ⁺ CD4 ⁺ (Th17) ▪ IL-17 ⁺ CD8 ⁺ (Tc17)
Eksperyment 5. Ocena wpływu OCL na generowanie limfocytów regulatorowych Tr ₁ myszy			
MCs pozyskane ze śledziny zdrowych myszy (n=15; 3 niezależne eksperymenty)	Hodowla stymulowana 72 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M	anti-mouse CD4 FITC anti-mouse CD49b PE-CF594 anti-mouse CD223 BB700	Odsetek i liczba bezwzględna limfocytów T CD49b ⁺ CD223 ⁺ CD4 ⁺ (Tr1)
Eksperyment 6. Ocena wpływu OCL na proliferację limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ myszy			
MCs pozyskane ze śledziny zdrowych myszy (n=15; 3 niezależne eksperymenty)	Hodowla stymulowana 72 godz. w obecności OCL w stężeniu 10 ⁻⁶ M i 10 ⁻⁷ M	anti-mouse CD4 FITC anti-mouse CD8a APC-Cy7 anti-mouse BrdU APC	Odsetek limfocytów T: ▪ BrdU ⁺ CD4 ⁺ ▪ BrdU ⁺ CD8 ⁺

Badania <i>in vivo</i>			
Eksperyment 1. Ocena (a) liczebności limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ i B w wybranych narządach limfatycznych i krwi obwodowej myszy otrzymujących OCL; (b) liczebności komórek układu białokrwinkowego myszy otrzymujących OCL			
PBMCs pozyskane z krwi pełnej myszy (n=12)	OCL podawany <i>per os</i> przez 14 dni co 12 godz. w dawce 2,7 mg/kg m.c. ^b	anti-mouse CD4 FITC anti-mouse CD8a APC-Cy7 anti-mouse CD19 AF 700	Odsetek i liczba bezwzględna: ▪ limfocytów T CD4 ⁺ ▪ limfocytów T CD8 ⁺ ▪ limfocytów B (CD19 ⁺)
MCs pozyskane ze śledziona myszy (n=12)			
Limfocyty pozyskane z HNLNs myszy (n=12)			
Limfocyty pozyskane z MLNs myszy (n=12)			
Krew obwodowa			nie dotyczy
Eksperyment 2. Ocena (a) liczebności limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ regulatorowych i efektorowych oraz ekspresji czynnika Foxp3 i cząsteczki CD25 w/na, odpowiednio, tych komórkach w krwi obwodowej psów chorujących na AZS i leczonych OCL; (b) liczebności komórek układu białokrwinkowego psów chorujących na AZS i leczonych OCL			
PBMCs pozyskane z krwi psów chorujących na AZS (n=8)	OCL podawany <i>per os</i> co 12 godz. przez 14 dni a następnie co 24 godziny przez 14 dni w dawce 0,4 mg/kg m.c.	anti-canine CD4 FITC anti-canine CD8a APC anti-mouse/rat/dog Foxp3 PerCP-Cy5.5	Odsetek i liczba bezwzględna: ▪ limfocytów T CD4 ⁺ ▪ limfocytów T CD8 ⁺
		nie dotyczy	Odsetek i liczba bezwzględna eozynofików, neutrofilów, bazofilów, monocytów i całkowitej populacji limfocytów
^a stężenie 10 ⁻⁶ M odpowiada stężeniu terapeutycznemu OCL osiąganemu w osoczu psów po podaniu leku <i>per os</i> w dawce rekomendowanej przez producenta (Collard i wsp. 2014). ^b dawka 2,7 mg/kg m.c. podawana myszom odpowiada dawce terapeutycznej 0,4 mg/kg m.c. OCL podawanej psom (Reagan-Shaw i wsp. 2007, CHPL Apoquel) OCL – oklacytynib; PBMCs - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells); MCs – komórki jednojądrzaste (mononuclear cells); HNLNs – węzły chłonne głowy i szyi (head and neck lymph nodes); MLNs - węzły chłonne śródpiersiowe (mediastinal lymph nodes)			

4.1.2.5. Podsumowanie uzyskanych wyników

W przeprowadzonych badaniach uzyskano następujące wyniki:

Wyniki uzyskane w badaniach in vitro prowadzonych z użyciem hodowli limfocytów psa

Ekspozycja na OCL:

- nie wpływała na konstytutywną (tj. stałą/nie indukowaną aktywacją) ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺;
- nie wpływała na ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ w warunkach braku stymulacji/braku aktywacji limfocytów;
- prowadziła do zmniejszenia liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺, Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ oraz Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺ w warunkach braku stymulacji/braku aktywacji limfocytów;
- prowadziła do redukcji (tj. regulacji w dół) indukowanej aktywacją limfocytów ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺;
- prowadziła do zwiększenia ekspresji Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ w warunkach stymulacji/aktywacji limfocytów, choć nie wpływała na liczebność bezwzględną limfocytów T Foxp3⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD8⁺;
- w wyższym stężeniu prowadziła do wzrostu odsetka komórek Annexin⁺7-AAD⁻CD4⁺ oraz Annexin⁺7-AAD⁻CD8⁺ - czyli limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w fazie wczesnej apoptozy.

Wyniki uzyskane w badaniach in vitro prowadzonych z użyciem hodowli limfocytów myszy

Ekspozycja na OCL:

- nie wpływała na odsetek ani na liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁺CD4⁺, tj. komórek Th₁;
- w wyższym stężeniu prowadziła do redukcji odsetka, ale nie liczby bezwzględnej, limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁺CD4⁺, tj. komórek Th₂, natomiast, co ciekawe, w niższym stężeniu powodowała zmniejszenie wartości drugiego parametru;
- nie wpływała na odsetek ani liczbę bezwzględną limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁺CD8⁺, tj. komórek Tc₁;
- prowadziła do redukcji zarówno odsetka, jak i liczby bezwzględnej limfocytów T IL-4⁺IFN- γ ⁺CD8⁺, tj. komórek Tc₂;

- nie wpływała na odsetek i na liczbę bezwzględną zarówno limfocytów T IL-17⁺CD4⁺, tj. komórek Th₁₇, jak i limfocytów IL-17⁺CD8⁺, tj. komórek Tc₁₇;
- bardzo drastycznie obniżała odsetek oraz liczbę bezwzględną limfocytów T IL-10⁺CD4⁺ oraz limfocytów T IL-10⁺CD8⁺, w wyższym stężeniu prawie znosząc zdolność do produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺;
- prowadziła do bardzo dużej (szczególnie przy ekspozycji na wyższe stężenie leku) redukcji odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T CD49b⁺CD223⁺CD4⁺, tj. komórek Tr₁;
- nie wpływała na odsetek limfocytów T BrdU⁺CD4⁺, tj. proliferujących limfocytów T CD4⁺, natomiast w wyższym stężeniu prowadziła do redukcji odsetka limfocytów T BrdU⁺CD8⁺, tj. proliferujących limfocytów T CD8⁺, jakkolwiek wpływ ten był relatywnie słabo wyrażony.

Wyniki uzyskane w badaniach in vivo prowadzonych w warunkach eksperymentalnych, tj. z użyciem myszy otrzymujących OCL

Podawanie OCL myszom:

- wywoływało redukcję liczby bezwzględnej, ale nie odsetka, limfocytów T CD4⁺ oraz B w węzłach chłonnych głowy i szyi (HNLNs, head and neck lymph nodes);
- nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów T CD8⁺ w HNLN, choć zwiększało ich odsetek;
- powodowało redukcję liczby bezwzględnej, ale nie odsetka, limfocytów T CD4⁺ w węzłach chłonnych śródpiersiowych (MLNs, mediastinal lymph nodes);
- nie wpływało na odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T CD8⁺ oraz B w MLN;
- wywoływało redukcję liczby bezwzględnej, ale nie odsetka, limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w śledzionie;
- nie wpływało na odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów B w śledzionie;
- prowadziło do wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺, ale nie CD8⁺, w krwi obwodowej;
- nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi obwodowej;
- obniżało liczbę bezwzględną, ale nie odsetek, limfocytów B w krwi obwodowej;
- wywoływało obniżenie liczby bezwzględnej eozynofików, neutrofilów, bazofilów, monocytów i całkowitej populacji limfocytarnej.

**Wyniki uzyskane w badaniach in vivo prowadzonych w warunkach klinicznych, tj.
z użyciem próbek krwi obwodowej psów chorujących na AZS pozyskanych w dniu 0, 7, 14
i 28 terapii OCL**

Podawanie OCL psom chorującym na AZS:

- nie wpłynęło na odsetek limfocytów T CD4⁺ w żadnym z punktów czasowych;
- powodowało przejściowy, tj. na 7 dzień terapii, wzrost odsetka limfocytów T CD8⁺ oraz liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺;
- prowadziło do zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺ w 14 i 28 dniu terapii;
- prowadziło do zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD8⁺ w 14 dniu terapii;
- w 7 dniu terapii prowadziło do zwiększenia liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺, natomiast w 14 dniu wywoływało redukcję liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺; i CD25⁺CD8⁺;
- powodowało zwiększenie odsetka komórek limfocytów T CD4⁺ wykazujących ekspresję czynnika Foxp3 w 14 i 28 dni terapii, ale nie wpływając na ekspresję tego czynnika w limfocytach T CD8⁺;
- spowodowało zwiększenie liczby bezwzględnej limfocytów T Foxp3⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD8⁺ w 7 dniu terapii, przy czym w przypadku limfocytów T Foxp3⁺CD4⁺ efekt ten był również widoczny w ostatnim punkcie czasowym;
- prowadziło do zwiększenia odsetka całkowitej populacji limfocytarnej w każdym punkcie czasowym, jakkolwiek ich liczba bezwzględna była istotnie zwiększona jedynie w 7 dniu terapii;
- spowodowało spadek odsetka i liczby bezwzględnej eozynofili w każdym punkcie czasowym, przy czym trzeba zauważyć, że ich średnia liczba bezwzględna przed leczeniem była prawie na poziomie górnej wartości zakresu referencyjnego dla tych komórek;
- prowadziło do zmniejszenia odsetka monocytów oraz neutrofili w 7 i 28 dniu terapii, nie wpływając jednak na ich liczbę bezwzględną;
- nie wpłynęło na odsetek oraz liczbę bezwzględną bazofili.

4.1.2.6. Omówienie uzyskanych wyników

Ocena wpływu OCL na odsetek i liczebność bezwzględną całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺

Pierwszym celem badań stanowiących przedmiotowe osiągnięcie było nakreślenie mechanizmów immunologicznych stojących za immunosupresyjnym działaniem OCL w aspekcie bezpieczeństwa stosowania leku. Postawiona hipoteza w zadaniu badawczym nr 1 zakładała, że efekt immunosupresyjny leku może wynikać z negatywnego wpływu na liczebność limfocytów T, a więc kluczowych komórek zaangażowanych w kształtowanie i utrzymywanie swoistej odporności komórkowej. W badaniach *in vitro* (publikacja 4.1.1.1.) wykazano znaczny ubytek limfocytów T, zarówno CD4⁺, jak i CD8⁺, w odpowiedzi na ekspozycję psich PBMCs na OCL, co wstępnie potwierdziło zasadność postawionej hipotezy i stanowiło przesłankę do jej zweryfikowania w warunkach *in vivo*. Nie zanotowano jednak wpływu OCL na liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ w krwi obwodowej myszy po 14 dniach podawania leku, choć obserwowano pewną tendencję do spadku wartości tego parametru (praca 4.1.1.3.). Podawanie OCL psom chorującym na AZS również nie wpływało na liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi obwodowej po 14 i 28 dniach terapii (praca 4.1.1.4.). Zanotowano co prawda przejściowy wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi obwodowej leczonych psów po 7 dniach podawania leku, co sugeruje, że podanie OCL skutkowało szybkim, ale stosunkowo krótkim i przejściowym zwiększeniem się liczby limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi psów chorych na AZS. Nie ma naukowych dowodów, aby wnioskować, że za taki efekt odpowiadała aktywacja lub proliferacja limfocytów T, gdyż takie działanie OCL zostało zanegowane w badaniach opublikowanych w pracy 4.1.1.2. Jedynym wyjaśnieniem wydaje się być to, że efekt ten spowodowany był redystrybucją limfocytów T z węzłów chłonnych lub innych narządów limfoidalnych do krwi. Redystrybucja limfocytów z węzłów chłonnych, czy też innych obwodowych narządów limfoidalnych do układu krążenia, wymagałaby jednak obniżenia/regulacji w dół liczby odpowiednich receptorów zasiedlania, które są niezbędne do zasiedlania węzłów chłonnych (L-selektyna) czy kępek Peyera i blaszki właściwej jelit (integryna $\beta 7$). Niestety, na dzień dzisiejszy nie ma żadnych doniesień oceniających wpływ jakichkolwiek inhibitorów JAK na receptory zasiedlania. Przedstawione wyniki opublikowane w pracach 4.1.1.3. oraz 4.1.1.4. stanowią pierwsze doniesienia literaturowe oceniające wpływ OCL na liczbę bezwzględną limfocytów T w krwi obwodowej zwierząt. W dostępnych bazach danych nie ma wyników podobnych badań, choć trzy doniesienia można zaliczyć jako zbliżone do poruszanej tematyki.

De Caro Martins i wsp. (2022) badali wpływ OCL na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w krwi psów z AZS, natomiast tylko w odniesieniu do odsetka tych komórek. Autorzy Ci wykazali, że po 60-ciu dniach terapii OCL nie wpłynął na odsetki limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, co pozostaje w zgodzie z wynikami będącymi przedmiotem przedmiotowego doniesienia uzyskanymi w 28 dniu terapii OCL (praca 4.1.1.4.). Nie ulega wątpliwości, że liczba bezwzględna reprezentuje bardziej wiarygodny parametr niż odsetek komórek przy ocenie czy jakiś lek wykazuje efekt deplecyjny wobec badanych subpopulacji limfocytów. W CHPL Apoquel producent podaje, że podawanie OCL nie wpłynęło na liczbę całkowitej populacji limfocytów w krwi obwodowej psów. Również Denti i wsp. (2022) nie wykazali zmian w liczbie całkowitej populacji limfocytów w krwi po stosowaniu OCL u psów z AZS. Wyniki te pozostają w zgodzie z wynikami przedstawionymi w pracy 4.1.1.4., gdzie nie zanotowano istotnego wpływu leku na liczbę bezwzględną całkowitej populacji limfocytów w krwi psów. Jednakże w badaniach będących przedmiotem pracy 4.1.1.3. wykazano, że OCL spowodował spadek liczby bezwzględnej całkowitej populacji limfocytów w krwi obwodowej myszy. Efekt ten najprawdopodobniej mógł wynikać ze spadku liczby bezwzględnej limfocytów B, a nie limfocytów T. Wykazano bowiem (praca 4.1.1.3.), że podawanie OCL myszom przez 14 dni spowodowało spadek liczby bezwzględnej limfocytów B, ale nie T, w krwi obwodowej. Rozbieżności pomiędzy wynikami prawdopodobnie wynikają z różnic gatunkowych zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach. Warto jednak zaznaczyć, że liczba bezwzględna całkowitej populacji limfocytów w krwi myszy po podaniu OCL nadal była w zakresie referencyjnym i nie wiadomo, czy wychwycone zmiany miały znaczenie istotne kliniczne.

Należy wyraźnie podkreślić, że brak wpływu jakiegoś leku na konkretne subpopulacje limfocytów w krwi obwodowej nie oznacza, że lek nie będzie wykazywał wpływu na te populacje w narządach limfoidalnych. Wykazano bowiem (praca 4.1.1.3.), że podawanie OCL przez 14 dni doprowadziło do spadku liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺, ale nie CD8⁺, w HNLNs i MLNs u myszy. Ponadto, lek spowodował znaczny spadek liczby bezwzględnej limfocytów B w HNLNs, nie wpływając jednak na liczebność tych limfocytów w MLNs. Spadek liczebności limfocytów T CD4⁺ oraz limfocytów B w HNLNs znalazł odzwierciedlenie w zwiększonym odsetku limfocytów T CD8⁺ w tych narządach, co należy jednak traktować jako wzrost pozorny, tj. będący matematyczną konsekwencją spadku liczebności powyższych badanych subpopulacji limfocytów. Wyniki badań w zakresie wpływu OCL na liczebność limfocytów w węzłach chłonnych sugerują więc, że lek charakteryzuje się efektem deplecyjnym wyłącznie wobec limfocytów T CD4⁺. Co ciekawe, powyższa preferencja nie była

już obserwowana wobec limfocytów w śledzionie u myszy. Podawanie OCL spowodowało bowiem zarówno ubytek limfocytów T CD4⁺ jak i CD8⁺ w śledzionie, nie wpływając przy tym na liczebność limfocytów B.

Uzyskane wyniki badań wpisują się w realizację celu nr 1 niniejszego osiągnięcia naukowego i dostarczają nowe dane niezbędne do oceny bezpieczeństwa stosowania leku u psów. Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki badań w ujęciu całościowym (tj. nie tylko w oparciu o ocenę wpływu podawania OCL na limfocyty T i B w krwi obwodowej, ale również na te pozyskane z tkanek/narządów limfoidalnych), należy stwierdzić, że podawanie OCL wiąże się ze spadkiem liczebności limfocytów T i B, a efekt ten zależy od rodzaju badanej tkanki/narządu. Tak więc, postawiona hipoteza badawcza została zweryfikowana pozytywnie, choć skala efektu deplecyjnego OCL wobec limfocytów T pozyskanych z węzłów chłonnych i śledziony w warunkach *in vivo* była nieporównywalnie słabsza niż w warunkach *in vitro*. Należy zaznaczyć, że działania niepożądane leku, lub nawet efekty jego toksyczności zazwyczaj są wyraźniej widoczne w warunkach *in vitro* niż *in vivo*. W warunkach *in vivo* OCL uległ metabolizmowi i wywierał działanie tylko przez określony czas, podczas gdy w warunkach *in vitro* komórki były poddane ekspozycji na lek przez cały czas eksperymentu. Ponadto, w organizmie żywym mają również miejsce pewne mechanizmy regulujące efekty działania leku. Na podstawie wyników badań będących przedmiotem prac 4.1.1.1., jak również 4.1.1.2. należy wyciągnąć wniosek, że za efekt deplecyjny OCL wobec limfocytów T odpowiedzialny jest raczej efekt proapoptotyczny leku, aniżeli hamowanie proliferacji badanych komórek. Znajduje to również potwierdzenie w wynikach badań innych autorów, gdzie po ekspozycji psich PBMCs na stężenie OCL odpowiadające jego dawce terapeutycznej nie wykazano wpływu leku na proliferację tych komórek (Banovic i wsp. 2019), z kolei podanie WHI-P131, inhibitora JAK3, indukowało apoptozę limfocytów T CD4⁺ (Cetkovic-Cvrlje i wsp. 2012).

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Zważywszy na kluczowe znaczenie limfocytów T i B w efektywnej odpowiedzi immunologicznej na patogeny, spadek liczebności limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz limfocytów B spowodowany podawaniem OCL może stanowić jeden z mechanizmów immunologicznych odpowiadających za efekt immunosupresyjny leku w znaczeniu negatywnym, tj. usposabiającym pacjentów do zakażeń. Dlatego też, przed rozpoczęciem leczenia psów z użyciem tego leku, lekarz weterynarii powinien rozważyć współczynnik korzyści do ryzyka, szczególnie u pacjentów cierpiących na

infekcje bakteryjne, wirusowe czy pasożytnicze oraz u pacjentów z immunosupresją. Omówione wyżej wyniki badań wpisują się głównie w realizację celu nr 1 niniejszych badań.

Ocena wpływu OCL na apoptozę i proliferację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺

Hipoteza postawiona w tym zadaniu badawczym zakładała, że OCL może wywierać działanie proapoptotyczne oraz antyproliferacyjne wobec limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. Uzyskane wyniki wykazały, że ekspozycja psich PBMCs na OCL w stężeniu 10⁻⁶ M prowadziła do wzrostu odsetka zarówno komórek Annexin⁺7-AAD⁻CD4⁺ oraz Annexin⁺7-AAD⁻CD8⁺ - czyli odpowiednio limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w fazie wczesnej apoptozy (praca 4.1.1.1.). Nie zanotowano wpływu OCL w niższym stężeniu na apoptozę badanych komórek, co może sugerować, że efekt proapoptotyczny leku może być dawkozależny. Wyniki badań w zakresie wpływu leku na apoptozę pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie postawionej hipotezy i umożliwiły wyciągnięcie wniosku, że za efekt immunosupresyjny OCL może odpowiadać jego działanie proapoptotyczne wobec limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. Prezentowane wyniki badań zostały opublikowane w literaturze po raz pierwszy, stąd wymagają dalszej weryfikacji, gdyż na dzień dzisiejszy nie można ich porównać z wynikami innych badaczy. Można jedynie zaznaczyć, że uzyskane wyniki badań są zgodne z badaniami innych autorów, gdzie wykazano, że WHI-P131, inhibitor JAK3, indukował apoptozę mysich limfocytów T CD4⁺ (Cetkovic-Cvrlje i wsp. 2012), a inne inhibitory JAK3, takie jak WHI-P154 czy AG490 indukowały apoptozę chłoniaka anaplastycznego z dużych komórek (Amin i wsp. 2003). Ponadto, Lee i wsp. (2018) wykazali, że ruxolitynib, inhibitor JAK1 i JAK2, indukował apoptozę komórek linii chłoniaka.

