

**Autoreferat**  
**wraz z opisem**  
**pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

**dr n. wet. Aleksandra Pliszcak-Król**

**Zakład Patofizjologii**  
**Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej**  
**Wydział Medycyny Weterynaryjnej**  
**Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu**

**1. Imię i nazwisko**

Aleksandra Pliszcak-Król

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe (nazwy, miejsca i rok ich uzyskania)**

09. 05. 2000 doktor nauk weterynaryjnych,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Akademia Rolnicza we Wrocławiu.

**Tytuł pracy doktorskiej**

„Reaktywność limfocytów krwi kurcząt z doświadczalną dysfunkcją układu limfatycznego”

01. 03. 1990 lekarz weterynarii,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Akademia Rolnicza we Wrocławiu.

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

Od 01. 06. 2000: adiunkt  
Zakład Patofizjologii,  
Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii  
i Weterynarii Sądowej (do 2010 r.),  
Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej (od 2010 r.),  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.

01. 03. 1990 - 31. 05. 2000: asystent,  
Zakład Patofizjologii,  
Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii i Weterynarii Sądowej,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Akademia Rolnicza we Wrocławiu.

**Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 219 ust. 1. pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. ze zm. w Dz. U. z 2021 r. poz. 478).**

### **Tytuł osiągnięcia naukowego**

„Analiza parametrów hemostazy u zwierząt zdrowych i w wybranych stanach patologicznych”

### **Publikacje naukowe stanowiące osiągnięcie naukowe**

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 3 oryginalnych, powiązanych tematycznie publikacji, w których jestem pierwszym, a także korespondencyjnym autorem.

1. **Pliszcza-Król A., Rząsa A., Gemra M., Król J., Łuczak G., Zyzak A., Zalewski D., Iwaszko-Simonik A., Graczyk S. Age-related changes of platelet and plasma coagulation parameters in young pigs.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016; 28(5): 561-567. <https://doi.org/10.1177/1040638716658928>.  
(punkty MNiSW **30** IF<sub>2016</sub> **0,925**)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 65 %.

2. **Pliszcza-Król A., Gemra M., Kozdrowski R., Zalewski D., Iwaszko A. Involvement of hemostasis in pathophysiology of RAO in horses.** Veterinary Immunology and Immunopathology, 2020, 230.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110128>.  
(punkty MEiN **70** IF<sub>2020</sub> **2,046**)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 80 %.

3. **Pliszcza-Król A., Kielbowicz Z., Król J., Antończyk A., Gemra M., Skrzypczak P., Prządka P., Zalewski D., Bieżyński J., Nicpoń J. Parameters of hemostasis in sheep implanted with composite scaffold settled by stimulated mesenchymal stem cells - evaluation of the animal model.** Materials 2021, 14(22), 6934.  
<https://doi.org/10.3390/ma14226934>.  
(punkty MEiN **140** IF<sub>2021</sub> **3,623**)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaplanowaniu i wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami. Mój udział procentowy szacuję na 70 %.

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor (IF) publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wg Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **6,594**.

Sumaryczna punktacja MEiN publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **240**.

## **Omówienie celu naukowego i wyników prac stanowiących osiągnięcie naukowe**

### **Wprowadzenie**

Hemostaza jest procesem, który odpowiada za utrzymanie krwi w płynnej postaci w łożysku naczyniowym. W przypadku naruszenia integralności naczyń krwionośnych, bierze ona udział w procesie naprawy uszkodzeń jego ściany oraz zapobiega utracie pełnej krwi lub osocza (Spronk *et al.* 2003; Wolberg *et al.* 2012). Dodatkowo, gdy zostaje naruszona integralność ustroju, natychmiastowe uruchomienie mechanizmów hemostazy wspomaga niszczenie i/lub usuwanie czynnika szkodliwego, neutralizowanie uszkodzonych komórek i uwolnionych substancji prozapalnych, a także naprawianie i odtwarzanie utraconych tkanek (Laurens *et al.* 2006; Monroe *et al.* 2012; Opneja *et al.* 2019).

Hemostazę tworzy wysoce zintegrowany system ściśle ze sobą współpracujących składowych, którymi są hemostaza pierwotna i wtórna oraz fibrynoliza (Gentry 2004; Pilcher 2008, van der Poll *et al.* 2014, Riddel *et al.* 2007, Spronk *et al.* 2003). Na hemostazę pierwotną składają się hemostaza naczyniowa i hemostaza płytkowa. Hemostaza naczyniowa związana jest z budową ścian naczyń krwionośnych (warunkuje reaktywność naczyń) i funkcją wydzielniczą komórek śródbłonna - stanowią one barierę fizyczną i biochemiczną między krwią i tkankami (Wolberg *et al.* 2012). Aby odpowiedzieć na bieżące warunki panujące w tkankach oraz ich zapotrzebowanie na substancje odżywcze i tlen, naczynia reagują adekwatnie skurczem lub rozkurczem, a co za tym idzie, zwężeniem lub rozszerzeniem światła, co zapewnia pożądaną objętość krwi oraz odpowiednie tempo jej przepływu. Substancje o działaniu przeciwzakrzepowym, wydzielane przez komórki śródbłonna, czynią go „nieinwazyjnym” dla komórek i składników krwi - wspomagają utrzymanie płynnej postaci krwi. Hemostazę płytkową tworzą płytki krwi, które w miejscu naruszenia ściany naczyń tworzą czop płytkowy dla uszczelnienia uszkodzenia i zatrzymania wypływu krwi (Blair *et al.* 2009; de Witt *et al.* 2014). W wyniku aktywacji

hemostazy wtórnej (zwanej też hemostazą osoczną lub osoczym układem krzepnięcia) tworzona jest fibryna - stabilizujące rusztowanie białkowe dla tworzącego się czopu płytkowego. Hemostaza pierwotna i wtórna tworzą razem układ krzepnięcia krwi. Efektem jego aktywacji jest czop hemostatyczny - zakrzep zbudowany z fibryny i elementów morfotycznych krwi. Mechanizmem antagonistycznym do krzepnięcia jest fibrynoliza, która prowadzi do enzymatycznego rozkładu powstałych zakrzepów.