Przedstawione wyniki badań nie wykazały jednak wpływu OCL na proliferację limfocytów T CD4⁺, natomiast w wyższym stężeniu ekspozycja na OCL prowadziła do redukcji odsetka proliferujących limfocytów T CD8⁺, jakkolwiek wpływ ten był relatywnie słabo wyrażony (szczególnie w porównaniu do efektu mykofenolanu mofetylu, a więc leku o potwierdzonym działaniu antyproliferacyjnym) (praca 4.1.1.2.). Tak więc, postawiona hipoteza badawcza w tym zakresie została zweryfikowana negatywnie, a efekt immunosupresyjny OCL nie wydaje się wynikać z hamowania proliferacji limfocytów T CD4⁺. Było to pierwsze doniesienie oceniające wpływ OCL na proliferację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W dostępnej literaturze znajduje się praca Banovic i wsp. (2019), w której wykazano co prawda efekt antyproliferacyjny OCL wobec PBMCs pozyskanych z krwi pełnej zdrowych psów, jednak warto zaznaczyć, że efekt ten był widoczny jedynie po ekspozycji komórek na lek w wysokim stężeniu, tj. 10 µM. Badając wpływ OCL w stężeniu 1 µM (tj. w stężeniu odpowiadającym

stężeniu terapeutycznemu leku osiąganemu w osoczu psów) badacze Ci nie wykazali efektu antyproliferacyjnego OCL wobec badanych komórek. Powyższe wyniki badań trudno jednak porównać z tymi uzyskanymi w badaniach stanowiących niniejsze osiągnięcie, gdyż w skład PBMCs wchodzi nie tylko limfocyty T, ale także limfocyty B, komórki NK czy monocyty. W odróżnieniu od Banovic i wsp. (2019), w niniejszych badaniach własnych oceniano wpływ OCL na proliferację konkretnych subpopulacji limfocytów T, tj. na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, a oceny tej dokonano za pomocą cytometrii przepływowej, a nie technik immunofluorescencyjnych. Postawiona hipoteza badawcza opierała się na wynikach badań innych autorów, którzy wykazali, że peficytynib oraz tofacytynib (inhibitory JAK1 i JAK3), jak również baricytynib (inhibitor JAK1 i JAK2) oraz upadacytynib i filgotynib (inhibitory JAK1) hamowały proliferację limfocytów T (Ito i wsp. 2017, Reddig i wsp. 2021). Szlak JAK/STAT stanowi proliferacyjną ścieżkę sygnalizacyjną, a jego wpływ na proliferację jest w dużej mierze zależny od kinaz JAK i białek STAT. Należałoby więc wyciągnąć wniosek, że w odróżnieniu od innych inhibitorów JAK, hamowanie JAK1 przez OCL nie jest wystarczające do wywołania efektu antyproliferacyjnego wobec limfocytów T. W tym miejscu należy jednak ponownie zaznaczyć, że w niniejszych badaniach własnych oceniano wpływ OCL na proliferację konkretnych subpopulacji limfocytów T, a w badaniach Ito i wsp. (2017) oraz Reddig i wsp. (2021) oceniano wpływ inhibitorów JAK na proliferację całkowitej populacji limfocytów T za pomocą metod immunofluorescencyjnych. Kwestia wpływu OCL na proliferujące limfocyty T, B czy komórki NK wymaga jednak przeprowadzenia szerszych badań.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Biorąc pod uwagę fakt, że limfocyty Teff CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w patogenezie AZS oraz innych chorób alergicznych, uzyskane wyniki sugerują, że indukcja apoptozy tych komórek przez OCL, ale nie zahamowanie ich proliferacji, może stanowić jeden z mechanizmów stojących za immunosupresyjnym działaniem leku odpowiedzialnym za jego skuteczność kliniczną. Dodatkowo, mając na uwadze też to, że limfocyty T CD8⁺ również biorą udział w patogenezie AZS u psów, wydaje się, że efekt proapoptotyczny oraz antyproliferacyjny (jakkolwiek słabo wyrażony) OCL wobec tych limfocytów w jakimś zakresie może być również współodpowiedzialny za działanie immunosupresyjne. Oceniając uzyskane wyniki w aspekcie bezpieczeństwa stosowania OCL u psów, efekt proapoptotyczny leku wobec limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, jak również efekt antyproliferacyjny wobec limfocytów T CD8⁺ (jakkolwiek słabo wyrażony) należy traktować jako działanie negatywne OCL na te komórki,

najprawdopodobniej odpowiadające za efekt deplecyjny OCL wobec prawidłowych limfocytów T. Uzyskane wyniki badań w tym zakresie wpisują się realizację zarówno celu nr 1, jak i nr 2 niniejszych badań.

Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów T regulatorowych z populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺

Jak wspomniano wcześniej, kinaza JAK3 jest niezbędna dla prawidłowej ekspresji czynnika Foxp3, ponieważ, szlak IL-2/JAK3/STAT5 bierze udział w zapoczątkowaniu i utrzymywaniu prawidłowej ekspresji tego czynnika w limfocytach Treg (Goldstein i wsp. 2016). W badaniach na myszach wykazano, że takie inhibitory JAK3 jak WHI-P131 (Cetkovic-Cvrlje i wsp. 2012), ZM39923 oraz AG490 (Goldstein i wsp. 2016) redukowały ekspresję Foxp3 w limfocytach Treg CD4⁺ w warunkach *in vitro*. Podobne wyniki otrzymali również Goldstein i wsp. (2016) badając wpływ inhibitorów JAK3 na ekspresję Foxp3 w ludzkich limfocytach Treg. W prezentowanych badaniach własnych stanowiących przedmiotowe osiągnięcie kolejna postawiona hipoteza badawcza zakładała, że podawanie OCL, jako inhibitora JAK1, JAK2, ale także JAK3, również spowoduje redukcję ekspresji tego czynnika w psich limfocytach T. W badaniach *in vitro* ekspozycja psich PBMCs na OCL bez towarzyszącej aktywacji limfocytów nie wpłynęła na ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺, natomiast zanotowano redukcję liczby bezwzględnej limfocytów T Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ oraz Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺, za co najprawdopodobniej odpowiadał efekt proapoptotyczny leku (praca 4.1.1.1.). Wyciągnięto więc wniosek, że hamowanie JAK3 przez OCL najwyraźniej jest na tyle słabe, że nie wywiera wpływu na ekspresję Foxp3. Wyniki badań w tym zakresie uzupełniono o eksperyment *in vitro*, w którym zbadano jak ekspozycja psich PBMCs na OCL wpłynie na ekspresję Foxp3 w limfocytach T w warunkach aktywacji. Zaskakująco, wykazano, że w odpowiedzi na ekspozycję PBMCs na OCL z towarzyszącą stymulacją limfocytów doszło do regulacji w górę ekspresji czynnika Foxp3 zarówno w limfocytach T CD4⁺ jak i CD8⁺ (praca 4.1.1.4.). W tym miejscu należy wyjaśnić, że w badaniach wpływu leku na ekspresję czynnika Foxp3 bez towarzyszącej stymulacji limfocytów przedmiotem analizy były limfocyty T o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ oraz Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺, natomiast w warunkach aktywacji limfocytów analiza wyników obejmowała limfocyty T o fenotypie Foxp3⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD8⁺. Jak wspomniano we wstępie, limfocyty Treg są zazwyczaj identyfikowane z fenotypem Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ lub Foxp3⁺CD25⁺CD8⁺, jednakże dotyczy on głównie komórek ludzkich oraz mysich. Czynniki Foxp3 nadaje komórce właściwości supresorowe (Fontenot i wsp. 2003), podczas gdy

cząsteczka CD25 może brać udział w tworzeniu właściwości regulatorowych tych komórek, ale okazuje się, że raczej dotyczy to myszy a nie człowieka, czy psa, jak kiedyś sądzono (Curotto de Lafaille i wsp. 2004, Biller i wsp. 2007). W badaniach Biller i wsp. (2007) czynnik Foxp3 został uznany za jedyny marker do identyfikacji limfocytów Treg u psów. Po opublikowaniu pierwszego etapu badań *in vitro* (praca 4.1.1.1.) został przeanalizowany rozkład procentowy limfocytów T Foxp3⁺CD25⁻, Foxp3⁺CD25⁺ oraz Foxp3⁻CD25⁺ wśród limfocytów T CD4⁺ w krwi psów, a wyniki tej analizy przedstawiono w publikacji 4.1.1.4. Okazało się, że odsetek limfocytów T Foxp3⁺CD25⁻CD4⁺ był ok. 7 razy wyższy niż odsetek komórek o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺. Stąd, uznano, że ekspresja czynnika Foxp3 nie jest skorelowana u psów z cząsteczką CD25, co zostało również wzięte pod uwagę przy analizie wyników doświadczenia w warunkach klinicznych. Jednocześnie należy nadmienić, że po ponownym przeanalizowaniu wyników badań *in vitro* pierwszego etapu (tj. bez towarzyszącej aktywacji limfocytów), w oparciu o fenotyp limfocytów Treg Foxp3⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD8⁺ również nie wykazano wpływu leku na ekspresję czynnika Foxp3.

Fakt, że OCL regulował w górę ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ w warunkach aktywacji limfocytów miał duże znaczenie poznawcze, ale niesie ze sobą również pewne znaczenie praktyczne. Generalnie limfocyty Treg można podzielić na naturalne limfocyty Treg (nTreg) i indukowane iTreg (Fontenot & Rudensky 2005, Mahic i wsp. 2008, Ménoret i wsp. 2023). Wyniki niektórych badań sugerują, że generowanie limfocytów iTreg, a więc limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję Foxp3, które wcześniej jej nie wykazywały, może być obiecującym celem terapeutycznym w kontekście leczenia wielu chorób alergicznych, w tym AZS (Keppel i wsp. 2008, Agrawal i wsp. 2011, Fyhrquist i wsp. 2012). Uzyskane wyniki badań w warunkach klinicznych (tj. u psów chorych na AZS leczonych OCL) wykazały, że terapia OCL prowadziła do wzrostu zarówno odsetka, jak i liczby bezwzględnej limfocytów T Foxp3⁺CD4⁺, choć należy obiektywnie stwierdzić, że skala tego zjawiska była niska (praca 4.1.1.4.). Niemniej jednak, wyniki te sugerują, że OCL może regulować w górę ekspresję czynnika Foxp3 w limfocytach T Foxp3⁻CD4⁺, a tym samym promować konwersję nie-regulatorowych limfocytów T CD4⁺ w limfocyty T regulatorowe (w iTreg), co może stanowić dodatkowy mechanizm odpowiadający za immunomodulujące/immunosupresyjne właściwości leku. Ponieważ jednak OCL nie wpływał na ekspresję Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ w warunkach *in vitro* bez towarzyszącej aktywacji limfocytów, a nawet wykazywał wobec tych limfocytów efekt deplecyjny, pojawiła się więc hipoteza, że OCL może generować komórki iTreg CD4⁺ jedynie u pacjentów

cierpiących na choroby o podłożu alergicznym przebiegające z aktywacją limfocytów T. Należy jednak zaznaczyć, że taki efekt niesie ze sobą pewne ryzyko. Ponieważ limfocyty Treg CD4⁺ hamują m.in. również odpowiedź przeciwnowotworową (Saleh i wsp. 2020), należałoby monitorować pacjentów długotrwale przyjmujących OCL pod kątem występowania chorób nowotworowych, a u tych, u których zdiagnozowano już nowotwór, powinno się wyważyć korzyści do ryzyka zastosowania preparatu z OCL.

Z kolei, jeżeli chodzi o wpływ leku na limfocyty Treg CD8⁺, to zanotowano co prawda wzrost liczby bezwzględnej tych komórek w 14 dniu terapii OCL w krwi psów, nie było to jednak skorelowane ze wzrostem ich odsetka, ale ze wzrostem liczby bezwzględnej całkowitej subpopulacji limfocytów. Wobec powyższego, przejściowa zwiększona liczebność limfocytów Treg CD8⁺ nie powinna być interpretowana ze wzrostem ekspresji Foxp3 w tych limfocytach w odpowiedzi na lek, a raczej jako wynik redystrybucji tych limfocytów z tkanek limfoidalnych do krwi.

Biorąc pod uwagę to, że lek jednocześnie zmniejszał liczebność limfocytów Teff CD4⁺ i zwiększał liczebność limfocytów Treg CD4⁺ u psów z AZS, można wyciągnąć wniosek, że w wyniku podawania OCL doszło do zmiany równowagi pomiędzy limfocytami Teff i iTreg w kierunku zwiększenia tych drugich. Uzyskane wyniki badań były pierwszym doniesieniem oceniającym wpływ podawania OCL na liczebność limfocytów Treg CD4⁺ i CD8⁺ w krwi psów chorych na AZS, stąd niemożliwe jest ich porównanie z wynikami innych autorów. W dostępnej literaturze znajduje się jedynie publikacja Herrmann i wsp. (2023), którzy nie wykazali wpływu długoterminowej terapii OCL na odsetek limfocytów T Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ w krwi psów. Różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi przez tych autorów a wynikami badań stanowiących niniejsze doniesienie naukowe wynikają przede wszystkim z różnego czasu podawania OCL – Herrmann i wsp. (2023) podawali lek psom przez co najmniej 9 miesięcy, a w niniejszych badaniach było to 28 dni. Po drugie, badacze Ci poddali analizie odsetki limfocytów T o fenotypie Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺, podczas gdy w badaniach własnych, jak wyjaśniono to powyżej, analizowano odsetek limfocytów T o fenotypie Foxp3⁺CD4⁺, a więc liczniejszą populację limfocytów T wykazujących ekspresję czynnika Foxp3.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki badań sugerują, że generowanie komórek iTreg CD4⁺, ale nie iTreg CD8⁺, może stanowić jeden z mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za skuteczność kliniczną OCL w terapii AZS u psów. Uzyskane wyniki badań wpisują się przede wszystkim w realizację celu naukowego nr 2 i mają w dużej mierze głównie znaczenie poznawcze, choć biorąc pod uwagę fakt, że generowanie

iTreg wydaje się być obiecującym celem terapeutycznym leczenia wielu chorób alergicznych, niesie to ze sobą również pewne implikacje praktyczne. Z drugiej jednak strony, ponieważ limfocyty Treg CD4⁺ hamują także odporność przeciwnowotworową, sugeruje to, że należałoby monitorować pacjentów otrzymujących OCL pod kątem rozwoju chorób nowotworowych, a u pacjentów z już zdiagnozowanymi nowotworami wyważyć stosunek korzyści do ryzyka leczenia przy użyciu tego leku.

Ocena wpływu OCL na liczebność limfocytów T efektorowych z populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ oraz na konstytutywną i indukowaną ekspresję cząsteczki CD25 na tych komórkach

Cząsteczka CD25, tj. łańcuch α receptora dla IL-2, umożliwia właściwą czynność limfocytów Teff. Ekspresja cząsteczki CD25 na limfocytach T może być konstytutywna lub indukowana w odpowiedzi na aktywację limfocytów. U myszy, konstytutywna ekspresja CD25 na limfocytach T skorelowana jest z koekspresją czynnika Foxp3, a tym samym z fenotypem limfocytów regulatorowych. U psów, podobnie jak u bydła, pewna pula limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazuje konstytutywną ekspresję CD25, chociaż nie jest to skorelowane z koekspresją czynnika Foxp3 (Maślanka 2014). Rola komórek o fenotypie Foxp3⁻CD25⁺CD4⁺ czy Foxp3⁻CD25⁺CD8⁺ nie jest jeszcze do końca poznana. Natomiast indukowana ekspresja cząsteczki CD25 ma miejsce w momencie aktywacji limfocytów Teff, co pozwala na przyłączenie się do nich IL-2, zwiększając tym samym responsywność limfocytów Teff na IL-2. Tak więc, cząsteczka CD25 uznawana jest za wczesny marker aktywacji limfocytów T. Postawiona hipoteza badawcza zakładała, że OCL może regulować w dół ekspresję cząsteczki CD25 na powierzchni limfocytów Teff CD4⁺ i w ten sposób upośledzać aktywację tych komórek i powiązaną z tym odpowiedź immunologiczną, wywołując tym samym działanie immunosupresyjne.

W prezentowanych badaniach wykazano, że w warunkach *in vitro* ekspozycja psich PBMCs na OCL nie wpływała na konstytutywną ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺, natomiast prowadziła do zmniejszenia liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺ w warunkach braku stymulacji (praca 4.1.1.1.). Wyniki badań *in vitro* wykazały co prawda niewielki spadek odsetka limfocytów T CD25⁺CD4⁺ po ekspozycji na wyższe stężenie leku w warunkach niestymulowanych, efekt ten nie wynikał jednak ze spadku ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺, ale był matematyczną konsekwencją tego, że OCL spowodował większy spadek liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺ niż CD25⁻CD4⁺. Dodatkowo, wykazano, że ekspozycja na OCL, doprowadziła do redukcji (regulacji w dół)

indukowanej aktywacją ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺, ale całkowicie jej nie zapobiegła (praca 4.1.1.1.). Wyniki badań *in vitro* zostały następnie zweryfikowane w warunkach klinicznych, gdzie wykazano, że podawanie OCL psom chorym na AZS prowadziło do zmniejszenia ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺ w 14 i 28 dniu terapii oraz na limfocytach T CD8⁺ w 14 dniu terapii (praca 4.1.1.4.). Ponadto, zanotowano przejściowy wzrost liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺ w 7 dniu terapii oraz redukcję liczby bezwzględnej limfocytów T CD25⁺CD4⁺ i CD25⁺CD8⁺ w 14 dniu terapii OCL w krwi psów chorych na AZS. Uzyskane wyniki badań *in vivo* potwierdziły, że OCL reguluje w dół ekspresję CD25 na limfocytach Teff CD4⁺. Tak więc, postawiona hipoteza badawcza została zweryfikowana pozytywnie. Pojawia się jednak pytanie, czy OCL podawany psom regulował w dół konstytutywną, czy może indukowaną ekspresję cząsteczki CD25? Niestety na dzień dzisiejszy nie mamy narzędzi, aby to ustalić. Niemniej jednak, wyniki badań *in vitro* prezentowane w pracy 4.1.1.1. wykazały, że OCL nie wpływał na konstytutywną ekspresję CD25 na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺, ale regulował w dół indukowaną aktywacją ekspresję tej cząsteczki na limfocytach T CD4⁺. Drugie nasuwające się pytanie brzmi, czy regulacja w dół cząsteczki CD25 jest działaniem bezpośrednim tj. wynikającym z hamowania ekspresji genów CD25, czy pośrednim, tj. będącym konsekwencją hamowania szlaku JAK/STAT? Odpowiedź na to pytanie wymaga przeprowadzenia dalszych badań.

Również w zakresie wpływu OCL na limfocyty Teff i na ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T niemożliwe jest porównanie uzyskanych wyników badań z innymi autorami, gdyż w dostępnej literaturze brak jest podobnych badań. Warto jednak zaznaczyć, że dostępne są wyniki badań przeprowadzonych przez Parampalli Yajnanarayana i wsp. (2015), którzy wykazali, że ruxolitynib, tj. inhibitor kinaz JAK1 i JAK2, obniżał liczbę bezwzględną aktywowanych limfocytów T CD4⁺.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Biorąc pod uwagę fakt, że limfocyty Teff CD4⁺ biorą udział w patofizjologii wielu chorób alergicznych, w tym AZS, regulacja w dół ekspresji cząsteczki CD25 na ich powierzchni i upośledzenie w ten sposób aktywacji tych limfocytów przez OCL może stanowić ważny element mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za przeciwalergiczne działanie leku. Należy jednak po raz kolejny zaznaczyć, że efekt immunosupresyjny, który odpowiada za hamowanie patogenezы chorób alergicznych prowadzi również do zwiększenia podatności pacjentów na zakażenia, stąd upośledzenie aktywacji limfocytów T CD4⁺ przez OCL należy również rozważać w kontekście negatywnego oddziaływania leku na te komórki, a zastosowanie OCL u pacjentów

z zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi wymaga rozważenia współczynnika korzyści do ryzyka przez lekarza weterynarii. Uzyskane wyniki badań wpisują się w realizację obu celów naukowych, ponieważ rzucają światło na mechanizmy immunologiczne odpowiedzialne za efekt terapeutyczny leku, jak również pozwalają ocenić bezpieczeństwo jego stosowania. Dodatkowo, fakt, że OCL może upośledzać aktywację limfocytów $T_{eff} CD4^+$ może nieść również pewne możliwości aplikacyjne, tj. poszerzenie w przyszłości wskazań do stosowania OCL o inne choroby, w których etiopatogenezie rolę odgrywa nadmierna aktywacja tych komórek.

Ocena wpływu OCL na zdolność do produkcji wybranych cytokin przez limfocyty $T CD4^+$ i $CD8^+$ oraz na indukowanie komórek Tr_1

Jak podkreślono we wstępie, szlak sygnałowy JAK/STAT jest plejotropową drogą transdukcji sygnału dla wielu prozapalnych, proalergicznym i świądogennym cytokin (m.in. $IFN-\gamma$, IL-4 i IL-17), które są zaangażowane w patogenezę AZS, w rozumieniu czynników promujących rozwój tej choroby. Hamowanie zdolności limfocytów Th_1 , Th_2 czy Th_{17} do produkcji tych cytokin wydaje się być ważnym celem terapeutycznym dla leków przeciwalergicznym. Z drugiej strony regulacja w górę produkcji IL-10, a więc głównej cytokiny o działaniu przeciwzapalnym i immunosupresyjnym również może stanowić skuteczny mechanizm działania odpowiedzialny za skuteczność kliniczną leków przeciwalergicznym. W celu naświetlenia mechanizmów immunologicznym odpowiadających za skuteczność kliniczną OCL zbadano jego wpływ na zdolność do produkcji IL-4, IL-10, IL-17 i $IFN-\gamma$ przez limfocyty $T CD4^+$ i $CD8^+$, jak również na generowanie limfocytów Tr_1 .

Nie wykazano wpływu ekspozycji na OCL na odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów $T CD4^+$ i $CD8^+$ produkujących $IFN-\gamma$ oraz IL-17, a więc limfocytów, których fenotyp należy utożsamiać z komórkami Th_1 , Tc_1 , Th_{17} i Tc_{17} (praca 4.1.1.2.). Uzyskane wyniki wskazują, że OCL nie zahamował, ale też nie zwiększył produkcji $IFN-\gamma$ i IL-17 przez limfocyty $T CD4^+$ i $CD8^+$, tak więc efekt terapeutyczny leku najprawdopodobniej nie jest związany z hamowaniem produkcji tych dwóch cytokin prozapalnych przez te komórki.

Zanotowano jednak, że ekspozycja na OCL doprowadziła do zahamowania produkcji IL-4, zarówno przez limfocyty $T CD4^+$ (Th_2) jak i $CD8^+$ (Tc_2) (praca 4.1.1.2.). Biorąc pod uwagę patologiczną rolę IL-4 w rozwoju AZS, jak również w innych chorobach alergicznych, szlak sygnałowy tej cytokiny wydaje się być obiecującym potencjalnym celem terapeutycznym w leczeniu tych chorób (Chiricozzi i wsp. 2020). Mimo, że uważa się, że to limfocyty $T CD4^+$

są głównymi producentami IL-4 w odpowiedzi alergicznej, potwierdzono, że również limfocyty T CD8⁺ mogą być odpowiedzialne za nadprodukcję IL-4 w AZS. Wykazano bowiem, że AZS związane jest z przejściem do skóry nie tylko limfocytów Th₂, ale również limfocytów Tc₂, co zostało potwierdzone u ludzi (Czarnowicki i wsp. 2015) oraz u psów (Olivry i wsp. 1997, Sinke i wsp. 1997). Kaplan i wsp. (1999) wykazali, że powstawanie limfocytów Th₂ i Tc₂ jest zależne od białka STAT6. Wynika z tego, że zahamowanie szlaku JAK/STAT nie tylko może prowadzić do zablokowania sygnalizacji cytokinowej, ale również może hamować generowanie komórek produkujących te cytokiny. Uzyskane wyniki badań stanowiących przedmiotowe osiągnięcie wyraźnie wskazują, że hamowanie produkcji IL-4 przez limfocyty Th₂ i Tc₂ może stanowić jeden z mechanizmów odpowiedzialnych za przeciwalergiczne działanie OCL. Dodatkowo, biorąc pod uwagę fakt, że IL-4 odgrywa także ważną rolę w rozwoju astmy oskrzelowej (Nakagome & Nagata 2024), hamowanie produkcji tej cytokiny przez OCL może również przyczynić się do poszerzenia w przyszłości wskazań rejestracyjnych leku o inne choroby o podłożu alergicznym, chociażby o leczenie astmy oskrzelowej.

Wyniki badań przedstawione w pracy 4.1.1.2. wykazały również, że ekspozycja na OCL nieoczekiwanie prowadziła do regulacji w dół produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, a efekt ten był silnie wyrażony, ponieważ uzyskane wartości odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T IL-10⁺CD4⁺ i IL-10⁺CD8⁺ komórek po ich ekspozycji na wyższe stężenie leku stanowiły zaledwie kilkanaście procent wartości kontrolnych. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że OCL w wyższym stężeniu prawie całkowicie zahamował produkcję IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺. Podobne spadki zanotowano również w odsetku oraz liczbie bezwzględnej limfocytów Tr₁ po ekspozycji MCs na OCL, co również zostało przedstawione w pracy 4.1.1.2. Należy zaznaczyć, że limfocyty Tr₁ nie były obecne w kontrolnej niestymulowanej hodowli, co nie było zaskakującym faktem, gdyż ta subpopulacja limfocytów T reprezentuje indukowalne komórki regulatorowe, które są produkowane w odpowiedzi na aktywację limfocytów T (tj. w warunkach stymulacji) (Groux i wsp. 1997). Wyniki badań wskazują, że OCL raczej zapobiegł generowaniu limfocytów Tr₁, niż redukował ich liczbę, co pozostaje w łączności z wynikami wskazującymi, że lek regulował w dół indukowaną aktywacją ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺, upośledzając tym samym aktywację tych limfocytów. Tak więc, wraz z upośledzeniem aktywacji limfocytów T CD4⁺ w obecności OCL nie doszło również do generowania komórek Tr₁. Za aktywność regulatorową limfocytów Tr₁ (a więc zapobieganie odpowiedzi zapalnej i utrzymywanie tolerancji immunologicznej) w dużej mierze odpowiada produkcja IL-10 przez te komórki.

W świetle powyższych wyników można stwierdzić, że regulacja w dół produkcji IL-10, jak również zapobiegnięcie generowania limfocytów Tr₁ (tj. producentów tej cytokiny) w odpowiedzi na ekspozycję na OCL również pozostają ze sobą w związku. Tak więc, regulacja w górę produkcji IL-10 oraz generowanie limfocytów Tr₁, jak zakładała to hipoteza badawcza, nie stanowi jednego z mechanizmów odpowiedzialnych za immunosupresyjny efekt OCL. Wręcz przeciwnie, wyniki badań wykazały, że lek, który ma bezdyskusyjne działanie przeciwalergiczne, zapobiegł generowaniu limfocytów Tr₁ i produkcji ważnej przeciwzapalnej cytokiny. Być może efekt ten związany był w jakimś stopniu z zahamowaniem w szlaku JAK/STAT fosforylacji białek STAT1 oraz STAT3 poprzez zahamowanie kinazy JAK1 przez OCL, gdyż wykazano, że białka te są niezbędne nie tylko do indukcji produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ takie jak Th oraz Treg (Jankovic i wsp. 2010, Seif i wsp. 2017) ale również do produkcji samych limfocytów Tr₁ (Pot i wsp. 2011; Brockmann i wsp. 2017).

Wyniki przedstawione w pracy 4.1.1.2. były pierwszym doniesieniem w literaturze oceniającym wpływ OCL na produkcję cytokin przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺. W dostępnej literaturze znajduje się cytowana już wcześniej praca Banovic i wsp. (2019), w której wykazano, że ekspozycja psich PBMCs na OCL w stężeniu 0,5 i 1 μM (tj. stężeniu odpowiadającemu stężeniu terapeutycznemu osiąganemu w osoczu) nie wpłynęła na produkcję IL-2, IL-10, IL-15, IL-18, IFN-γ oraz TNF-α, natomiast ekspozycja na OCL w stężeniu 10 μM prowadziła do zahamowania produkcji IL-2, IL-15, IFN-γ i IL-18. Jak już podkreślono wcześniej, uzyskanych przez tych badaczy wyników nie da się porównać z uzyskanymi w badaniach stanowiących niniejsze osiągnięcie naukowe, gdyż w skład PBMCs wchodzi wiele różnych subpopulacji leukocytów, nie tylko limfocyty T. W roku 2023 Herrmann i wsp. opublikowali wyniki badań, gdzie nie wykazali wpływu OCL na produkcję IL-10 i TGF-β₁ w surowicy pozyskanej od psów chorych na AZS przy zastosowaniu rekomendowanej dawki leku. W tym przypadku także trudno porównać ze sobą uzyskane wyniki, gdyż w powyżej cytowanej pracy badano stężenie cytokin metodą immunoenzymatyczną (ELISA) w surowicy psów, natomiast w niniejszych badaniach oceniano wpływ OCL na liczbę bezwzględną konkretnych subpopulacji limfocytów T produkujących wybrane cytokiny metodą cytometrii przepływowej. Druga kwestia to czas terapii. Herrmann i wsp. (2023) oceniali poziom cytokin po 9-cio miesięcznej terapii, tak więc niektóre zmiany w początkowych etapach podawania OCL mogły nie być uchwycone. W badaniach nad innymi inhibitorami kinaz JAK Hammitzsch i wsp. (2018) wykazali, że tofacytynib (inhibitor kinaz JAK1 i JAK3), baricytynib oraz ruxolitynib (inhibitory kinaz JAK1 i JAK2) obniżały produkcję IL-17 przez limfocyty T CD4⁺,

podczas gdy w niniejszych badaniach OCL (inhibitor JAK1, JAK 2 i JAK3) nie wpłynął na produkcję tej cytokiny. Z kolei Ghoreschi i wsp. (2011) opisali zahamowanie produkcji IFN- γ przez mysie limfocyty T CD4⁺ w odpowiedzi na ekspozycję na tofacytynib. Z powyższej dyskusji wynika fakt, że mimo, że różne inhibitory JAK mogą hamować te same kinazy, wywierają jednak inny efekt na produkcję poszczególnych cytokin. Znajduje to potwierdzenie w pracy Seif i wsp. (2017), gdzie opisano, że białko STAT3 wzmacnia zarówno produkcję przeciwzapalnej IL-10 oraz prozapalnych IL-17 czy IL-6. Aktywacja STAT3 przez IL-10 różni się jednak od aktywacji tego samego białka przez IL-6. W szlaku sygnałowym IL-6 pośredniczy bowiem dodatkowo supresor sygnalizacji cytokin 3 (SOCS3; suppressor of cytokine signaling), podczas gdy nie ma to miejsca przy aktywacji IL-10. Należy wspomnieć, że o ile ścieżka sygnałowa cytokin JAK/STAT jest dość szczegółowo opisana, to jej zaangażowanie w regulację produkcji konkretnych cytokin nie zostało już tak dokładnie zbadane.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki wskazują, że regulacja w dół produkcji IL-4 przez limfocyty Th₂ i Tc₂ może stanowić kolejny mechanizm immunologiczny odpowiedzialny za przeciwalergiczne działanie leku. Natomiast, przeprowadzone badania nie wykazały, aby za efekt ten odpowiadał wpływ OCL na: (a) produkcję IFN- γ przez limfocyty Th₁ i Tc₁ oraz IL-17 przez limfocyty Th₁₇ i Tc₁₇; (b) regulacja w górę produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺; (c) generowanie komórek Tr₁. Niezależnie od naświetlenia mechanizmów immunologicznych stojących za skutecznością kliniczną leku należy dodać, że wywołana podaniem OCL regulacja w dół produkcji IL-4, a więc cytokiny, której funkcją jest przeciwdziałanie i zwalczanie zakażeń bakteryjnych i wirusowych, może być również rozpatrywana w kontekście niepożądanego wpływu na prawidłową odpowiedź immunologiczną, tj. upośledzenia odpowiedzi ze strony limfocytów Th₂ i Tc₂, stąd, i z tego względu, stosowanie leku u pacjentów z zakażeniami powinno być poprzedzone wyważeniem korzyści do ryzyka. Wyniki badań wpisują się głównie w realizację celu naukowego nr 2 i pozwalają rzucić światło nie tylko na mechanizmy leżące u podstaw skuteczności klinicznej leku, ale również na możliwości zastosowania OCL w przyszłości w leczeniu innych chorób, niż te, stanowiące wskazania rejestracyjne do jego stosowania.

Ocena wpływu OCL na poszczególne subpopulacje leukocytów w krwi obwodowej myszy i psów

W niniejszym zadaniu badawczym oceniono wpływ OCL na odsetek i liczbę bezwzględną poszczególnych populacji leukocytów, tj. eozynofilów, bazofilów, monocytów, neutrofilów i limfocytów w krwi obwodowej u zdrowych myszy oraz psów chorych na AZS. Wyniki

w zakresie wpływu OCL na poszczególne subpopulacje leukocytów w krwi psów (praca 4.1.1.4.) stanowią wartość dodaną (producent preparatu Apoquel określił je w CHPL), natomiast badanie oceniające wpływ leku na te parametry w krwi myszy (praca 4.1.1.3.) dostarcza nowych danych.

Wykazano, że podawanie OCL spowodowało spadek liczby bezwzględnej wszystkich badanych subpopulacji leukocytów, tj. eozynofilów, neutrofilów, bazofilów, monocytów oraz o czym wspomniano już wcześniej, limfocytów w krwi myszy po 14 dniowym podawaniu leku. Należy jednak podkreślić, że mimo zanotowania istotnego spadku, wszystkie średnie wartości badanych parametrów po podaniu OCL były nadal w zakresie referencyjnym, dlatego też nie wiadomo, czy wychwycone spadki liczebności leukocytów mają znaczenie kliniczne. Badając wpływ leku na te same subpopulacje leukocytów u psów wykazano, że 28-dniowa terapia OCL spowodowała jedynie spadek liczby bezwzględnej eozynofilów, nie wpływając na liczebność monocytów, neutrofilów, bazofilów oraz limfocytów. Zaskakująco, w 7 dniu podawania OCL zanotowano przejściowy wzrost liczby bezwzględnej całkowitej populacji limfocytów w krwi psów, co znalazło potwierdzenie również we wzroście liczby bezwzględnej limfocytów $T CD4^+$ i $CD8^+$, a co zostało opisane wyżej w punkcie: *Ocena wpływu OCL na odsetek i liczebność bezwzględną całkowitych populacji limfocytów $T CD4^+$ i $CD8^+$* . Na podstawie uzyskanych wyników można wywnioskować, że zanotowane różnice w odsetkach monocytów, neutrofilów i limfocytów w odpowiedzi na podawanie OCL były względne, tj. nie wynikały z rzeczywistych zmian w liczebności tych komórek, ale były jedynie konsekwencją pewnych zmian w proporcjach poszczególnych subpopulacji leukocytów. Ponieważ również w tym przypadku wszystkie średnie wartości badanych parametrów w odpowiedzi na podawanie OCL były w zakresie referencyjnym, można wnioskować, że miesięczne podawanie leku psom chorym na AZS nie wpływało na liczebność bazofilów, limfocytów, monocytów i neutrofilów w sposób istotny klinicznie. Należy jednak zaznaczyć, że średnia wartość liczby bezwzględnej eozynofilów przed podaniem leku u psów prawie osiągnęła górny przedział zakresu referencyjnego (a u dwóch psów znacznie go przekroczyła), natomiast po podaniu OCL istotnie spadła. Biorąc pod uwagę kluczową rolę eozynofilów w patogenezie zmian skórnych u pacjentów z AZS (Plager i wsp. 2012), redukcja/normalizacja liczby tych komórek w odpowiedzi na leczenie OCL nie powinna być rozważana jako działanie niepożądane leku, ale raczej jako efekt korzystny, tj. mający udział w efekcie terapeutycznym leku u pacjentów AZS.

Producent preparatu Apoquel twierdzi w CHPL, że obniżenie liczby leukocytów obserwowane u psów nie miało postępującego charakteru i dotyczyło wszystkich leukocytów z wyjątkiem limfocytów; żadne zmiany nie były istotne z klinicznego punktu widzenia. W roku 2022 Denti i wsp. opublikowali pracę, w której również wykazano, że OCL spowodował spadek liczby bezwzględnej neutrofilii, eozynofili i monocytów, natomiast cytując autorów, żadna zmiana nie miała znaczenia klinicznego i nie była powodem do modyfikacji dawki leku. W prawdzie uzyskane w przedmiotowym doniesieniu wyniki różnią się od tych uzyskanych przez innych autorów oraz producenta leku, to biorąc pod uwagę fakt, że zarówno u myszy, jak i u psów wszystkie uzyskane wartości badanych parametrów znajdowały się w zakresie referencyjnym, należy wyciągnąć podobny wniosek, tj., że żadne zmiany nie były istotne z klinicznego punktu widzenia.

Wniosek końcowy niniejszego zadania badawczego: Uzyskane wyniki wskazują, że w zakresie wpływu OCL na liczebność poszczególnych subpopulacji leukocytów w krwi, miesięczna terapia lekiem wydaje się być bezpieczna, gdyż wszystkie wartości badanych parametrów pozostają w zakresie referencyjnym, a uchwycone zmiany nie są istotne z klinicznego punktu widzenia. Dodatkowo, redukcja/normalizacja liczby eozynofili w krwi psów w odpowiedzi na leczenie OCL może być rozpatrywana w kontekście jednego z elementów mechanizmu przeciwalergicznego działania leku, stojącego za skutecznością terapeutyczną OCL w leczeniu AZS. Uzyskane wyniki wpisują się przede wszystkim w realizację celu nr 1 niniejszych badań, ale ustalenia dotyczące wpływu leku na eozynofile również rzucają światło na kwestie ustalenia całokształtu mechanizmów immunologicznych odpowiedzialnych za działanie terapeutyczne leku.

4.1.2.7. Wnioski końcowe osiągnięcia

Przeprowadzone badania miały na celu poszerzenie stanu wiedzy na temat bezpieczeństwa stosowania OCL u psów w kontekście możliwości negatywnego wpływu leku na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺, jak również zbadanie wpływu OCL na regulatorowe i efektorowe limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ w aspekcie ich zaangażowania w mechanizmy immunologiczne leżące u podstaw skuteczności klinicznej leku. W badaniach stanowiących przedmiotowe osiągnięcie naukowe wykazano pewne mechanizmy immunosupresyjnego działania OCL, które z jednej strony mogą być odpowiedzialne za skuteczność kliniczną leku, tj. efekt przeciwalergiczny i przeciwzapalny, ale z drugiej strony również za działanie immunosupresyjne leku w znaczeniu negatywnym tj. uspasabiającym pacjentów do zakażeń i chorób nowotworowych. W zdecydowanej większości ustalenia uzyskane w niniejszych badaniach na temat wpływu

OCL na limfocyty T i B, stanowią pierwsze doniesienia w tym zakresie. Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć trzy główne wnioski:

- ❖ Zważywszy na kluczowe znaczenie limfocytów T i B w efektywnej odpowiedzi immunologicznej na patogeny, takie działania leku jak (a) efekt deplecyjny OCL wobec limfocytów T i B; (b) efekt proapoptotyczny leku wobec limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺; (c) efekt antyproliferacyjny wobec limfocytów T CD8⁺; (d) regulacja w dół ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach Teff CD4⁺; (e) regulacja w dół produkcji IL-4 przez limfocyty Th₂ i Tc₂, należy uznać jako możliwe mechanizmy immunologiczne odpowiadające za działanie immunosupresyjne leku w znaczeniu negatywnym, tj. powodującym zwiększenie podatności pacjentów na zakażenia w trakcie stosowania leku.
- ❖ Efekt immunosupresyjny warunkujący skuteczność kliniczną OCL, może wynikać z wyzwalania/uruchamiania przez lek następujących mechanizmów immunologicznych: (a) redukcja liczebności limfocytów Teff CD4⁺, a być może i CD8⁺ oraz limfocytów B, zaangażowanych w patogenezę AZS; (b) indukcja apoptozy limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ zaangażowanych w patogenezę AZS; (c) zahamowanie proliferacji limfocytów T CD8⁺ zaangażowanych w patogenezę AZS; (d) generowanie komórek iTreg CD4⁺; (e) regulacja w dół ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach Teff CD4⁺, a przez to upośledzenie aktywacji limfocytów T CD4⁺; (f) regulacja w dół produkcji IL-4 przez limfocyty Th₂ lub Tc₂; (g) redukcja/normalizacja liczby eozynofili w krwi obwodowej. Ustalenie, czy powyższe mechanizmy immunologiczne są konsekwencją bezpośredniego mechanizmu działania leku, tj. hamowania kinaz JAK, czy też innych mechanizmów, wymaga przeprowadzenia dalszych badań.
- ❖ Uzyskane wyniki wskazują, że OCL (a) nie wywiera działania antyproliferacyjnego wobec limfocytów T CD4⁺; (b) nie wpływa na regulację produkcji IFN-γ i IL-17 przez limfocyty Th₁, Tc₁, Th₁₇ i Tc₁₇; (c) nie wpływa na regulację produkcji IL-10 przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ i (d) nie generuje komórek Tr₁, lecz może zapobiegać ich powstawaniu w odpowiedzi na aktywację limfocytów T. Biorąc to pod uwagę, działanie przeciwalergiczne i związana z nim skuteczność kliniczna OCL nie wydaje się być w związku, ani z wpływem leku na produkcję IFN-γ, IL-10 czy IL-17 przez wyżej wymienione komórki, ani z generowaniem komórek Tr₁.

Wyniki przedmiotowych badań nie tylko poszerzyły wiedzę na temat mechanizmów immunosupresyjnego działania OCL, ale również rzuciły światło na bezpieczeństwo stosowania leku w aspekcie jego wpływu na limfocyty T i B. Częstotliwość diagnozowania

chorób dermatologicznych o podłożu alergicznym ciągle wzrasta, a ich leczenie staje się wyzwaniem. Wiedza na temat mechanizmów immunologicznych wyzwalanych/uruchamianych przez OCL może pozwolić w przyszłości na rozszerzenie wskazań leku o inne choroby o podłożu alergicznym (np. astma oskrzelowa). Całokształt uzyskanych wyników wskazuje, że podejmując decyzję o rozpoczęciu leczenia psów z zastosowaniem OCL lekarz weterynarii powinien rozważyć współczynnik korzyści do ryzyka, szczególnie u pacjentów cierpiących na infekcje bakteryjne, wirusowe czy pasożytnicze oraz u pacjentów z immunosupresją. Natomiast u pacjentów leczonych OCL, stosowanie leku powinno odbywać się z należytą ostrożnością, tj. psy otrzymujące go powinny być monitorowane pod kątem rozwoju zakażeń oraz chorób nowotworowych.

4.2. Omówienie pozostałych osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.2.1. Osiągnięcie pt. *„Badania nad wpływem tigecykliny na liczebność komórek regulatorowych o fenotypie $Foxp3^+CD25^+CD4^+$ oraz na zdolność do produkcji wybranych cytokin przez limfocyty $T CD4^+$ i $CD8^+$ ”*

Po uzyskaniu stopnia doktora i odbyciu stażu zagranicznego w Japonii rozpoczęłam nowy nurt badań, tj. badania z zakresu immunofarmakologii. Pierwsze z nich dotyczyły zbadania wpływu tigecykliny (TIG), tj. pierwszej glicylocykliny z grupy tetracyklin, w aspekcie możliwości wywierania przez nią działania immunosupresyjnego i przeciwzapalnego poprzez wpływ na zdolność do produkcji wybranych cytokin przez limfocyty T, jak i poprzez możliwość indukcji komórek regulatorowych o fenotypie $Foxp3^+CD25^+CD4^+$. Uzasadnieniem dla przeprowadzenia tego badania było przede wszystkim to, że potwierdzone jest, że inne tetracykliny wykazują takie działanie (Sun i wsp. 2015). Należy wyjaśnić, że efekt przeciwzapalny antybiotyku, tj. wywieranie łącznego działania przeciwbakteryjnego i przeciwzapalnego, bywa korzystny w niektórych sytuacjach klinicznych (von Seth i wsp. 2015). Z drugiej jednak strony, hamowanie odpowiedzi immunologicznej w przypadku niektórych zakażeń, szczególnie u pacjentów z immunosupresją, może wpływać niekorzystnie na zwalczanie zakażenia przez odpowiednie komórki immunokompetentne. Przeprowadzone badania nie wykazały wpływu ekspozycji hodowli limfocytarnych na TIG, zastosowaną w stężeniu odzwierciedlającym jej stężenie terapeutyczne osiąganę w osoczu, na liczbę bezwzględną całkowitych populacji limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ oraz na liczbę bezwzględną limfocytów Treg o fenotypie $Foxp3^+CD25^+CD4^+$; nie wykazano również wpływu TIG na odsetek komórek $Foxp3^+$ w obrębie populacji komórek $CD25^+CD4^+$, co wskazuje, że lek nie wpływa na ekspresję $Foxp3$ w limfocytach T $CD4^+$. Nie wykazano ponadto, aby ekspozycja na TIG wpływała na zdolność do produkcji przez limfocyty T $CD4^+$ kluczowych cytokin o działaniu przeciwzapalnym, tj. IL-4, przeciwzapalnym i immunosupresyjnym, tj. IL-10 i TGF- β oraz prozapalnym, tj. IL-17, a ponadto nie wpływała na zdolność do produkcji innej ważnej cytokiny prozapalnej, tj. IFN- γ , przez limfocyty T $CD8^+$.

Na podstawie uzyskanych badań wyciągnięto wnioski, że TIG nie wywiera działania przeciwzapalnego ani immunosupresyjnego w zakresie ocenianych parametrów (co nie wyklucza, że może wywierać takie działanie w innych sposób). Brak takiego oddziaływania może być uznany za korzystny lub niekorzystny, w zależności od tego czy byłby on pożądanym,

czy też nie. Zależy to bowiem od konkretnej sytuacji klinicznej, tj. od rodzaju i ciężkości zakażenia bakteryjnego, natężenia towarzyszącej mu reakcji zapalnej i statusu immunologicznego pacjenta. Wyniki niniejszych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Jaroszewski J.J, Maślanka T. *Effect of tigecycline on the production of selected cytokines and counts of murine CD4⁺ and CD8⁺ T cells - in vitro study*. Pol J Vet Sci 2018, 21: 819-822. **Punktacja MNiSW₂₀₁₈ = 20; IF₂₀₁₈ = 0,802**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonywanie doświadczeń, wykonywanie analiz cytometrycznych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami, korekta manuskryptu po recenzji oraz edycja jego wersji ostatecznej. Byłam autorem korespondencyjnym niniejszej publikacji.

4.2.2. Osiągnięcie pt. „Badania nad wpływem teryflunomidu na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ psa w aspekcie ich udziału w mechanizmach immunologicznych odpowiedzialnych za immunosupresyjne działanie leku”

Innymi badaniami, które lokują się w nurcie immunofarmakologii, a które mogę przedstawić, jako swoje osobiste osiągnięcie naukowe, były badania nad wpływem teryflunomidu (TER), leku immunomodulującego będącego aktywnym metabolitem leflunomidu (LEF), na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ psa. Około roku 2000 zaczęły pojawiać się w literaturze doniesienia potwierdzające efektywność działania immunosupresyjnego LEF u psów ze zdiagnozowanymi chorobami immunologicznymi lub stanem zapalnym (Affolter & Moore 2000; Colopy i wsp. 2010; Chesne i wsp. 2024). LEF wszedł do leczenia chorób autoimmunologicznych u psów, ponieważ częstotliwość występowania tych chorób narasta, a rutynowe metody ich leczenia nie zawsze są skuteczne, co zmusza lekarzy do poszukiwania nowych opcji terapeutycznych. Liczne wyniki badań potwierdziły skuteczność LEF w leczeniu u psów takich chorób jak: zapalenie wielostawowe o podłożu immunologicznym (Jacques i wsp. 2002; Colopy i wsp. 2010; Chesne i wsp. 2024), zapalenie naczyńówki o podłożu immunologicznym (Kim 2024), niedokrwistość hemolityczna o podłożu immunologicznym (Lim i wsp. 2022), małopłytkowość o podłożu immunologicznym (Affolter & Moore 2000) oraz polipy zapalne jelita grubego (Fukushima i wsp. 2016). Potwierdzono również skuteczny efekt immunosupresyjny leku po przeszczepie nerki u psów, przy niewielkiej ilości działań niepożądanych (Sato i wsp. 2017).

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszym osiągnięciu było ustalenie - w wybranych aspektach - udziału limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ w mechanizmach immunologicznych uruchamianych przez TER, a odpowiadających za immunosupresyjne działanie leku, a tym samym za jego skuteczność kliniczną. Niezależnie od tego, uzyskane wyniki rzuciły także światło na wpływ TER na limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ psa w kontekście możliwości jego negatywnego oddziaływania na te komórki.

Przyjęte jest, że mechanizm działania TER odpowiadający za jego działanie immunosupresyjne/lecnicze w chorobach i zaburzeniach autoimmunologicznych polega na hamowaniu dehydrogenazy dihydroorotanowej (DHODH), enzymu występującego w mitochondriach, co prowadzi do hamowania syntezy pirymidyny niezbędnej do proliferacji aktywowanych – w założeniu autoreaktywnych - limfocytów T i B (proliferaacja limfocytów spoczynkowych ma być niezakłócona, ponieważ nie wymagają do tego procesu pirymidyny syntezowanej *de novo*) (Cherwinski i wsp. 1995, Ransom i wsp. 1995). Wydaje się jednak, że sposób działania TER nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Dostępne są wyniki badań wskazujących, że takie mechanizmy jak hamowanie JAK1, JAK2 i JAK3 (Xu i wsp. 1995; Siemasko i wsp. 1998; Korn i wsp. 2001; González-Alvaro i wsp. 2009) lub hamowanie aktywności jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-κB) (Manna & Aggarwal 1999) i cyklooksygenazy (COX) 2 (Hamilton i wsp. 1999) mogą być również zaangażowane w indukcję immunomodulującego działania TER.

W momencie rozpoczęcia badań opisanych w niniejszym osiągnięciu, dostępne dane dotyczące wpływu TER na układ immunologiczny psów ograniczały się do publikacji Nafe i wsp. (2014), w której oceniono tylko wpływ leku na proliferację limfocytów T. Biorąc pod uwagę fakt, że TER jest obiecującym lekiem do terapii chorób o podłożu immunologicznym u psów, uzasadnione wydało się przeprowadzenie badań, które wyjaśniałyby wpływ tego leku na limfocyty T u psów w odniesieniu do udziału tych komórek w mechanizmach immunologicznych uruchamianych przez TER, a odpowiadających za działanie immunosupresyjne, a tym samym za jego skuteczność kliniczną. Wybór tego problemu naukowego był podyktowany faktem, że limfocyty T CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w patogenezie chorób alergicznych i autoimmunologicznych, w znaczeniu zarówno „promotorów” (limfocyty Teff), jak i „hamulców” (limfocyty Treg) rozwoju tych chorób. Ponadto, Tsai i wsp. (2008) wykazali, że również limfocyty T CD8⁺ przyczyniają się do patogenyzy kilku zwierzęcych modeli chorób autoimmunologicznych. Uzyskane wyniki w przedmiotowych badaniach, choć dotyczą komórek psa, to wykraczają poza zakres nauk

weterynaryjnych, ponieważ poszerzyły ogólną wiedzę na temat mechanizmów działania i efektów immunologicznych odpowiedzialnych za immunosupresyjne działanie TER.

We wcześniejszych badaniach własnych (publikacja 4.1.1.1. pierwszego osiągnięcia) wykazano, że jeden z mechanizmów immunologicznych, które mogą odpowiadać za działanie lecznicze OCL, a więc inhibitora JAK1, z pewnym działaniem hamującym wobec JAK2 i JAK3, polega na regulacji w dół ekspresji cząsteczki CD25 na powierzchni limfocytów Teff CD4⁺, i w ten sposób może upośledzać aktywację tych komórek i powiązaną z tym odpowiedź immunologiczną. W świetle tego, że TER, niezależnie od głównego mechanizmu działania, tj. inhibicji DHODH, również wywiera działanie hamujące na JAK1, JAK2 i JAK3 (Xu i wsp. 1995; Siemasko i wsp. 1998; Korn i wsp. 2001; González-Alvaro i wsp. 2009) – choć ta kwestia, co ciekawe, jest relatywnie rzadko podnoszona – w niniejszych badaniach postawiono hipotezę, że TER, analogicznie jak OCL, może regulować w dół ekspresję cząsteczki CD25 na powierzchni limfocytów Teff CD4⁺ i CD8⁺.

Druga hipoteza postawiona w tych badaniach brzmiała: TER może generować komórki Treg o fenotypie Foxp3⁺CD4⁺ poprzez indukcję ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ Foxp3-negatywnych. Uzasadnieniem dla tej hipotezy były wyniki badań Ochoa-Repáraz i wsp. (2016), które sugerowały, że lek może wywierać takie działanie. Biorąc pod uwagę powyższe oraz fakt, że farmakologiczna indukcja komórek Treg o fenotypie Foxp3⁺CD4⁺ i Foxp3⁺CD8⁺ (tj. iTreg) może stanowić strategię/możliwość leczenia chorób autoimmunologicznych, za wartę ustalenia uznano przeprowadzenie badań naświatlających kwestię tego, czy TER może indukować ekspresję Foxp3 w limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺ psa i czy zależy to od stanu aktywacyjnego komórki, czy też nie.

Działanie terapeutyczne niektórych leków immunosupresyjnych można przypisać również ich działaniu proapoptotycznemu na limfocyty T (Distelhorst 2002). Mając na uwadze to, że wykazano działanie proapoptotyczne TER na niektóre linie komórkowe (Ringshausen i wsp. 2008, Jiang i wsp. 2018), uznano, że warto zbadać, czy działanie immunosupresyjne TER może być związane z indukcją apoptozy limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. W związku z tym, trzecim problemem podjętym w niniejszych badaniach było określenie wpływu TER na apoptozę limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ psa.

W celu zweryfikowania powyższych hipotez, przeprowadzono badania oceniające wpływ TER na:

- a) odsetek limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję CD25 w warunkach *in vitro* z towarzyszącą aktywacją limfocytów; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na TER z towarzyszącą stymulacją (hodowla 24 godz.);
- b) odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję Foxp3 w warunkach *in vitro* z towarzyszącą aktywacją limfocytów; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na TER z towarzyszącą stymulacją (hodowla 24 godz.);
- c) odsetek i liczbę bezwzględną limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję Foxp3 oraz całkowitych populacji tych komórek w warunkach *in vitro* bez towarzyszącej aktywacji limfocytów; badania te polegały na ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na TER (hodowla 96 godz.);
- d) odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, a więc komórek o fenotypach Annexin⁺7AAD⁻CD4⁺ i Annexin⁺7AAD⁻CD8⁺; badania te polegały na 12 godzinnej ekspozycji PBMCs pozyskanych od zdrowych psów na TER bez towarzyszącej aktywacji limfocytów (a więc przy braku ich proliferacji).

W niniejszych badaniach wykazano, że ekspozycja hodowli psich PBMCs na TER zastosowany w stężeniu odzwierciedlającym stężenie, jakie może uzyskiwać w osoczu przy stosowaniu go w dawkach rutynowych/terapeutycznych:

- zapobiegała wywołanej aktywacją indukcji ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD4⁺;
- nie zapobiegła, ale silnie ograniczyła wywołaną aktywacją indukcję ekspresji cząsteczki CD25 na limfocytach T CD8⁺;
- wywołała zwiększenie odsetka limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję czynnika Foxp3 w warunkach stymulacji/aktywacji limfocytów;
- wywołała zmniejszenie odsetka i liczby bezwzględnej limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję czynnika Foxp3 w warunkach braku stymulacji/braku aktywacji limfocytów;
- nie wpłynęła na odsetek i liczbę bezwzględną całkowitych populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ (w warunkach braku aktywacji limfocytów);
- nie wpłynęła na odsetek komórek wczesnoapoptotycznych wśród limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, a więc komórek o fenotypach Annexin⁺7AAD⁻CD4⁺ i Annexin⁺7AAD⁻CD8⁺.

Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizm odpowiadający za immunosupresyjne działanie TER może nie być związany wyłącznie z hamowaniem proliferacji aktywowanych limfocytów

T i B poprzez blokowanie syntezy pirymidyny. Jak już to wcześniej opisano, indukcja ekspresji CD25 na limfocytach T jest równoznaczna z posiadaniem przez nie receptora o wysokim powinowactwie dla tej cytokiny, a tym samym nadaje komórce zdolność do intensywnego wychwytu IL-2 ze środowiska. Powiązanie IL-2 z receptorem o wysokim powinowactwie prowadzi do aktywacji i proliferacji limfocytów T i do ich różnicowania w odpowiednie subpopulacje komórek Teff i pamięci (Liao i wsp. 2013). Regulacja w dół ekspresji CD25 na komórkach Teff sprawia, że nie reagują one na IL-2, co może ograniczać autokryne i parakryne funkcje zależne od IL-2, w tym przede wszystkim proliferację limfocytów T (Cabrera i wsp. 2010). TER zapobiegał lub zmniejszał indukowaną aktywacją ekspresję CD25 na limfocytach T CD4⁺ i CD8⁺. Dlatego też, biorąc pod uwagę kluczową rolę CD25 w proliferacji limfocytów T, takie oddziaływanie może stanowić mechanizm odpowiedzialny za antyproliferacyjne działanie leku. Logiczna jest więc konkluzja, że uzyskane wyniki wskazują, iż mechanizmem odpowiedzialnym za działanie antyproliferacyjne TER nie jest wyłącznie hamowanie syntezy pirymidyny, ale również upośledzanie wychwytu IL-2, a więc cytokiny będącej „kołem napędowym” proliferacji tych komórek.

W warunkach stymulacji TER indukował ekspresję Foxp3 w limfocytach T Foxp3-ujemnych CD4⁺ i CD8⁺, jednocześnie zmniejszając ją w warunkach niestymulowanych. Wyniki te mocno sugerują, że TER może generować komórki iTreg, ale proces ten wymaga aktywacji limfocytów T. Takie wyniki pozwalają na postawienie kolejnych hipotez, a mianowicie że TER może generować komórki iTreg tylko u pacjentów chorujących na choroby o podłożu immunologicznym przebiegające z aktywacją limfocytów T i tylko w kompartmentcie immunologicznym/mikrośrodowisku immunologicznym objętym procesem chorobowym, zaś w każdych innych warunkach może regulować w dół ekspresję Foxp3 na naturalnie występujących komórkach Treg.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że działanie terapeutyczne TER nie jest związane z wpływem na apoptozę limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺, natomiast upośledzenie ekspresji CD25 podczas aktywacji tych limfocytów oraz generowanie komórek iTreg mogą stanowić dodatkowe, tj. poza hamowaniem DHODH, mechanizmy immunologiczne odpowiadające za immunosupresyjne działanie TER.

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ **Jasiecka-Mikołajczyk A, Socha P.** *Teriflunomide inhibits activation-induced CD25 expression on T cells and may affect Foxp3-expressing regulatory T cells.* Res Vet Sci 2020, 132: 17-27. **Punktacja MNiSW₂₀₂₀ = 100; IF₂₀₂₀ = 2,534**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie i wykonywanie doświadczeń, wykonywanie analiz cytometrycznych, analiza i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami, korekta manuskryptu po recenzji oraz edycja jego wersji ostatecznej. Byłam autorem korespondencyjnym niniejszej publikacji.

4.2.3. Osiągnięcie pt. „Ocena i porównanie indywidualnego oraz łącznego stosowania wybranych substancji pod kątem ich zdolności do generowania komórek regulatorowych z populacji limfocytów T CD8⁺ – badania *in vitro*”

Kontynuując badania nad wpływem TER na limfocyty T, wraz z prof. dr hab. Tomaszem Maślanką prowadziłam szersze badania nad wpływem IL-27, TER i kwasu całkowicie trans-retinowego (ATRA) na limfocyty T CD8⁺ pod kątem zdolności do generowania przez te substancje limfocytów Treg z tej populacji (tj. komórek o fenotypie CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD122⁺CD49d^{low} i CD8⁺Foxp3⁺CD103⁺) i/lub zwiększania ich właściwości supresorowych poprzez zwiększenie ekspresji CD39 oraz produkcji TGF-β (w odniesieniu do komórek CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺) i IL-10 (w odniesieniu do komórek CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD8⁺Foxp3⁺CD103⁺). Celem naukowym tych badań było wstępne określenie, która z badanych substancji ma największy potencjał do generowania określonego typu komórek Treg oraz czy w tym zakresie istnieje między nimi synergizm. Wyniki tych badań stanowią punkt wyjścia do dalszych badań nad samodzielnym i łącznym stosowaniem tych substancji w zapobieganiu i leczeniu chorób alergicznych i autoimmunologicznych. Tym samym mogą być podstawą do dalszych badań z użyciem mysiego modelu tego typu chorób, np. modelu stwardnienia rozsianego, reumatoidalnego zapalenia stawów czy astmy alergicznej. Wyniki badań wykazały, że ekspozycja hodowli na IL-27 indukowała ekspresję CD39 na komórkach CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, zwiększała zdolność komórek CD8⁺Foxp3⁺CD103⁺ do produkcji IL-10 oraz zwiększała liczbę bezwzględną komórek CD8⁺Foxp3⁺CD103⁺IL-10⁺. Ekspozycja hodowli na TER indukowała ekspresję Foxp3 w komórkach CD8⁺CD25⁺ i ekspresję CD103 na komórkach CD8⁺Foxp3⁺ oraz zwiększała liczbę bezwzględną komórek CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺. Z kolei ekspozycja hodowli na ATRA zwiększała zdolność komórek CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ do produkcji IL-10. Wykazano następujące interakcje między IL-27 i ATRA: (a) silny synergistyczny (hiperaddycja) efekt w zakresie indukcji ekspresji CD39 na komórkach CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ i zwiększenia zdolności produkcji IL-10 przez te komórki; (b) synergistyczny efekt w zakresie zwiększenia liczebności bezwzględnej komórek CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺CD39⁺. Badania wykazały, że ekspozycja hodowli na TER znosiła wyżej

opisane efekty indukowane przez IL-27 i ATRA. Podsumowując, żadna z kombinacji badanych substancji nie była zdolna do generowania tzw. komórek „super Treg” o fenotypie $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ i $CD8^+Foxp3^-CD103^+$, tj. komórek o takim fenotypie, ale ze zwiększoną zarówno ekspresją CD39 jak i produkcją IL-10. W kontekście możliwości farmakologicznej indukcji komórek $CD8^+CD25^+Foxp3^+CD39^+IL-10^+$ i $CD8^+Foxp3^-CD103^+IL-10^+$, uzyskane wyniki wskazują, że kombinacja TER z IL-27 i/lub ATRA nie przyniosła żadnych korzyści w porównaniu do stosowania samego TER lub kombinacji IL-27 i ATRA. Co więcej, taka kombinacja zniosła korzystne efekty indukowane przez IL-27 i ATRA i ich kombinację. Dlatego w tych badaniach postawiono hipotezę, że aby uzyskać komórki „super Treg”, tj. komórki o fenotypie $CD8^+CD25^+Foxp3^+CD39^+IL-10^+$, w pierwszej kolejności należałoby eksponować limfocyty na działanie TER w celu indukcji ekspresji Foxp3 w Foxp3-negatywnych limfocytach $CD8^+$, a następnie zaprzestać poddawać je działaniu TER, natomiast poddać je ekspozycji na kombinację IL-27 i ATRA w celu indukcji ekspresji na nich CD39 i produkcji przez nie IL-10. Zweryfikowanie tej hipotezy, wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Maślanka T, **Jasiecka-Mikołajczyk A.** *Teriflunomide induces Foxp3 expression in murine $CD8^+T$ cells while IL-27 and retinoic acid exert a synergistic effect on the induction of CD39 expression on these cells.* Pol J Vet Sci 2023, 26: 591-609. **Punktacja MEiN₂₀₂₃ = 100; IF₂₀₂₃ = 0,800**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w opracowaniu koncepcji badań, wykonywanie doświadczeń, udział w analizie cytometrycznej, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.

4.3. Osiągnięcie naukowe przedstawione w pracy magisterskiej pt. „*Badania nad wchłanianiem się simwastatyny z przewodu pokarmowego indyków*”

Badania te prowadziłam jeszcze w trakcie studiów magisterskich na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie w latach 2009-2010. Simwastatyna (SIM), statyna I generacji, jest zarejestrowana jedynie do stosowania u ludzi, a jej wskazania rejestracyjne obejmują leczenie mieszanej dyslipidemii, pierwotnej hipercholesterolemii oraz homozygotycznej hipercholesterolemii rodzinnej. Jeżeli chodzi o możliwe zastosowanie tych leków w przyszłości również w medycynie weterynaryjnej, wydaje się, że największe możliwości zastosowania ze wszystkich statyn, ze względu na budowę i mechanizm działania ma SIM (Glińska i wsp. 2006). Badania przeprowadzone przez Davis i wsp. (2003) wykazały, że podawanie SIM psom żywionym karmą bogatotłuszczową powodowało obniżenie poziomu cholesterolu o 36% w porównaniu z grupą kontrolną. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Elkin i wsp. (1999) wykazano, że SIM podawana kurom nioskom redukowała stężenie cholesterolu w jajach, wątrobie i osoczu zwierząt. Bardzo możliwe więc, że w przyszłości SIM znajdzie zastosowanie nie tylko w leczeniu hipercholesterolemii psów czy kotów. Biorąc pod uwagę fakt, że wysokie stężenie cholesterolu może przyczyniać się do miażdżycy czy choroby niedokrwiennej serca u ludzi, spożywanie jaj o niższej zawartości cholesterolu w przyszłości mogłoby być jednym z elementów profilaktyki zapobiegania wyżej wymienionym chorobom.

W związku z brakiem doniesień oceniających farmakokinetkę SIM u drobiu wraz z Prof. dr hab. Jerzym Jaroszewskim podjęliśmy się przeprowadzenia badań mających na celu ocenę wybranych parametrów farmakokinetycznych SIM w osoczu u indyków, co pozwoliło jednocześnie odpowiedzieć na pytanie, czy SIM wchłania się z przewodu pokarmowego po podaniu *per os*. W przeprowadzonych badaniach wykazano stosunkowo szybki czas wystąpienia C_{max} SIM w osoczu, co wskazuje na dobre wchłanianie leku z przewodu pokarmowego ptaków. Wartości uzyskanych badanych parametrów farmakokinetycznych SIM u indyków były częściowo zbieżne z wartościami określonymi u ludzi. W niniejszych badaniach podawano indykom dawkę 2, 4 lub 6 mg/kg m.c., natomiast na podstawie danych literaturowych (Elkin i wsp. 1999) należy wnioskować, że aby doszło do obniżenia poziomu cholesterolu w jajach, dawki tej statyny powinny być o wiele wyższe i wynosić co najmniej 60 mg/kg m.c. Ustalenie dawki leku, która z jednej strony byłaby bezpieczna dla zwierząt, a z drugiej strony pozwoliłaby na obniżenie stężenia cholesterolu w jajach wymagałoby przeprowadzenia o wiele szerszych badań. Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ **Jasiecka A**, Grabowski T, Maślanka T, Ziółkowski H, Jaroszewski J.J. *Pharmacokinetics of orally administered simvastatin in turkeys*. Pol J Vet Sci 2013, 16: 377-379. **Punktacja MNiSW₂₀₁₃ = 20; IF₂₀₁₃ = 0,712**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowanie i wykonywanie doświadczeń, analiza i interpretacja uzyskanych wyników oraz napisanie manuskryptu.

4.4. Osiągnięcie naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej pt. „*Badania nad farmakokinetyką tigecykliny podanej różnymi drogami u indyków*”

Nie ulega wątpliwości, że cały czas poszukuje się nowych leków przeciwbakteryjnych, między innymi z grupy tetracyklin, które mogłyby zastąpić te substancje czynne, wobec których pojawiła się oporność. Szczególnie obiecującym antybiotykiem wydała się być tigecyklina (TIG), a więc lek z grupy tetracyklin, będący jednocześnie pierwszą glicylocykliną, wprowadzoną do terapii zakażeń bakteryjnych u ludzi. W chwili opracowywania koncepcji badawczej dostępne były jedynie pojedyncze publikacje na temat farmakokinetyki tego leku u człowieka, szczura i królika, po podaniu dożylnym i dootrzewnowym. W dostępnych bazach danych brak było jakichkolwiek informacji na temat wchłaniania TIG z przewodu pokarmowego ludzi oraz zwierząt, co stanowiło istotną lukę w wiedzy. Biorąc pod uwagę powyższe, celem naukowym przeprowadzonych badań było poznanie właściwości farmakokinetycznych TIG, co jest niezbędne dla optymalnego ustalenia dawkowania, a tym samym skuteczności antybiotykoterapii. W związku z powyższym w omawianych badaniach sformułowano następujące cele badawcze: (a) opracowanie nowej, czułej i specyficznej metody oznaczania TIG w osoczu indyków za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS); (b) określenie właściwości farmakokinetycznych TIG u indyków po podaniu dożylnym, domięśniowym, podskórnym oraz *per os*. W niniejszych badaniach wykazano, że TIG wchłaniała się po podaniu domięśniowym i podskórnym w ok. 34%, zaś po podaniu *per os* jej biodostępność wynosiła zaledwie 1%. Uzyskane wyniki wykazały, że lek podany domięśniowo i podskórnym w dawce 10 mg/kg m.c., jak również podany dożylnie, osiągał stężenia terapeutyczne w osoczu indyków wobec wielu patogenów odpowiedzialnych za wywoływanie zakażeń bakteryjnych u tego gatunku. Analiza PK/PD w oparciu o uzyskane wyniki i wrażliwość wybranych patogenów na TIG wykazała, że po podaniu leku drogą domięśniową, podskórną i dożylną współczynnik $AUC_{0 \rightarrow t} / MIC_{90}$ (pole powierzchni pod krzywą od 0 do t) / (minimalne stężenie hamujące) przekroczył wartość wymaganą dla skutecznej terapii wobec takich patogenów jak: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Enterococcus avium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Shigella spp.*, *Clostridium perfringens* i *Mycoplasma pneumoniae*. Ponadto, lek podany dożylnie powinien wykazywać skuteczność wobec takich patogenów, jak *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* oraz *Staphylococcus aureus*. Po podaniu *per os* TIG współczynnik

AUC_{0→t}/MIC₉₀ nie osiągnął wartości terapeutycznej wobec żadnego z wymienionych patogenów. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

- opracowana metoda oznaczania TIG przy użyciu metody HPLC-MS/MS spełniła kryteria walidacyjne i pozwala na oznaczanie niskich stężeń leku w osoczu indyków;
- TIG podana indykom parenteralnie charakteryzuje się długim okresem półtrwania oraz dużą objętością dystrybucji, co kwalifikuje ją jako antybiotyk długodziałający;
- TIG podana domięśniowo i podskórnie charakteryzuje się podobnymi właściwościami farmakokinetycznymi u indyków;
- TIG podana indykom parenteralnie w dawce 10 mg/kg m.c. osiągała stężenia terapeutyczne wobec wielu patogenów odpowiedzialnych za wywoływanie zakażeń bakteryjnych u tego gatunku;
- TIG podana *per os* wchłaniała się z przewodu pokarmowego indyków w śladowym stopniu;

Podsumowując uzyskane wyniki badań, TIG podawana *per os* mogłaby znaleźć zastosowanie kliniczne u ptaków jedynie w przypadku leczenia zakażeń przewodu pokarmowego. Zastosowanie tego antybiotyku w leczeniu zakażeń bakteryjnych, innych niż zakażenia przewodu pokarmowego, wymaga dożylnego podania leku lub opracowania takiej postaci farmaceutycznej, która pozwoliłaby na podanie domięśniowe leku.

W tym miejscu należy zaznaczyć, że na terenie Unii Europejskiej od roku 2023 zgodnie z Rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2022/1255 z dnia 19 lipca 2022 TIG należy do grupy środków przeciwdrobnoustrojowych lub grup środków przeciwdrobnoustrojowych zarezerwowanych do leczenia niektórych zakażeń u ludzi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6. Tym samym, na dzień dzisiejszy TIG jest zabroniona do stosowania u zwierząt.

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- ❖ **Jasiecka-Mikołajczyk A, Jaroszewski J.J.** *Determination of tigecycline in turkey in plasma by LC-MS/MS: validation and application in a pharmacokinetic study.* Pol J Vet Sci 2017, 20: 241-249. **Punktacja MNiSW₂₀₁₇ = 20; IF₂₀₁₇ = 0,839**
- ❖ **Jasiecka-Mikołajczyk A, Ziółkowski H, Jaroszewski J.J.** *Pharmacokinetics of tigecycline in turkeys following different routes of administration.* J Vet Pharmacol Ther 2018, 41: e22-e29. **Punktacja MNiSW₂₀₁₈ = 30; IF₂₀₁₈ = 1,441**

Mój wkład w powstanie tych publikacji: współudział w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowanie i wykonywanie doświadczeń, analiza i interpretacja uzyskanych wyników oraz

napisanie manuskryptu. Niniejsze osiągnięcie badawcze było podstawą do nadania mi w 2017 roku stopnia doktora nauk weterynaryjnych i było wynikiem realizacji projektu naukowego „*Farmakokinetyka tigecykliny i jej interakcje u indyków*” uzyskanego w ramach konkursu Preludium 5 Narodowego Centrum Nauki.

4.5. Pozostała aktywność naukowa

4.5.1. Badania nad poszukiwaniem i testowaniem nowych celów terapeutycznych w leczeniu astmy alergicznej z wykorzystaniem modelu mysiego

Uczestniczyłam również w badaniach nad poszukiwaniem i testowaniem nowych celów terapeutycznych w leczeniu astmy alergicznej (badania z zastosowaniem mysiego modelu astmy alergicznej). Stale poszukuje się nowych leków do terapii astmy, a szczególnie jej postaci opornych na leczenie glikokortykosteroidami. Jednymi z kandydatów na tego typu leki mogą być substancje hamujące aktywność jądrowego czynnika κB (NF- κB) za pomocą hamowania kinazy inhibitora NF- κB (IKK). W tym celu oceniano wpływ IMD-0354 (tj. inhibitora IKK) na rozwój i natężenie modelu astmy alergicznej i na odpowiedź immunologiczną ze strony efektorowych i regulatorowych limfocytów T $CD4^+$ w węzłach chłonnych śródpiersiowych i płucach - a więc odpowiednio w strefach indukcyjnej i efektorowej odpowiedzi immunologicznej, związanej z patogenezą astmy alergicznej. Przeprowadzone badania wykazały, że hamowanie aktywacji NF- κB za pomocą IMD-0354 zapobiegało rozwojowi astmy alergicznej, a efekt ten było skorelowany z brakiem rekrutacji efektorowych limfocytów T $CD4^+$ na teren dolnych dróg oddechowych. Uzyskane wyniki wskazują, że ten ostatni efekt miał charakter wtórny, tj. wynikał z zablokowania klonalnej ekspansji limfocytów T $CD4^+$ w węzłach chłonnych śródpiersiowych w odpowiedzi na prowokację alergenem, a nie z hamowania jako takiego rekrutacji tych komórek na teren płuc. Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Maślanka T, Otrocka-Domagała I, Zuśka-Prot M, Mikiewicz M, Przybysz J, **Jasiecka A**, Jaroszewski J.J. *I κ B kinase β inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of $CD4^+$ effector T cell responses in the lung draining mediastinal lymph nodes*. Eur J Pharmacol 2016, 775: 78-85. **Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 30; IF₂₀₁₆ = 2,896**

Badania te stanowiły w pewnym zakresie badania pilotażowe, ponieważ w oparciu o nie prowadzono już bardziej pogłębione badania nad hamowaniem aktywności NF- κB , jako nowatorskiej strategii leczenia astmy alergicznej. Celem tych badań było poszerzenie/rozwijanie wiedzy na temat mechanizmów i efektów immunologicznych odpowiedzialnych za przeciwastmatyczny efekt hamowania aktywności NF- κB za pomocą hamowania IKK lub blokowania translokacji NF- κB do jądra komórkowego. Dodatkowym celem tych badań było ustalenie czy zablokowanie wzajemnego oddziaływania między RANK

(receptor aktywujący NF- κ B) a RANK-L (ligand RANK) może przynosić korzyści terapeutyczne w leczeniu astmy, a więc przetestowanie, czy blokada tej interakcji może być celem terapeutycznym mogącym znaleźć zastosowanie w leczeniu astmy alergicznej. Wyniki badań wykazały, że (a) zarówno zahamowanie translokacji NF- κ B, jak i blokada interakcji RANK/RANK-L, ale nie zahamowanie IKK, mogą wywierać bezpośredni hamujący wpływ na produkcję IL-4, IL-10 i IL-17 przez limfocyty CD4⁺ Teff - choć nie wydaje się, aby wpływ ten miał wiodące znaczenie w wywoływaniu przeciwastmatycznego działania związanego z tymi strategiami terapeutycznymi, przynajmniej w odniesieniu do zastosowanego modelu astmy; (b) działanie przeciwastmatyczne wynikające z zahamowania aktywacji NF- κ B – bez względu na to, czy poprzez inhibicję IKK, czy blokadę translokacji tego czynnika do jądra komórkowego - i blokady interakcji RANK/RANK-L nie jest pośredniczone przez wzbudzenie produkcji IL-10 i TGF- β przez komórki Treg; (c) zahamowanie aktywacji NF- κ B - zarówno poprzez blokadę IKK, jak i translokacji tego czynnika do jądra komórkowego – i blokada interakcji RANK/RANK zapobiegają indukowanej immunizacją odpowiedzi ze strony limfocytów Tc2 i Tc17. Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

- ❖ Gregorczyk I, **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Maślanka T. *Blockade of NF- κ B translocation and of RANKL/RANK interaction decreases the frequency of Th2 and Th17 cells capable of IL-4 and IL-17 production, respectively, in a mouse model of allergic asthma.* Molecules 2020, 26: 3117. **Punktacja MNiSW₂₀₂₀ = 140; IF₂₀₂₀ = 4,927**

Mój wkład w powstanie obu powyższych publikacji: wykonywanie doświadczeń, wykonywanie analizy cytometrycznej, udział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników.

4.5.2. Badania nad wpływem deksametazonu i meloksykamu na limfocyty T CD8⁺ bydła

Konfrontując duże znaczenie deksametazonu (DEX) (glikokortykosteroidu) i meloksykamu (MEL) (niesteroidowego leku przeciwzapalnego) w terapii chorób bydła ze słabo poznanym wpływem tych leków na limfocyty T CD8⁺, za godne poznania i użyteczne uznano przeprowadzenie kompleksowych badań nad wpływem obu leków na te komórki. W efekcie przeprowadzonych badań ustalono, że:

- dojrzałe limfocyty T CD8⁺ były wrażliwe na proapoptotyczne działanie DEX, przy czym działanie to miało charakter szybko występujący, lecz krótkotrwały;
- DEX upośledzał proliferację limfocytów T CD8⁺ u bydła;
- bydlęce limfocyty T CD8⁺ wykazujące ekspresję cząsteczki CD25 były niewrażliwe na proapoptotyczne działanie DEX;

- DEX zwiększał liczebność limfocytów T CD25⁺CD8⁺ co było wynikiem indukcji ekspresji CD25 na limfocytach T CD8⁺ nie wykazujących tej ekspresji;
- w wywoływaniu przeciwzapalnego i immunosupresyjnego działania DEX u bydła nie miał udziału wpływ leku na ekspresję Foxp3 w limfocytach T CD8⁺, natomiast jednym z elementów odpowiedzialnych za te efekty było zmniejszenie produkcji IFN-γ przez limfocyty T CD8⁺;
- MEL nie wpływał na liczebność, apoptozę i proliferację limfocytów T CD8⁺ u bydła;
- pod względem wpływu na limfocyty T CD8⁺ w zakresie ocenianych parametrów, MEL okazał się lekiem nieporównywalnie bezpieczniejszym od DEX.

Efektem udziału w tych badaniach było współautorstwo niniejszej publikacji:

- ❖ Maślanka T, Jaroszewski J.J, Markiewicz W, **Jasiecka A**, Ziółkowski H, Jędrzkiewicz D. *Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁻CD8⁺ T cells – in vitro study*. Res Vet Sci 2013, 94: 662-674. **Punktacja MNiSW₂₀₁₃ = 35; IF₂₀₁₃ = 1,511**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: wykonywanie eksperymentów, wykonywanie analizy cytometrycznej, udział w analizie wyników.

4.5.3. Badania nad wpływem prostaglandyny PGE₂ na ekspresję cząsteczki CD25 na limfocytach T oraz na komórki NK u bydła

Obranie tego kierunku badań w Katedrze Farmakologii i Toksykologii było ściśle związane z szeregiem obserwacji poczynionych w naszej Jednostce w ramach eksperymentów nad wpływem meloksykamu (MEL) na limfocyty bydła. Podstawowy mechanizm działania MEL polega na redukcji syntezy PGE₂ (która w zależności od poziomu i miejsca jej wydzielania odgrywa rolę fizjologicznego autakoidu lub mediatora prozapalnego). Dlatego też jedną z przesłanek do podjęcia badań w powyższym nurcie było określenie, czy efekty wywierane przez MEL na limfocyty T i komórki NK były związane z hamowaniem syntezy PGE₂, czy też w ich wywoływaniu pośredniczyły jakieś inne mechanizmy. Jedne z badań z tego obszaru tematycznego dotyczyły wpływu PGE₂ na cząsteczkę CD25 na limfocytach T bydła. W badaniach tych stwierdzono, że PGE₂ zmniejszała indukowaną aktywacją 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. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość farmakologicznej manipulacji

ekspresją CD25 na limfocytach T była z użyciem selektywnych antagonistów i agonistów receptorów EP₂ i EP₄. Należy zauważyć, że wyniki tych badań po raz pierwszy zidentyfikowały receptory zaangażowane we wpływ PGE₂ na ekspresję cząsteczki CD25. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy:

- ❖ Maślanka T, Spodniewska A, Barski D, **Jasiecka A**, Zuśka-Prot M, Ziółkowski H, Markiewicz W, Jaroszewski J.J. *Prostaglandin E2 down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor*. Vet Immunol Immunopathol 2014, 160: 192-200. **Punktacja MNiSW₂₀₁₄ = 25; IF₂₀₁₄ = 1,535**

W innych badaniach z tego obszaru tematycznego ustalono, że: (a) PGE₂ może upośledzać proliferację bydlęcych komórek NK oraz indukować ich apoptozę; pierwszy z tych efektów najwyraźniej jest wywierany za pośrednictwem receptora EP₄, podczas gdy w wywołaniu drugiego nie pośredniczą receptory EP, a więc najprawdopodobniej ma on charakter pośredni; (b) proapoptotyczne i antyproliferacyjne działanie PGE₂ najwyraźniej nie występuje przy jej fizjologicznym poziomie, natomiast może mieć miejsce w trakcie reakcji zapalnej; (c) występowanie i natężenie proapoptotycznego działania PGE₂ było zależne od jej stężenia. Uzyskane wyniki sugerują, że stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych u zwierząt z zakażeniami wirusowymi może chronić komórki NK przed indukowaną przez PGE₂ apoptozą oraz upośledzeniem proliferacji. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w poniższej publikacji:

- ❖ Maślanka T, Chrostowska M, Otrocka-Domagała I, Snarska A, Mikiewicz M, Zuśka-Prot M, **Jasiecka A**, Ziółkowski H, Markiewicz W, Jaroszewski J.J. *Prostaglandin E2 exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells*. Res Vet Sci 2016, 107: 80-87. **Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 35; IF₂₀₁₆ = 1,298**

Mój wkład w powstanie powyższych publikacji: wykonywanie eksperymentów, wykonywanie analizy cytometrycznej, udział w analizie wyników.

4.5.4. Badania nad farmakokinetyką tetracyklin i chinolonów oraz ich interakcjami z jonami metali i paszą na poziomie wchłaniania z przewodu pokarmowego

Wraz z dr Hubertem Ziółkowskim brałam udział w badaniach nad farmakokinetyką wybranych tetracyklin i chinolonów oraz ich interakcjami z jonami i/lub paszą na etapie wchłaniania z przewodu pokarmowego. Były to badania przeprowadzone za pomocą nowo opracowanych i w pełni przez nas zwalidowanych metod analitycznych przy użyciu

HPLC-MS/MS. Istnieją doniesienia potwierdzające, że zarówno chinolony, jak i tetracykliny wchodzi w interakcje z jonami metali występującymi w wodzie, pokarmie oraz suplementach paszowych tworząc z nimi związki kompleksowe. Celem niniejszych badań była ocena i porównanie profili farmakokinetycznych wybranych chemioterapeutyków z grupy tetracyklin i chinolonów po jednorazowym podaniu różnymi drogami oraz w odwzorowanych warunkach fermowych, jak również zbadanie interakcji leków z jonami metali na etapie wchłaniania z przewodu pokarmowego u drobiu.

W badaniach nad farmakokinetyką enrofloksacyny (ENRO), chinolonem trzeciej generacji, oraz jej interakcjami wykazano, że jednoczesne podawanie wraz z lekiem jonów wapnia, magnezu oraz kobaltu lub paszy istotnie opóźniało wchłanianie leku z przewodu pokarmowego indyków. Biodostępność ENRO podawanej *per os* w dawkach terapeutycznych wynosiła ok. 66% w obecności jonów oraz ok. 48% w obecności paszy. Wyniki badań wykazały, że jony mają istotny wpływ na biodostępność podawanej *per os* ENRO. Wiedza ta ma znaczenie szczególnie w warunkach hodowli fermowej, kiedy to lek rozpuszcza się często w twardej wodzie z wysoką zawartością minerałów, co wymagałoby rozważenia zastosowania większych dawek ENRO, aby lek osiągnął stężenie terapeutyczne w organizmie zwierząt. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w publikacji:

- ❖ Ziółkowski H, Jaroszewski J.J, Maślanka T, Grabowski T, Katolik K, Pawęska J, Siemianowska M, **Jasiecka A**, Markiewicz W, Spodniewska A. *Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics*. Res Vet Sci 2014, 97: 99-104. **Punktacja MNiSW₂₀₁₄ = 35; IF₂₀₁₄ = 1,409**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w doświadczeniach, analizie chromatograficznej oraz analizie wyników.

W badaniach nad farmakokinetyką innego chinolonu, flumechiny (FLU), wykazano, że pokarm upośledzał jej biodostępność w ok. 50%. Wszystkie parametry farmakokinetyczne związane z wchłanianiem leku były istotnie niższe w obecności pokarmu w porównaniu do podania FLU zwierzętom, które przed podaniem leku przez 6 godzin nie miały dostępu do paszy. Co ciekawe, najwyższą biodostępność leku zanotowano podając lek w wodzie do picia, do której zwierzęta miały nieograniczony dostęp przez 72 godziny. Wyniki badań wskazują, że pasza ograniczała wchłanianie FLU z przewodu pokarmowego ptaków po jednorazowym podaniu. Kiedy jednak FLU podawana była w sposób ciągły w wodzie do picia, większa ekspozycja zwierząt na lek wydawała się kompensować obniżone wchłanianie z przewodu

pokarmowego spowodowane interakcją z paszą i FLU osiągała skuteczne stężenia terapeutyczne w osoczu zwierząt. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w publikacji:

- ❖ Madej-Śmiechowska H, Orzoł A, **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Ziółkowski H, Jaroszewski J.J. *Differences in the pharmacokinetics of flumequine after single and continuous oral administration in non-fasted broiler chickens*. Pol J Vet Sci 2018, 21: 631-634.

Punktacja MNiSW₂₀₁₈ = 20; IF₂₀₁₈ = 0,802

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w eksperymentach, walidacji metody oraz prowadzeniu analiz chromatograficznych.

W badaniach nad farmakokinetyką oksytetracykliny (OXY) podawanej różnymi drogami oraz jej interakcjami z jonami wykazano, że OXY charakteryzowała się słabym wchłanianiem z przewodu pokarmowego (jej biodostępność wynosiła ok. 12%), nawet, gdy była podawana bez obecności paszy i w wodzie dejonizowanej. Najprawdopodobniej za niską wchłanialność leku może być odpowiedzialne czynne wypompowywanie OXY przez jedną bądź kilka pomp, jak i innych tetracyklin z powrotem do miejsca, z którego wniknęła do komórki. Tym bardziej, że wiadomo, że bakterie jako jeden z głównych mechanizmów oporności na tetracykliny wykształciły właśnie czynne wypompowywanie leku z komórki. Wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że OXY podana podskórnie lub domięśniowo charakteryzowała się podobnymi właściwościami farmakokinetycznymi. Ponadto, wykazano, że proces wchłaniania leku jest szybki, niezależnie od drogi podania. Z kolei badając interakcje OXY z jonami potwierdzono, że wysokie stężenie jonów w wodzie (co może mieć miejsce w warunkach fermowych) może niekorzystnie wpływać na wchłanianie się leku z przewodu pokarmowego kurcząt brojlerów, co znalazło potwierdzenie w niskich wartościach parametrów farmakokinetycznych związanych z procesem wchłaniania. Wynika z tego, że współczesne wytyczne dotyczące farmakoterapii chorób bakteryjnych u drobiu obejmujące OXY mogą nie być optymalne, gdyż najprawdopodobniej nie biorą pod uwagę faktu upośledzania wchłaniania się leku w obecności jonów. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w poniższych publikacjach:

- ❖ Ziółkowski H, Grabowski T, **Jasiecka A**, Zuśka-Prot M, Barski D, Jaroszewski J.J. *Pharmacokinetics of oxytetracycline in broiler chickens following different routes of administration*, Vet J 2016, 208: 96-98. **Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 40; IF₂₀₁₆ = 1,802**
- ❖ Ziółkowski H, **Jasiecka A**, Zuska-Prot M, Przybysz J, Grabowski T, Jaroszewski J.J. *Metal ion-oxytetracycline pharmacokinetic interactions after oral co-administration in*

broiler chickens. Poultry Science 2016, 95: 1927-1933. **Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 35; IF₂₀₁₆ = 1,908**

Mój wkład w powstanie powyższych publikacji: udział w eksperymentach, walidacji metody oraz prowadzeniu analiz chromatograficznych.

Kolejne badania nad farmakokinetyką tetracyklin dotyczyły porównania profili farmakokinetycznych chlorotetracykliny (CTC), tetracykliny (TET), minocykliny (MIN) oraz tigecykliny (TIG) po podaniu dożylnym oraz *per os* u kurcząt brojlerów. Wyniki badań wykazały, że stężenia tych czterech tetracyklin osiągane w osoczu po podaniu *per os*, jak również ich biodostępność, różniły się między sobą, pomimo tego, że leki były podawane w tej samej dawce, tą samą drogą i w tych samych warunkach. Co ciekawe, po podaniu dożylnym średni czas przebywania leku w ustroju wszystkich badanych leków był bardzo podobny. Uzyskane wyniki wskazują, że pomimo podobieństw w budowie chemicznej oraz właściwościach fizykochemicznych CTC, TET, MIN i TIG, ich profil farmakokinetyczny jest istotnie różny. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w publikacji:

- ❖ Ziółkowski H, **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Madej-Śmiechowska H, Janiuk J, Zygmuntowicz A, Dąbrowski M. *Comparative pharmacokinetics of chlortetracycline, tetracycline, minocycline, and tigecycline in broiler chickens*. Poult Sci 2020, 99: 4750-4757. **Punktacja MNiSW₂₀₂₀ = 140; IF₂₀₂₀ = 3,352**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w eksperymentach, walidacji metody oraz prowadzeniu analiz chromatograficznych.

4.5.5. Badania nad farmakokinetyką iwermektyny oraz efektywnością jej działania przeciw pasożytniczemu u koni

W 2015 roku w ramach współpracy z Katedrą Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie prowadziłam badania mające na celu porównanie parametrów farmakokinetycznych iwermektyny (IWER) podanej w różnych porach roku koniom z infekcją *Cyathostominae* oraz ocenę efektywności stosowania leku. Pierwszym etapem prowadzonych badań było opracowanie oraz walidacja nowej metody oznaczania IWER w osoczu koni za pomocą HPLC sprzężonej z detektorem fluorescencyjnym. Opracowana metoda spełniła wszystkie kryteria akceptacji. W następnym etapie przeprowadzono doświadczenia terenowe w celu zebrania próbek do dalszych analiz. Przeprowadzone badania wykazały, że IWER podana jesienią wchłaniała się dwa razy wolniej w porównaniu do podania leku w porze wiosennej. Zanotowano różnice w maksymalnym stężeniu leku, które przez pierwsze 4 godziny od podania było istotnie wyższe po podaniu

w porze wiosennej. Leczenie przy użyciu IWER doprowadziło do 100% eliminacji pasożytów z przewodu pokarmowego, co znalazło potwierdzenie w próbkach kału, w których nie znaleziono jaj pasożytów. Leczenie IWER okazało się skuteczne, niezależnie od pory roku, w której podawano IWER. Efektem udziału w powyższych badaniach było współautorstwo w poniższej publikacji:

- ❖ Sokół R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, **Jasiecka A**, Ziółkowski H, Jaroszewski J.J. *A comparison of the efficacy and pharmacokinetics of ivermectin after spring and autumn treatments against Cyathostominae in horses*. Pol J Vet Sci 2015, 18: 371-377.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅ = 20; IF₂₀₁₅ = 0,719

Mój wkład w powstanie tej publikacji: opracowanie i walidacja nowej metody oznaczania leku w osoczu koni, przeprowadzenie analiz chromatograficznych oraz przygotowanie części manuskryptu.

4.5.6. Badania nad wpływem doksazosyny na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej pęcherza moczowego świni

Wspólnie z pracownikami Katedry Fizjologii i Patofizjologii Człowieka Wydziału Nauk Medycznych UWM w Olsztynie brałam udział w badaniach określających wpływ doksazosyny na aktywność skurczową mięśniówki gładkiej pęcherza moczowego świni. W badaniach tych określano *in vitro* wpływ acetylocholiny (ACh), noradrenaliny (NA) oraz 5-hydroksytryptaminy (5-HT) na kurczliwość pęcherza moczowego świń niedojrzałych płciowo, którym przez 30 dni podawano doksazozynę. Wykazano, że ACh i 5-HT w mniejszym stopniu zwiększały napięcie mięśni gładkich w grupie otrzymującej doksazozynę niż w grupie kontrolnej. Z kolei NA w większym stopniu obniżała napięcie mięśniówki w grupie kontrolnej niż w grupie otrzymującej doksazozynę. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto wnioski, że długotrwałe stosowanie doksazosyny prowadzi do desensytyzacji receptorów układu autonomicznego w mięśniach gładkich wypieracza pęcherza. Wyniki powyższych badań przedstawiono w pracy:

- ❖ Markiewicz W, **Jasiecka A**, Janiuk J, Bossowska A, Jaroszewski J.J. *The influence of doxazosin, an $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist on the urinary bladder contractility in pigs*. Pol J Vet Sci 2014, 17: 527-529. **Punktacja MNiSW₂₀₁₄ = 20; IF₂₀₁₄ = 0,604**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: obliczenie i przygotowanie odpowiednich stężeń podawanych substancji oraz wykonywanie eksperymentów.

4.5.7. Badania nad opracowaniem nowych metod oczyszczania syntetycznych ścieków przemysłowych

W 2021 roku rozpoczęłam współpracę z Katedrą Chemii Wydziału Rolnictwa i Leśnictwa UWM w Olsztynie w zakresie opracowania nowych metod oczyszczania syntetycznych barwników, w których moja rola polegała głównie na analizie dostarczonych próbek metodą HPLC-MS/MS. Główną wadą aktualnie wykorzystywanych tradycyjnych elektrochemicznych metod oczyszczania jest wysokie zużycie energii elektrycznej poprzez zastosowanie spontanicznego procesu korozji anodowej żelaza oraz równoległych procesów elektrokoagulacji i elektrooksydacji. Celem prowadzonych badań było opracowanie nowatorskiej, energooszczędnej metody oczyszczania syntetycznych ścieków przemysłowych zawierających barwniki azowe, wykorzystującej samowystarczalne ogniwa galwaniczne typu Cu/Fe (miedź/żelazo). W przeprowadzonych badaniach potwierdzono wysoką skuteczność nowo opracowanej metody, osiągając usunięcie barwników Acid Violet 90 oraz Acid Red 357 powyżej 98%, a w przypadku barwnika Disperse Red 167 nawet 97% już po godzinie procesu. W kolejnym etapie prac zintegrowano elektrochemiczne oczyszczanie ścieków z biologiczną metodą oczyszczania z użyciem *Lemna minor* (rzęsy drobnej), co pozwoliło nie tylko na całkowite usunięcie zanieczyszczeń barwnikowych, lecz również ocenę wpływu środowiskowego powstających produktów pośrednich. Wykazano przy tym istotne różnice w fitotoksyczności ścieków w zależności od rodzaju elektrod stosowanych podczas elektrooksydacji. Uzyskane w tych badaniach wyniki wskazują na potencjał praktycznego wdrożenia metody w przemyśle oraz jej pozytywny wpływ na ochronę zasobów wodnych. Wyniki powyższych badań przedstawiono w pracach:

- ❖ Kuczyński M, Łuba M, Mikołajczyk T, Pierożyński B, **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Smoczyński L, Sołowiej P, Wojtacha P. *Electrodegradation of acid mixture dye through the employment of Cu/Fe Macro-Corrosion galvanic cell in Na₂SO₄ synthetic wastewater*. Molecules 2021, 26: 4580. **Punktacja MEiN₂₀₂₁ = 140; IF₂₀₂₁ = 4,927**
- ❖ Bęś A, Sikorski Ł, Mikołajczyk T, Kuczyński M, Łuba M, Pierożyński B, **Jasiecka-Mikołajczyk A**. *Electrodegradation of Acid Mixture Dye through the Employment Electrooxidation and Lemnoideae in Na₂SO₄ Synthetic Wastewater*. Appl Sci 2022, 12: 1-17. **Punktacja MNiSW₂₀₂₂ = 100; IF₂₀₂₂ = 2,700**
- ❖ Łuba M, Mikołajczyk T, Kuczyński M, Pierożyński B, **Jasiecka-Mikołajczyk A**, Rasiński B, Wojtacha P. *Electrochemical purification of Disperse Red 167 azo dye-based synthetic waste- water through the electrooxidation and electrocoagulation with Fe ions*

derived from Cu/Fe macro-corrosion galvanic cell. Desalin Water Treat 2023, 287: 67-

79. Punktacja MEiN₂₀₂₃ = 100; IF₂₀₂₃ = 1,000

Moja rola w tych badaniach polegała na opracowaniu nowej metody detekcji badanych barwników za pomocą HPLC-MS/MS i przeprowadzeniu analizy chromatograficznej dostarczonych próbek, jak również przygotowaniu części manuskryptu.

4.5.8. Studia literaturowe nad właściwościami farmakologicznymi metamizolu

W swojej pracy naukowej dokonałam również przeglądu aktualnej literatury dotyczącej właściwości farmakologicznych metamizolu (MET), nieopiodowego leku przeciwbólowego stosowanego na szeroką skalę, zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej, czego efektem była publikacja przeglądowa:

- ❖ **Jasiecka A, Maślanka T, Jaroszewski J.J. *Pharmacological characteristics of metamizole*. Pol J Vet Sci 2014, 17: 207-214. Punktacja MNiSW 2014 = 20; IF 2014 = 0,604.**

Mój wkład w powstanie tej publikacji: udział w opracowaniu koncepcji oraz całokształt prac związanych napisaniem i opublikowaniem tej publikacji.

W badaniach tych zestawiono najnowsze dane dotyczące klasyfikacji leku, jego właściwości farmakokinetycznych, mechanizmu działania czy efektów terapeutycznych. Pierwszym spostrzeżeniem był fakt, że mimo, iż MET stosowany jest od kilkadziesiąt lat (został zsyntetyzowany ponad 100 lat temu), wciąż niektórzy autorzy klasyfikują go błędnie jako niesteroidowy lek przeciwzapalny (NLPZ). Według aktualnych danych MET powinno się klasyfikować jako nieopiodowy lek przeciwbólowy, nie będący NLPZ. Lek ten charakteryzuje się działaniem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym (a efekty te są silniejsze w porównaniu do NLPZ) oraz rozkurczowym i słabym uspokajającym; nie działa jednak przeciwzapalnie (nie hamuje bowiem aktywności COX-2, jak to wcześniej sądzono, a jedynie aktywność izoformy COX-3, tj. wariantu COX-1, który zachowuje intron). Efektem przeglądu literatury było również ustalenie, że działanie przeciwbólowe leku dodatkowo spotęgowane jest również tym, że MET jest słabym agonistą receptorów opiodowych i kannabinoidowych. Ponieważ lek nie wpływa na aktywność COX-1, a więc izoformy enzymu, przy udziale którego powstaje PGE₂, tj. prostaglandyna mająca działanie gastro- i nefroprotekcyjne, MET pozbawiony jest działania gastrotoksycznego, tak bardzo charakterystycznego dla długoterminowej terapii NLPZ. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury wyciągnięto wniosek, że MET wydaje się być lekiem bezpiecznym. Tym bardziej, że na podstawie dostępnych wyników badań i metaanaliz oceniono, że ryzyko agranulocytozy przedstawianej jako jedno z poważnych działań

niepożądanych leku było nie do końca poprawnie oszacowane i od czasu wycofania preparatów z MET (m.in. ze Stanów Zjednoczonych, Szwecji, Japonii, Kanady czy Niemiec) zostało opublikowanych już wiele badań potwierdzających, że rzeczywiste ryzyko wystąpienia agranulocytozy jest bardzo niskie. Podsumowując, w opublikowanym artykule przeglądowym przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat właściwości farmakologicznych MET w oparciu o aktualne wyniki badań, przedstawiając lek jako skuteczny i bezpieczny, który z powodzeniem może być i jest stosowany zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Warto nadmienić, że jest to najczęściej cytowana praca w moim dorobku naukowym (liczba cytowań w bazie Scopus – 132; w bazie Web of Science – 104).

4.6. Piśmiennictwo

1. Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. *The role of regulatory T cells in atopic dermatitis*. Curr Probl Dermatol 2011, 41: 112-124.
2. Affolter VK, Moore PF. *Canine cutaneous and systemic histiocytosis: reactive histiocytosis of dermal dendritic cells*. Am J Dermatopathol 2000, 22: 40-48.
3. Aleo MM, Messamore J, Nieto BA, Fleck TJ, Humphrey WR, Coscarelli EM, Mahabir SP, McCall RB, Gonzales AJ. *Lack of Interference of Oclacitinib with the results of intradermal testing or allergen-specific IgE serology in Dermatophagoides farinae-sensitized beagle dogs*. Vet Immunol Immunopathol 2023, 256: 110537.
4. Amin HM, Medeiros LJ, Ma Y, Feretzaki M, Das P, Leventaki V, Rassidakis GZ, O'Connor SL, McDonnell TJ, Lai R. *Inhibition of JAK3 induces apoptosis and decreases anaplastic lymphoma kinase activity in anaplastic large cell lymphoma*. Oncogene 2003, 35: 5399-5407.
5. APOQUEL® Karta Charakterystyki Produktu Leczniczego (CHPL) dostępna tutaj: <https://medicines.health.europa.eu/veterinary/pl/600000035462>.
6. Arcique MA, Bajwa J. *Atopic dermatitis in humans and dogs*. Can Vet J 2020, 61: 82-84.
7. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. *Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity*. Mediators Inflamm 2005, 2005: 273-279.
8. Bajwa J. *Canine superficial pyoderma and therapeutic considerations*. Can Vet J 2016, 57: 204-206.
9. Banovic F, Tarigo J, Gordon H, Barber JP, Gogal RM Jr. *Immunomodulatory in vitro effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production*. Vet Dermatol 2019, 30: 17-e6.
10. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. *In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines*. J Exp Med 2002, 195: 603-616.
11. Barry M, Bleackley RC. *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol 2002, 2: 401-409.
12. Beccati M, Martini V, Comazzi S, Fanton N, Cornegiani L. *Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: a prospective study*. Vet Dermatol 2016, 27: 17-e5.
13. Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW. *Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer*. Vet Immunol Immunopathol 2007, 116: 69-78.
14. Blair HA. *Fedratinib: First Approval*. Drugs 2019, 79: 1719-1725.
15. Borgia F, Custurone P, Li Pomi F, Córdiano R, Alessandrello C, Gangemi S. *IL-31: State of the Art for an Inflammation-Oriented Interleukin*. Int J Mol Sci 2022, 23: 6507.
16. Boyman O, Werfel T, Akdis CA. *The suppressive role of IL-10 in contact and atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol 2012, 129: 160-161.
17. Brockmann L, Gagliani N, Steglich B, Giannou AD, Kempinski J, Pelczar P, Geffken M, Mfarrej B, Huber F, Herkel J, Wan YY, Esplugues E, Battaglia M, Krebs CF, Flavell RA, Huber S. *IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo*. J Immunol 2017, 198: 1130-1141.

18. Cabrera R, Ararat M, Eksioglu EA, Cao M, Xu Y, Wasserfall C, Atkinson MA, Liu C, Nelson DR. *Influence of serum and soluble CD25 (sCD25) on regulatory and effector T-cell function in hepatocellular carcinoma*. Scand J Immunol 2010, 72: 293-301.
19. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. *A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis*. Clin Rev Allergy Immunol 2011, 41: 245-253.
20. Cetkovic-Cvrlje M, Olson M, Gbate K. *Targeting Janus tyrosine kinase 3 (JAK3) with an inhibitor induces secretion of TGF- β by CD4⁺ T cells*. Cell Mol Immunol 2012, 9: 350-360.
21. Cevikbas F, Wang X, Akiyama T, Kempkes C, Savinko T, Antal A, Kukova G, Buhl T, Ikoma A, Buddenkotte J, Soumelis V, Feld M, Alenius H, Dillon SR, Carstens E, Homey B, Basbaum A, Steinhoff M. *A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1*. J Allergy Clin Immunol 2014, 133: 448-460.
22. Chaudhary SK, Singh SK, Kumari P, Kanwal S, Soman SP, Choudhury S, Garg SK. *Alterations in circulating concentrations of IL-17, IL-31 and total IgE in dogs with atopic dermatitis*. Vet Dermatol 2019, 30: 383-e114.
23. Chen L, Chen G, Zhang MQ, Xiong XZ, Liu HJ, Xin JB, Zhang JC, Wu JH, Meng ZJ, Sun SW. *Imbalance between subsets of CD8⁺ peripheral blood T cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. PeerJ 2016, 4: e2301.
24. Cherwinski HM, Cohn RG, Cheung P, Webster DJ, Xu YZ, Caulfield JP, Young JM, Nakano G, Ransom JT. *The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis*. J Pharmacol Exp Ther 1995, 275: 1043-1049.
25. Chesne RB, Doornink MT, Sri-Jayantha LSH, Urie BK. *Leflunomide with prednisone or nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy is safe and tolerated for long-term treatment of immune-mediated polyarthritis in 27 dogs*. J Am Vet Med Assoc 2024, 262: 1188-1192.
26. Chihara N, Madi A, Karwacz K, Awasthi A, Kuchroo VK. *Differentiation and Characterization of Tr1 Cells*. Curr Protoc Immunol 2016, 113: 3.27.1-3.27.10.
27. Chiricozzi A, Maurelli M, Peris K, Girolomoni G. *Targeting IL-4 for the Treatment of Atopic Dermatitis*. Immunotargets Ther 2020, 9: 151-156.
28. ClinicalTrials.gov. Dostępne tutaj: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=JAK%20Inhibitor>.
29. Collard WT, Hummel BD, Fielder AF, King VL, Boucher JF, Mullins MA, Malpas PB, Stegemann MR. *The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog*. J Vet Pharmacol Ther 2014, 37: 279-285.
30. Colopy SA, Baker TA, Muir P. *Efficacy of leflunomide for treatment of immune-mediated polyarthritis in dogs: 14 cases (2006-2008)*. J Am Vet Med Assoc 2010, 236: 312-318.
31. Coricello A, Mesiti F, Lupia A, Maruca A, Alcaro S. *Inside Perspective of the Synthetic and Computational Toolbox of JAK Inhibitors: Recent Updates*. Molecules 2020, 25: 3321.
32. Cornelissen C, Lüscher-Firzlaff J, Baron JM, Lüscher B. *Signaling by IL-31 and functional consequences*. Eur J Cell Biol. 2012a, 91: 552-566.
33. Cornelissen C, Marquardt Y, Czaja K, Wenzel J, Frank J, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B, Baron JM. *IL-31 regulates differentiation and filaggrin expression in human organotypic skin models*. J Allergy Clin Immunol 2012b, 129: 426-433.

34. Cosgrove SB, Wren JA, Cleaver DM, Martin DD, Walsh KF, Harfst JA, Follis SL, King VL, Boucher JF, Stegemann MR. *Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis*. Vet Dermatol 2013, 24: 479-e114.
35. Cosgrove SB, Cleaver DM, King VL, Gilmer AR, Daniels AE, Wren JA, Stegemann MR. *Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life*. Vet Dermatol 2015, 26: 171-179.
36. Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. *CD25- T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion*. J Immunol 2004, 173: 7259-7268.
37. Czarnowicki T, Gonzalez J, Shemer A, Malajian D, Xu H, Zheng X, Khattri S, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Krueger JG, Guttman-Yassky E. *Severe atopic dermatitis is characterized by selective expansion of circulating TH2/TC2 and TH22/TC22, but not TH17/TC17, cells within the skin-homing T-cell population*. J Allergy Clin Immunol 2015, 136: 104-115.
38. Davis KG, Wertin TM, Schriver JP. *The use of simvastatin for the prevention of gallstones in the lithogenic prairie dog model*. Obes Surg 2003, 13: 865-868.
39. De Caro Martins G, da Costa-Val AP, Coura FM, Diamantino GML, Nogueira MM, de Oliveira Melo-Junior OA, Giunchetti RC, da Silveira-Lemos D, Melo MM. *Immunomodulatory effect of long-term oclacitinib maleate therapy in dogs with atopic dermatitis*. Vet Dermatol 2022, 33: 142-e40.
40. Denti D, Caldin M, Ventura L, De Lucia M. *Prolonged twice-daily administration of oclacitinib for the control of canine atopic dermatitis: a retrospective study of 53 client-owned atopic dogs*. Vet Dermatol 2022, 33: 149-e42.
41. Dhillon S, Keam SJ. *Filgotinib: First Approval*. Drugs. 2020, 80: 1987-1997.
42. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin SD, LeCiel C, Waggle K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J, Gross JA. *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. Nat Immunol 2004: 752-760.
43. Distelhorst CW. *Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis*. Cell Death Differ 2002, 9: 6-19.
44. Duggan S, Keam SJ. *Upadacitinib: First Approval*. Drugs 2019, 79: 1819-1828.
45. Eapen AA, Parameswaran S, Forney C, Edsall LE, Miller D, Donmez O, Dunn K, Lu X, Granitto M, Rowden H, Magier AZ, Pujato M, Chen X, Kaufman K, Bernstein DI, Devonshire AL, Rothenberg ME, Weirauch MT, Kottyan LC. *Epigenetic and transcriptional dysregulation in CD4⁺ T cells in patients with atopic dermatitis*. PLoS Genet 2022, 18: e1009973.
46. Eisenschenk MC, Hensel P, Saridomichelakis MN, Tamamoto-Mochizuki C, Pucheu-Haston CM, Santoro D. *Introduction to the ICADA 2023 Canine Atopic Dermatitis Pathogenesis Review Articles and Updated Definition*. Vet Dermatol 2024, 35: 3-4.
47. Elkin RG, Yan Z, Zhong Y, Donkin SS, Buhman KK, Story JA, Turek JJ, Porter RE Jr, Anderson M, Homan R, Newton RS. *Select 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors vary in their ability to reduce egg yolk cholesterol levels in laying hens through alteration of hepatic cholesterol biosynthesis and plasma VLDL composition*. J Nutr 1999, 129: 1010-1019

48. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Nat Immunol 2003, 4: 330-336.
49. Fontenot JD, Rudensky AY. *A well-adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol 2005, 6: 331-337.
50. Fukushima K, Eguchi N, Ohno K, Kanemoto H, Takahashi M, Igarashi H, Ohmi A, Nakashima K, Tsujimoto H. *Efficacy of leflunomide for treatment of refractory inflammatory colorectal polyps in 15 Miniature Dachshunds*. J Vet Med Sci 2016, 78: 265–269.
51. Fyhrquist N, Lehtimäki S, Lahl K, Savinko T, Lappeteläinen AM, Sparwasser T, Wolff H, Lauerma A, Alenius H. *Foxp3⁺ cells control Th2 responses in a murine model of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2012, 132: 1672-1680.
52. Gadeyne C, Little P, King VL, Edwards N, Davis K, Stegemann MR. *Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia*. Vet Dermatol 2014, 25: 512-518.
53. Georas SN, Donohue P, Connolly M, Wechsler ME. *JAK inhibitors for asthma*. J Allergy Clin Immunol. 2021, 148: 953-963.
54. Ghoreschi K, Jesson MI, Li X, Lee JL, Ghosh S, Alsup JW, Warner JD, Tanaka M, Steward-Tharp SM, Gadina M, Thomas CJ, Minnerly JC, Storer CE, LaBranche TP, Radi ZA, Dowty ME, Head RD, Meyer DM, Kishore N, O'Shea JJ. *Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550)*. J Immunol 2011, 186: 4234-4243.
55. Glińska K, Nicpoń J, Pawlas M. *Mechanizm działania statyn i możliwości ich zastosowania w terapii psów*. Medycyna Wet 2006, 62: 254-256
56. Goldstein JD, Burlion A, Zaragoza B, Sendeyo K, Polansky JK, Huehn J, Piaggio E, Salomon BL, Marodon G. *Inhibition of the JAK/STAT Signaling Pathway in Regulatory T Cells Reveals a Very Dynamic Regulation of Foxp3 Expression*. PLoS One. 2016, 11: e0153682.
57. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. *Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy*. J Vet Pharmacol Ther 2014, 37: 317-324.
58. Gonzales AJ, Fleck TJ, Humphrey WR, Galvan BA, Aleo MM, Mahabir SP, Tena JK, Greenwood KG, McCall RB. *IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics*. Vet Dermatol 2016, 27: 34-e10.
59. González-Alvaro I, Ortiz AM, Domínguez-Jiménez C, Aragón-Bodi A, Díaz Sánchez B, Sánchez-Madrid F. *Inhibition of tumour necrosis factor and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway*. Ann Rheum Dis 2009, 68: 1644-1650.
60. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. *A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature. 1997, 389: 737-742.
61. Guttman-Yassky E, Waldman A, Ahluwalia J, Ong PY, Eichenfield LF. *Atopic dermatitis: pathogenesis*. Semin Cutan Med Surg 2017, 36: 100-103.
62. Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. *A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner*. Br J Pharmacol 1999, 127: 1589-1596.

63. Hammitzsch A, Chen L, de Wit J, Al-Mossawi MH, Ridley A, Sekine T, Simone D, Doig K, Skapenko A, Bowness P. *Inhibiting ex-vivo Th17 responses in Ankylosing Spondylitis by targeting Janus kinases*. Sci Rep 2018, 8: 15645.
64. Hashimoto T, Yokozeaki H, Karasuyama H, Satoh T. *Atopic dermatitis and inflammatory skin disease, IL-31-generating network in atopic dermatitis comprising macrophages, basophils, thymic stromal lymphopoietin, and periostin*. J Allergy Clin Immunol 2023, 151: 737-746.
65. Hauck V, Hügli P, Meli ML, Rostaher A, Fischer N, Hofmann-Lehmann R, Favrot C. *Increased numbers of FoxP3-expressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity*. Vet Dermatol 2016, 27: 26-e9.
66. Herrmann I, Mamo LB, Holmes J, Mohammed JP, Murphy KM, Bizikova P. *Long-term effects of ciclosporin and oclacitinib on mediators of tolerance, regulatory T-cells, IL-10 and TGF- β , in dogs with atopic dermatitis*. Vet Dermatol 2023, 34: 107-114.
67. Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijin SJ, Kupper TS, Bruijnzeel-Koomen CA, Clark RA. *CD8⁺ T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22*. J. Invest Dermatol 2013, 133: 973-979.
68. Hillier A, Griffin CE. *The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence*. Vet Immunol Immunopathol 2001, 81: 147-51.
69. Hillier A, Lloyd DH, Weese JS, Blondeau JM, Boothe D, Breitschwerdt E, Guardabassi L, Papich MG, Rankin S, Turnidge JD, Sykes JE. *Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases)*. Vet Dermatol 2014, 25: 163-e43.
70. Hodge JA, Kawabata TT, Krishnaswami S, Clark JD, Telliez JB, Dowty ME, Menon S, Lamba M, Zwillich S. *The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol 2016, 34, 318-328.
71. Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. *Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues*. Immunity 2014, 40: 235-247.
72. Igaz P, Tóth S, Falus A. *Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice*. Inflamm Res 2001, 50: 435-441.
73. Ito M, Yamazaki S, Yamagami K, Kuno M, Morita Y, Okuma K, Nakamura K, Chida N, Inami M, Inoue T, Shirakami S, Higashi Y. *A novel JAK inhibitor, peficitinib, demonstrates potent efficacy in a rat adjuvant-induced arthritis model*. J Pharmacol Sci 2017, 133: 25-33.
74. Jacques D, Cauzinille L, Bouvy B, Dupre G. *A retrospective study of 40 dogs with polyarthritis*. Vet Surg 2002, 31: 428-434.
75. James JM, Kagey-Sobotka A, Sampson HA. *Patients with severe atopic dermatitis have activated circulating basophils*. J Allergy Clin Immunol 1993, 91: 1155-62.
76. Jankovic D, Kugler DG, Sher A. *IL-10 production by CD4⁺ effector T cells: a mechanism for self-regulation*. Mucosal Immunol 2010, 3: 239-246

77. Jassies-van der Lee A, Rutten VP, Bruijn J, Willemse T, Broere F. *CD4⁺ and CD8⁺ skin-associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon- γ and contain a CD25⁺ FoxP3⁺ subset.* Vet Dermatol 2014, 25: 456-e72.
78. Jiang L, Zhang W, Li W, Ling C, Jiang M. *Anti-inflammatory drug, leflunomide and its metabolite teriflunomide inhibit NSCLC proliferation in vivo and in vitro.* Toxicol 2018, 282: 154-165.
79. Kaplan MH, Wurster AL, Smiley ST, Grusby MJ. *Stat6-dependent and -independent pathways for IL-4 production.* J Immunol 1999, 163: 6536-6540.
80. Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. *Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy.* Vet Immunol Immunopathol 2008, 123: 337-344.
81. Kim SE. *Leflunomide for the Treatment of Immune-Mediated Uveitis in a Dog.* J Am Anim Hosp Assoc 2024, 60: 31-35.
82. Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. *T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production.* Cytokine 1997, 9: 427-436.
83. Korn T, Toyka K, Hartung HP, Jung S. *Suppression of experimental autoimmune neuritis by leflunomide.* Brain 2001, 124: 1791-1802.
84. Kravčenia B, Mašlanka T. *Mycophenolate Mofetil, an Inhibitor of Inosine Monophosphate Dehydrogenase, and Tofacitinib, a Janus Kinase Inhibitor, Attenuate Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Allergic Asthma.* Molecules 2024, 29: 5293.
85. Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. *Atopic dermatitis.* Lancet 2020, 396: 345-360.
86. Lee S, Shah T, Yin C, Hochberg J, Ayello J, Morris E, van de Ven C, Cairo MS. *Ruxolitinib significantly enhances in vitro apoptosis in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma and survival in a lymphoma xenograft murine model.* Oncotarget 2018, 11: 9776-9788.
87. Létourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. *IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets.* J. Allergy Clin Immunol 2009, 123: 758-762.
88. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. *Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy.* Immunity 2013, 38: 13-25.
89. Lim D, Jin Y, Son Y, Oh T, Bae S. *A suspected case of a multiple autoimmune syndrome in a Poodle dog.* Vet Med Sci 2022, 8: 431-436.
90. Lin L, Dai F, Wei J, Chen Z. *CD8⁺ Tregs ameliorate inflammatory reactions in a murine model of allergic rhinitis.* Allergy Asthma Clin Immunol 2021, 17: 74.
91. Little PR, King VL, Davis KR, Cosgrove SB, Stegemann MR. *A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs.* Vet Dermatol 2015, 26: 23-30.
92. Lückel C, Picard FSR, Huber M. *Tc17 biology and function: Novel concepts.* Eur J Immunol 2020, 50: 1257-1267.
93. Lv Y, Qi J, Babon JJ, Cao L, Fan G, Lang J, Zhang J, Mi P, Kobe B, Wang F. *The JAK-STAT pathway: from structural biology to cytokine engineering.* Signal Transduct Target Ther 2024, 9: 221.

94. Maeda S, Tsuchida H, Marsella R. *Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles*. Vet Dermatol 2007, 18: 422-426.
95. Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjørnbeth BA, Torgersen KM, Taskén K, Aandahl EM. *Generation of highly suppressive adaptive CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells by continuous antigen stimulation*. Eur J Immunol 2008, 38: 640-646.
96. Majewska A, Dembele K, Dziendzikowska K, Prostek A, Gajewska M. *Cytokine and Lymphocyte Profiles in Dogs with Atopic Dermatitis after Allergen-Specific Immunotherapy*. Vaccines 2022, 10: 1037.
97. Majewska A, Gajewska M, Dembele K, Maciejewski H, Prostek A, Jank M. *Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis*. BMC Vet Res 2016, 12: 174.
98. Manna SK, Aggarwal BB. *Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression*. Immunol 1999, 162: 2095-2102.
99. Markham A. *Baricitinib: First Global Approval*. Drugs 2017, 77: 697-704.
100. Markham A, Keam SJ. *Peficitinib: First Global Approval*. Drugs 2019, 79: 887-891.
101. Marsella R, Doerr K, Gonzales A, Rosenkrantz W, Schissler J, White A. *Oclacitinib 10 years later: lessons learned and directions for the future*. J Am Vet Med Assoc 2023, 261: S36-S47.
102. Maślanka T. *Effect of dexamethasone and meloxicam on counts of selected T lymphocyte subpopulations and NK cells in cattle - In vivo investigations*. Res Vet Sci 2014, 96: 338-46.
103. Ménoret S, Tesson L, Remy S, Gourain V, Sérazin C, Usal C, Guiffes A, Chenouard V, Ouisse LH, Gantier M, Heslan JM, Fourgeux C, Poschmann J, Guillonneau C, Anegon I. *CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T cell characterization in the rat using a unique transgenic Foxp3-EGFP model*. BMC Biol 2023, 21: 8.
104. Nafe LA, Dodam JR, Reinero CR. *In-vitro immunosuppression of canine T-lymphocyte-specific proliferation with dexamethasone, cyclosporine, and the active metabolites of azathioprine and leflunomide in a flow-cytometric assay*. Can J Vet Res 2014, 78: 168-175.
105. Nakagome K, Nagata M. *The Possible Roles of IL-4/IL-13 in the Development of Eosinophil-Predominant Severe Asthma*. Biomolecules 2024, 14: 546.
106. Nakashima C, Otsuka A, Kabashima K. *Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis*. Exp Dermatol 2018, 27: 327-331.
107. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. *Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis*. Clin Exp Allergy 2002, 32: 789-795.
108. Ochoa-Repáraz J, Colpitts SL, Kircher C, Kasper EJ, Telesford, KM, Begum-Haque S, Pant A, Kasper LH. *Induction of gut regulatory CD39⁺ T cells by teriflunomide protects against EAE*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2016, 3: e291.
109. Olivry T, Naydan DK, Moore PF. *Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis*. Am J Dermatopathol 1997, 19: 477-486.
110. Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF. *Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs*. Exp Dermatol 1999, 8: 204-211.
111. Ong PY, Leung DY. *Immune dysregulation in atopic dermatitis*. Curr Allergy Asthma Rep 2006, 6: 384-389.
112. ParampalliYajnanarayana S, Stübiger T, Cornez I, Alchalby H, Schönberg K, Rudolph J, Triviai I, Wolschke C, Heine A, Brossart P, Kröger N, Wolf D. *JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms*. Br J Haematol 2015, 169: 824-833.

113. Plager DA, Torres SMF, Koch SN, Kita H. *Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases*. Vet Immunol Immunopathol 2012, 149: 136-142.
114. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. *Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27*. Semin Immunol 2011, 23: 438-45.
115. Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC. *Review: Lymphocytes, Cytokines, Chemokines and the T-helper 1–T-helper 2 Balance in Canine Atopic Dermatitis*. Vet Dermatol 2015, 26: 124-e32.
116. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, Ciceri F, Castagna A, Colombo G, Dagna L. *Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review*. Biomed Res Int 2018: 9095275.
117. Ransom JT. *The immunosuppressant leflunomide inhibits lymphocyte proliferation by inhibiting pyrimidine biosynthesis*. J. Pharmacol. Exp. Ther 1995, 275: 1043-1049.
118. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. *Dose translation from animal to human studies revisited*. FASEB J 2007, 22: 659–661.
119. Reddig A, Voss L, Guttek K, Roggenbuck D, Feist E, Reinhold D. *Impact of Different JAK Inhibitors and Methotrexate on Lymphocyte Proliferation and DNA Damage*. J Clin Med 2021, 10: 1431.
120. Ringshausen I, Oelsner M, Bogner C, Peschel C, Decker T. *The immunomodulatory drug Leflunomide inhibits cell cycle progression of B-CLL cells*. Leukemia 2008, 22: 635-638.
121. Roskoski R Jr. *Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases*. Pharmacol Res 2016, 111: 784-803.
122. Rugg CA, McCandless EE, Messamore JE, Gonzales AJ. *Oclacitinib (Apoquel) inhibits allergen-induced production of interleukin-31 but not interferon- γ or interleukin-4 in canine Th2 cells*. Vet Dermatol 2014, 25: 283-405.
123. Saleh R, Elkord E. *FoxP3⁺ T regulatory cells in cancer: Prognostic biomarkers and therapeutic targets*. Cancer Lett 2020, 490: 174-85.
124. Sato, M., Veir. J.K., Legare, M., Lappin, M.R. *A Retrospective Study on the Safety and Efficacy of Leflunomide in Dogs*. J Vet Intern Med 2017 31: 1502-1507.
125. Schlotter YM, Rutten VP, Riemers FM, Knol EF, Willemse T. *Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness*. Vet Immunol Immunopathol 2011, 143: 20-26.
126. Seif F, Khoshmirsafa M, Aazami H, Mohsenzadegan M, Sedighi G, Bahar M. *The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells*. Cell Commun Signal 2017, 15: 23.
127. Siemasko K, Chong AS, Jäck HM, Gong H, Williams JW, Finnegan A. *Inhibition of JAK3 and STAT6 tyrosine phosphorylation by the immunosuppressive drug leflunomide leads to a block in IgG1 production*. J Immunol 1998, 160: 1581-1588.
128. Sinke JD, Thepen T, Bihari IC, Rutten VP, Willemse T. *Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis*. Vet Immunol Immunopathol 1997, 57: 13-23.
129. Sowden JM, Powell RJ, Allen BR. *Selective activation of circulating CD4⁺ lymphocytes in severe adult atopic dermatitis*. Br J Dermatol 1992, 127: 228-232.
130. Stosović R, Bogić M. *The role of eosinophilic leukocytes in allergic inflammation*. Srp Arh Celok Lek 1998, 126: 130-137.

131. Sun J, Shigemitsu H, Tanaka Y, Yamauchi T, Ueda T, Iwasaki H. *Tetracyclines downregulate the production of LPS-induced cytokines and chemokines in THP-1 cells via ERK, p38, and nuclear factor- κ B signaling pathways*. Biochem Biophys Rep 2015, 5: 397-404.
132. Tamamoto-Mochizuki C, Santoro D, Saridomikelakis MN, Eisenschenk MNC, Hensel P, Pucheu-Haston C, *International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA) Update on the Role of Cytokines and Chemokines in Canine Atopic Dermatitis*. Vet Dermatol 2024, 35: 25-39.
133. Tousa S, Semitekolou M, Morianos I, Banos A, Trochoutsou AI, Brodie TM, Poulos N, Samitas K, Kapasa M, Konstantopoulos D, Paraskevopoulos G, Gaga M, Hawrylowicz CM, Sallusto F, Xanthou G. *Activin-A co-opts IRF4 and AhR signaling to induce human regulatory T cells that restrain asthmatic responses*. Proc Natl Acad Sci USA 2017, 114: e289-e2900.
134. Tsai S, Shameli A, Santamaria P. *CD8+ T cells in Autoimmunity*. Immunologia 2008, 27: 11-21.
135. US Food and Drug Administration (FDA). Apoquel. Oclacitinib Tablet. Freedom of information summary. Original new drug application. NADA 141-345. Available here: <https://animaldrugsatfda.fda.gov/adafda/app/search/public/document/downloadFoi/902>.
136. von Seth M, Sjölin J, Larsson A, Eriksson M, Hillered L, Lipcsey M. *Effects of tigecycline and doxycycline on inflammation and hemodynamics in porcine endotoxemia: a prospective, randomized, and placebo-controlled trial*. Shock 2015, 43: 604-611.
137. Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N. *Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks*. J Clin Invest 2010, 120: 2867-2875.
138. Wang S, Li H, Lian Z, Deng S. *The Role of m6A Modifications in B-Cell Development and B-Cell-Related Diseases*. Int J Mol Sci 2023, 24: 4721.
139. Walker C, Kägi MK, Ingold P, Braun P, Blaser K, Bruijnzeel-Koomen CA, Wüthrich B. *Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity*. Clin Exp Allergy 1993, 23: 145-153.
140. Weller PF, Spencer LA. *Functions of tissue-resident eosinophils*. Nat Rev Immunol 2017, 17: 746-760.
141. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. *Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer*. Immunity 2019, 50: 302-316.
142. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. *The development and function of regulatory T cells*. Cell Mol Life Sci 2009, 66: 2603-2622.
143. Xu X, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS. *Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide*. J Biol Chem 1995, 270: 12398-12403.

5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ ALBO ARTYSTYCZNĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ LUB INSTYTUCJI KULTURY, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ

5.1. Badania prowadzone w National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine w Japonii

W 2017 roku w trakcie dwumiesięcznego pobytu w National Research Center for Protozoan Diseases Uniwersytetu Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine w Japonii prowadziłam badania naukowe pt. “The use of cross-protection between *Babesia microti* and *Plasmodium chabaudi* to study the host defence mechanism against blood-stage malaria”. W ramach swoich obowiązków wykonywałam iniekcje dootrzewnowe *Plasmodium chabaudi* oraz *Babesia microti* u myszy oraz pobierałam próbki krwi, a następnie wykonywałam rozmazy krwi w celu identyfikacji poziomu parazytemii. Dodatkowo, prowadziłam również oznaczenia poziomu wybranych cytokin (TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL12, IFN- γ) oraz przeciwciał (IgG1, IgG2a, IgG2b) w osoczu pozyskanym od myszy przy użyciu testów ELISA. Następnie dokonywałam analizy statystycznej uzyskanych wyników oraz porównywałam uzyskane wyniki pomiędzy grupami badawczymi. Należy zaznaczyć, że powyższe badania były wycinkiem bardzo szerokich badań prowadzonych przez międzynarodowy zespół naukowców w tej jednostce badawczej przez kilka lat, niemniej jednak w jakimś stopniu przyczyniły się do uzyskania wyników mających znaczenie kliniczne. Uzyskane wyniki kilkuletnich badań prowadzonych w jednostce wykazały, że wcześniejsze zakażenie *Babesia microti* chroniło myszy przed śmiertelnymi zakażeniami malarią, a za tą ochronę w dużej mierze odpowiadały makrofagi. Dodatkowo w roku 2019 odbyłam również krótszy, dwutygodniowy staż w tej samej jednostce badawczej, w trakcie którego prowadziłam głównie badania dotyczące określenia liczebności komórek NK oraz makrofagów u myszy z malarią i/lub babeszjozą za pomocą cytometrii przepływowej.

5.2. Badania prowadzone w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

W 2022 roku podczas trzytygodniowego pobytu w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku prowadziłam badania dotyczące oceny właściwości cytotoksycznych pochodnych 4-thiazolidinonu (zsyntetyzowanych w

Zakładzie) wobec linii komórkowych raka piersi. W tym celu pasażowałam linie komórkowe MCF-7 i MDA-MB-231, zakładałam ich hodowle *in vitro* i eksponowałam komórki na badane substancje (m.in. na LES-331), a następnie po 24 godzinach inkubacji prowadziłam testy MTT wraz z odczytem jego wyników za pomocą analizy spektrofotometrycznej. Wyniki badań wykazały, że LES-331 wykazywał działanie cytotoksyczne wobec obu badanych linii komórkowych. Prowadzone badania były częścią większego projektu realizowanego w Zakładzie, w którym oceniano również inne molekularne mechanizmy działania LES-331 (m.in. jego wpływ na apoptozę czy poziom kaspazy 8 i 9 oraz topoizomerazy II). Wyniki badań tego projektu wykazały, że LES-331 wydaje się być obiecującą substancją będącą kandydatem na lek przeciwnowotworowy w leczeniu raka piersi.

6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ LUB SZTUKĘ

6. 1. Osiągnięcia dydaktyczne

- Kierownik i koordynator dydaktyczny przedmiotów: *Farmacja* (w języku angielskim dla studentów kierunku weterynaria); *Technologia postaci leku* (dla studentów kierunku biotechnologia farmaceutyczna); *Technologia postaci leku* (w języku polskim i angielskim dla studentów kierunku weterynaria).
- Prowadząca wykłady z przedmiotów: *Technologia postaci leku* (dla studentów kierunku biotechnologia farmaceutyczna) oraz *Technologia postaci leku* (w języku polskim i angielskim dla studentów kierunku weterynaria).
- Prowadząca ćwiczenia z przedmiotów: *Farmacja* (dla studentów kierunku weterynaria); *Farmakologia weterynaryjna I i II* (dla studentów kierunku weterynaria); *Technologia postaci leku* (dla studentów kierunku weterynaria); *Farmakologia* (dla studentów kierunku biotechnologia farmaceutyczna); *Technologia postaci leku* (dla studentów kierunku biotechnologia farmaceutyczna).
- Koordynator wprowadzania planów obciążenia dydaktycznego w systemie USOS w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie.
- Nauczyciel przedmiotu *technologia postaci leku* w Policealnej Szkole dla młodzieży Pasja na kierunku technik farmaceutyczny w latach 2014-2024.
- Ukończony kurs pedagogiczny dla czynnych zawodowo nauczycieli.

6. 2. Osiągnięcia organizacyjne

- Promotor pomocniczy w rozprawie doktorskiej mgr inż. Bernarda Kravčeni. Uchwała Rady Naukowej Szkoły Doktorskiej UWM w Olsztynie z 11 grudnia 2024.
- Promotor pomocniczy w rozprawie doktorskiej mgr inż. Aleksandry Łukawskiej. Uchwała Rady Naukowej Szkoły Doktorskiej UWM w Olsztynie z 13 września 2021.
- Recenzent pracy magisterskiej mgr Anny Chmielewskiej zatytułowanej „Ocena wpływu kwasu mykofenolowego na limfocyty T i B oraz komórki NK w zakresie wybranych parametrów”. Obrona pracy 02.07.2021.
- Promotor pracy magisterskiej mgr Justyny Pstrąg zatytułowanej „Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych o różnej selektywności względem COX na produkcję wybranych cytokin przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ - badania in vitro z użyciem mysich limfocytów”. Obrona pracy 30.09.2020.

- Koordynator Systemu Zapewnienia Jakości w zakresie Dobrej Praktyki Laboratoryjnej oraz Dobrej Praktyki Klinicznej Weterynaryjnej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie w latach 2013-2022.
- Członek Komitetu Sterującego w projekcie „Budowa i Wyposażenie Centrum Popularyzacji Nauki i Innowacji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie” na podstawie Decyzji Nr 59/2022 Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Komitet działał w okresie 24.05.2022 - 01.09.2023.
- Członek Komitetu Naukowego organizującego Olsztyńskie Dni Nauki i Sztuki w dniach 20-22 września 2023.
- Opiekun Pracowni Immunofarmakologii i Biotechnologii w Katedrze Farmakologii i Toksykologii od roku 2018.
- Członek komitetu organizacyjnego konferencję naukowo-szkoleniową: „*Nowe trendy w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej*”, Warchały, 27 - 29.06.2017.
- Członek komitetu organizacyjnego konferencję naukowo-szkoleniową: „*Współczesne kierunki badań w farmakologii i toksykologii weterynaryjnej*”, Łańsk, 25 - 28.06.2019.
- Członek komitetu organizacyjnego konferencję naukowo-szkoleniową: „*Nowe koncepcje leczenia chorób ludzi i zwierząt z zastosowaniem leków konwencjonalnych, biologicznych i preparatów probiotycznych*”, Barczewo, 12 - 15.06.2023.
- Członek komitetu organizacyjnego XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych: „*Sanitas animalium pro salute homini*” Olsztyn, 19 - 21.09.2024, w którym pełniłam również rolę Kierownika Biura Kongresu.
- Opiekun naukowy stażu dr hab. Agnieszki Gornowicz z zakładu Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w Katedrze Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie w dniach 06-17.09.2021.
- Członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych od 2017 roku.
- Członek Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego od 2013 roku.
- Członek Europejskich Towarzystw Toksykologicznych od 2013 roku.
- Członek Międzynarodowej Unii Toksykologicznej od 2013 roku.
- Członek Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej jako przedstawiciel doktorantów w latach 2013-2014.
- Kierownik projektu „*Wdrożenie metod dotyczących oceny cytotoksyczności limfocytów T oraz komórek NK w warunkach in vitro*” finansowanego przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” w ramach rozwoju warsztatu

badawczego młodych pracowników nauki na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie. Kwota dofinansowania: 64 000 zł. Czas trwania projektu: 07.05.2019 – 30.10.2019.

- Kierownik projektu „*Farmakokinetyka i interakcje tigecykliny u indyków*”. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 5. Okres kierowania projektem: 12.03.2014 - 11.03.2016. Nr projektu 2013/09/N/NZ7/03545.
- Recenzent artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Journal of Elementology* (1), *Multiple Sclerosis and Related Disorders* (1), *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2), *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* (1), *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* (1), *Veterinary Research Communication* (1).

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

- Przeprowadzenie zajęć praktycznych „*Apteka od kuchni*” dla dzieci i młodzieży w ramach 21 Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki w dniach 20-22 września 2023. Identyczne warsztaty zaplanowane są również na dzień 25.06.2025 w ramach 23 Dni Nauki i Sztuki.
- Przeprowadzenie szkolenia z zakresu technik hodowli komórkowej dla uczniów Uniwersyteckiego XII Liceum Ogólnokształcącego im. Marii i Georga Dietrichów w Olsztynie w wymiarze 3 godzin.

7. INNE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

7.1. Zrealizowane projekty badawcze

- Wykonawca w projekcie *“Opracowanie karmy na bazie białka owadziego dla zwierząt towarzyszących z dietozależnymi enteropatiami”* realizowanym w ramach programu Lider XII finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Okres pełnienia funkcji wykonawcy: 01.02.2023-29.02.2024. Nr projektu LIDER/5/0029/L-12/20/NCBR/2021.
- Wykonawca w projekcie *„Badania nad innowacyjnym lekiem o działaniu immunostymulującym u zwierząt”*. Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego. Okres pełnienia funkcji wykonawcy: 04.11.2013-31.12.2015. Nr projektu UDA-POIG.01.03.01-28-108/10-01.
- Kierownik projektu *„Farmakokinetyka i interakcje tigeocykliny u indyków”*. Projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium 5. Okres kierowania projektem: 12.03.2014 - 11.03.2016. Nr projektu 2013/09/N/NZ7/03545.
- Kierownik projektu *„Wdrożenie metod dotyczących oceny cytotoksyczności limfocytów T oraz komórek NK w warunkach in vitro”* finansowanego przez Konsorcjum Naukowe KNOW *„Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”* w ramach rozwoju warsztatu badawczego młodych pracowników nauki na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Olsztynie. Okres kierowania projektem: 07.05.2019 – 30.10.2019.

7.2. Odbyte staże zagraniczne i krajowe

- Staż naukowy w National Research Center for Protozoan Disease, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japonia, w okresie od 17 kwietnia do 12 czerwca 2017.
- Staż naukowy w National Research Center for Protozoan Disease, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Japonia, w okresie 3-14 września 2019.
- Staż naukowo-dydaktyczny w Zakładzie Biotechnologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku 01.08.2022-21.08.2022. Wyjazd finansowany z programu POWR.03.05.00-00-Z310/17 pn. Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

7.3. Ukończone kursy i szkolenia specjalistyczne

- Certyfikat Cambridge English Level 1 Certificate in ESOL International (First).
- Szkolenie „*Na styku psychologii z technologią – jak można wspierać budowanie dobrostanu pracowników i zespołów*” 29.11.2023 w Olsztynie.
- Stypendium Santander Universidades „*Business for all – Managing yourself*” prowadzone przez Harvard Business Publishing w terminie 18.07.2023 – 06.10.2023.
- Stypendium językowe Santander Universidades – kurs języka angielskiego na poziomie C2 prowadzony przez British Council w terminie 02.06.2023- 02.08.2023.
- Udział w warsztatach Design Thinking mającym na celu wypracowanie strategii współpracy między biznesem i nauką w ramach Regionalnej Inteligentnej Specjalizacji „*Żywność Wysokiej Jakości*” zorganizowanym przez Centrum Współpracy z Otoczeniem Społeczno-Gospodarczym UWM w Olsztynie. 15.03.2023 w Olsztynie.
- Szkolenie z języka angielskiego poziom C1 realizowane przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie w ramach projektu pt. Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach działania 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych 14.11.2020- 28.06.2021.
- Szkolenie specjalistyczne „*Unikanie kontaminacji w hodowlach komórkowych*” 11.06.2019 (Eppendorf).
- Szkolenie specjalistyczne „*XI Szkoła Cytometrii Przepływowej*” w dniach 18-18.04.2018 w Warszawie (BD Biosciences).
- Szkolenie specjalistyczne „*Innowacyjne technologie do analizy komórek*” 14.03.2018 w Olsztynie (Merck).
- Szkolenie „*Praktyczne aspekty Dobrej Praktyki Laboratoryjnej DPL*” 01.09.2017 w Olsztynie (Rondo sp z o.o.).
- Szkolenie specjalistyczne Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzenie, osób wykonujących procedury i uśmiercających zwierzęta 01-05.02.2016 w Warszawie (Pollasa).
- Szkolenie „*Koordinator systemu zapewnienia jakości GLP*” 18.05.2014 w Olsztynie (Leader Group).
- Szkolenie „*Prowadzenie badań według zasad Dobrej Praktyki Klinicznej Weterynaryjnej*” 23.04.2014 (ClinMed Pharma).

- Szkolenie „Praktyczne aspekty wdrożenia systemu Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP)” 04.12.2013 w Warszawie (CE2 Centrum Edukacji).
- Szkolenie „Młody przedsiębiorca” w ramach projektu: Komercjalizacja wyników badań oraz kreowanie postaw przedsiębiorczych przez UWM poprzez staże. Szkolenia i działania uświadamiające z zakresu przedsiębiorczości akademickiej. 03.11.2010 - 27.05.2011 w Olsztynie.

7.4. Uzyskane nagrody i wyróżnienia

- Nagroda indywidualna III stopnia Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za osiągnięcia organizacyjne 01.12.2024.
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za wyróżniające się publikacje w 2021 roku 17.11.2022.
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za wyróżniające się publikacje w 2020 roku 29.01.2021.
- Nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie III stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej 01.12.2018.
- Nagroda Indywidualna III stopnia Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za osiągnięcia w dziedzinie naukowej 01.12.2017
- Nagroda Indywidualna II stopnia Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za osiągnięcia w dziedzinie naukowej 01.12.2015.

7.5. Wykaz opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/ MEiN	IF	Cytow. Web of Science
1. ORYGINALNE PRACE EKSPERYMENTALNE				
a) Prace opublikowane przed obroną pracy doktorskiej				
1. 1.	Jasiecka A, Grabowski T, Maślanka T, Ziółkowski H, Jaroszewski JJ. (2013) <i>Pharmacokinetics of orally administered simvastatin in turkeys</i> . Pol J Vet Sci 16: 377-379.	20	0,712	1
1. 2.	Maślanka T, Jaroszewski JJ, Markiewicz W, Jasiecka A, Ziółkowski H, Jędrzkiewicz D. (2013) <i>Effects of dexamethasone and meloxicam on bovine CD25⁺CD8⁺ and CD25⁻CD8⁺ T cells – in vitro study</i> . Res Vet Sci 94: 662-674.	35	1,511	17

1. 3.	Ziółkowski H, Jaroszewski JJ, Maślanka T, Grabowski T, Katolik K, Pawęska J, Siemianowska M, Jasiecka A , Markiewicz W, Spodniewska A. (2014) <i>Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics</i> . Res Vet Sci 97: 99-104.	35	1,409	17
1. 4.	Zuśka-Prot M, Maślanka T, Jasiecka A , Jaroszewski JJ. (2014) <i>Prostaglandin E2 inhibits IL-10 production by bovine CD4⁺ T cells</i> . Pol J Vet Sci 17: 511-513.	20	0,604	0
1. 5.	Maślanka T, Spodniewska A, Barski D, Jasiecka A , Zuśka-Prot M, Ziółkowski H, Markiewicz W, Jaroszewski JJ. (2014) <i>Prostaglandin E2 down-regulates the expression of CD25 on bovine T cells, and this effect is mediated through the EP4 receptor</i> . Vet Immunol Immunopathol 160: 192-200.	25	1,535	16
1. 6.	Markiewicz W, Jasiecka A , Barski D, Janiuk J, Bossowska A, Jaroszewski JJ. (2014) <i>The influence of doxazosin, an α1-adrenergic receptor antagonist on the urinary bladder contractility in pigs</i> . Pol J Vet Sci 17: 527-529.	20	0,604	6
1. 7.	Sokół R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Jasiecka A , Ziółkowski H, Jaroszewski JJ. (2015) <i>A comparison of the efficacy and pharmacokinetics of ivermectin after spring and autumn treatments against Cyathostominae in horses</i> . Pol J Vet Sci 18: 371-377.	20	0,719	5
1. 8.	Maślanka T, Otrocka-Domagała I, Zuśka-Prot M, Mikiewicz M, Przybysz J, Jasiecka A , Jaroszewski JJ. (2016) <i>IκB kinase β inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4⁺ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes</i> . Eur J Pharmacol 775: 78-85.	30	2,896	11
1. 9.	Maślanka T, Chrostowska M, Otrocka-Domagała I, Snarska A, Mikiewicz M, Zuśka-Prot M, Jasiecka A , Ziółkowski H, Markiewicz W, Jaroszewski JJ. (2016) <i>Prostaglandin E2 exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells</i> . Res Vet Sci 107: 80-87.	35	1,298	2
1. 10.	Ziółkowski H, Grabowski T, Jasiecka A , Zuśka-Prot M, Barski D, Jaroszewski JJ. (2016) <i>Pharmacokinetics of oxytetracycline in broiler chickens following different routes of administration</i> . Vet J. 208: 96-98.	40	1,802	15
1. 11.	Ziółkowski H, Jasiecka A , Zuska-Prot M, Przybysz J, Grabowski T, Jaroszewski JJ. (2016) <i>Metal ion-oxytetracycline pharmacokinetic interactions after oral co-administration in broiler chickens</i> . Poult Sci 95: 1927-1933.	35	1,908	7

b) Prace opublikowane po obronie pracy doktorskiej nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zgłaszanego w postępowaniu habilitacyjnym				
1. 12.	Jasiecka-Mikołajczyk A, Jaroszewski JJ. (2017) <i>Determination of tigecycline in turkey in plasma by LC-MS/MS: validation and application in a pharmacokinetic study.</i> Pol J Vet Sci 20: 241-249.	20	0,839	9
1. 13.	Jasiecka-Mikołajczyk A, Ziółkowski H, Jaroszewski JJ. (2018) <i>Pharmacokinetics of tigecycline in turkeys following different routes of administration.</i> J Vet Pharmacol Ther 41: e22-e29.	30	1,441	4
1. 14.	Jasiecka-Mikołajczyk A, Jaroszewski JJ, Maślanka T. (2018) <i>Effect of tigecycline on the production of selected cytokines and counts of murine CD4⁺ and CD8⁺ T cells - in vitro study.</i> Pol J Vet Sci 21: 819-822.	20	0,802	0
1. 15.	Madej-Śmiechowska H, Orzoł A, Jasiecka-Mikołajczyk A, Ziółkowski H, Jaroszewski JJ. (2018) <i>Differences in the pharmacokinetics of flumequine after single and continuous oral administration in non-fasted broiler chickens.</i> Pol J Vet Sci 21: 631-634.	20	0,802	0
1. 16.	Jasiecka-Mikołajczyk A, Socha P (2020) <i>Teriflunomide inhibits activation-induced CD25 expression on T cells and may affect Foxp3-expressing regulatory T cells.</i> Res Vet Sci 132: 17-27.	100	2,534	4
1. 17.	Ziółkowski H, Jasiecka-Mikołajczyk A, Madej-Śmiechowska H, Janiuk J, Zygmuntowicz A, Dąbrowski M. (2020) <i>Comparative pharmacokinetics of chlortetracycline, tetracycline, minocycline, and tigecycline in broiler chickens.</i> Poult Sci 99: 4750-4757.	140	3,352	7
1. 18.	Kuczyński M, Łuba M, Mikołajczyk T, Pierożyński B, Jasiecka-Mikołajczyk A, Smoczyński L, Sołowiej P, Wojtacha P. (2021) <i>Electrodegradation of acid mixture dye through the employment of Cu/Fe Macro-Corrosion galvanic cell in Na₂SO₄ synthetic wastewater.</i> Molecules 26: 4580.	140	4,927	7
1. 19.	Gregorczyk I, Jasiecka-Mikołajczyk A, Maślanka T. (2021) <i>Blockade of NF-κB Translocation and of RANKL/RANK Interaction Decreases the Frequency of Th2 and Th17 Cells Capable of IL-4 and IL-17 Production, Respectively, in a Mouse Model of Allergic Asthma.</i> Molecules 26: 3117.	140	4,927	18
1. 20.	Bęś A, Sikorski Ł, Mikołajczyk T, Kuczyński M, Łuba M, Pierożyński B, Jasiecka-Mikołajczyk A. (2022) <i>Electrodegradation of Acid Mixture Dye through the Employment Electrooxidation and Lemnoideae in Na₂SO₄ Synthetic Wastewater.</i> Applied Sciences-Basel 12: 1-17.	100	2,700	1
1. 21.	Maślanka T, Jasiecka-Mikołajczyk A. (2023) <i>Teriflunomide induces Foxp3 expression in murine CD8⁺ T cells while IL-27 and</i>	100	0,800	0

	<i>retinoic acid exert a synergistic effect on the induction of CD39 expression on these cells. Pol J Vet Sci 26: 591-609.</i>			
1. 22.	Łuba M, Mikołajczyk T, Kuczyński M, Pierożyński B, Jasiecka-Mikołajczyk A , Rasiński B, Wojtacha P. (2023). <i>Electrochemical purification of Disperse Red 167 azo dye-based synthetic wastewater through the electrooxidation and electrocoagulation with Fe ions derived from Cu/Fe macro-corrosion galvanic cell. Desalin Water Treat 287: 67-79.</i>	100	1,000	1
c) Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zgłaszanego w postępowaniu habilitacyjnym				
1. 23.	Jasiecka-Mikołajczyk A , Jaroszewski JJ, Maślanka T. (2018) <i>Oclacitinib depletes canine CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro. Res Vet Sci, 121: 124-129.</i>	35	1,751	16
1. 24.	Jasiecka-Mikołajczyk A , Jaroszewski JJ, Maślanka T. (2021) <i>Oclacitinib, a Janus Kinase Inhibitor, Reduces the Frequency of IL-4- and IL-10-, but Not IFN-γ-, Producing Murine CD4⁺ and CD8⁺ T Cells and Counteracts the Induction of Type 1 Regulatory T Cells. Molecules 26: 1-19.</i>	140	4,927	9
1. 25.	Jasiecka-Mikołajczyk A , Maślanka T. (2023) <i>Depletion of T and B cells in lymphoid tissues of mice induced by oclacitinib, a Janus kinase inhibitor. Pol J Vet Sci 26: 431-440.</i>	100	0,800	3
1. 26.	Jasiecka-Mikołajczyk A , Socha P. (2024) <i>Treatment with oclacitinib, a Janus kinase inhibitor, down-regulates and up-regulates CD25 and Foxp3 expression, respectively, in peripheral blood T cells of dogs with atopic dermatitis. BMC Veterinary Research 2024, 20: 489.</i>	140	2,300	0
2. PRACE PRZEGLĄDOWE				
a) Prace opublikowane przed obroną pracy doktorskiej				
2. 1.	Ziółkowski H, Jaroszewski J, Ziółkowska N, Jasiecka A . (2012) <i>Characteristics of selected second-generation antiepileptic drugs used in dogs. Pol J Vet Sci 15: 571-582.</i>	20	0,570	3
2. 2.	Jasiecka A , Maślanka T, Jaroszewski JJ. (2014) <i>Pharmacological characteristics of metamizole. Pol J Vet Sci 17: 207-214.</i>	20	0,604	104

24.06.2025 Agnieszka Jasiecka-Mikołajczyk
(podpis wnioskodawcy)