Biorąc pod uwagę mechanizmy fizyczne i biochemiczne opisywanych procesów, a także interakcje międzykomórkowe, przyjęty został trójfazowy model krzepnięcia krwi (Hoffman *et al.* 2007; Pilcher 2008; Riddel *et al.* 2007). Faza I (zapoczątkowania lub inicjacji) rozpoczyna się w momencie uszkodzenia ściany naczynia krwionośnego. W miejscu uszkodzenia zostają odsłonięte włókna kolagenowe, które stanowią powierzchnię adhezyjną dla płytek krwi (aktywacja płytek). Dochodzi do adhezji, a następnie agregacji aktywnych płytek, które uwalniają czynniki biorące udział w krzepnięciu (fibrynogen, czynniki V i VIII, czynnik vonWillebrand'a). Dodatkowo, na powierzchni uszkodzonych komórek ulega ekspresji czynnik tkankowy (Tissue Factor, TF). Kontakt TF z krwią aktywuje zewnątrzpochodny szlak układu krzepnięcia - enzymatyczną konwersję nieaktywnych czynników osoczych (białek) do formy aktywnej oraz powstanie niewielkiej ilości trombiny. Rozpoczyna się faza II, tj. wzmocnienia (amplifikacji). Naruszenie morfologii śródbłoka zmienia charakter jego aktywności wydzielniczej z przeciwzakrzepowego na prozakrzepowy oraz prowadzi do rozwoju zapalenia, którego mechanizmy także wspomagają krzepnięcie krwi (Iba *et al.* 2018; Wolberg *et al.* 2012). Przebiegające procesy zostają znacząco wzmocnione uaktywnieniem się czynników wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. W rezultacie wytwarzana jest już znaczna ilość trombiny. W fazie III (rozprzestrzeniania się lub propagacji), trombina przekształca fibrynogen w fibrynę; jest to tzw. szlak (tor) wspólny krzepnięcia. Fibryna stanowi rusztowanie dla powstającego zakrzepu, stabilizuje go i unieruchamia w miejscu uszkodzenia ściany naczynia - ściana zostaje uszczelniona. Wszystkie procesy mają przebieg dynamiczny, tzn. zachodzą w bardzo krótkim czasie (sekundy - minuty) i obejmują swoim zasięgiem coraz to większą powierzchnię. Aby przeciwdziałać potencjalnemu zagrożeniu całkowitego zamknięcia światła naczynia, a w konsekwencji, utracie drożności nawet dłuższego odcinka naczyń, budowanie się zakrzepu jest kontrolowane przez inhibitory - jest to ograniczenie (terminacja) krzepnięcia (Riddel *et al.* 2007). Ostatecznie, po zakończeniu gojenia uszkodzonej ściany naczynia, czop hemostatyczny ulega degradacji w procesie fibrynolizy a naczynie zostaje całkowicie udrożnione.

Gdyby hemostazę osoczną (wtórną) wyodrębnić z całego procesu hemostazy, uwidacznia się kaskadowy charakter jej przebiegu (Antoniak 2018; Gentry 2004; Hoffman *et al.* 2007; Long *et al.* 2016; Mackman *et al.* 2007; Pilcher 2008; Riddel *et al.* 2007; Spronk *et al.* 2003). Składają się na nią, wspomniane powyżej, szlaki zewnątrzpochodny i wewnątrzpochodny, które następnie łączą się w szlak wspólny krzepnięcia osocznego. Aktywacja szlaku zewnątrzpochodnego wiąże się z uszkodzeniem ściany naczynia i tkanek przestrzeni okołonaczyniowej. Na powierzchni komórek śródbłoka i mięśni gładkich naczyń, monocytów, a także komórek tkanki łącznej okołonaczyniowej (fibroblastów) dochodzi do ekspresji, ukrytego w nich dotąd, czynnika tkankowego (TF) (Mackman *et al.*

2007; van der Poll *et al.* 2014). W wyniku kontaktu z krwią, TF łączy się z nieaktywnym czynnikiem VII (powstaje czynnik VIIa). Kompleks TF-VIIa aktywuje czynniki X (inicjacja toru wspólnego) oraz IX (w kompleksie tenazy, należącej do układu wewnątrzpochodnego). Aktywny czynnik X (Xa) na powierzchni błon płytek, w obecności jonów  $Ca^{+2}$  wchodzi z kolei w interakcję z czynnikiem V, w wyniku czego tworzy się kompleks protrombinazy. Na tym etapie następuje połączenie z wewnątrzpochodnym szlakiem krzepnięcia. Szlak wewnątrzpochodny rozpoczyna się od aktywacji czynników kontaktu (Long *et al.* 2016). Należą do nich prekallikreina, wielkocząsteczkowy kininogen (HMWK), plazminogen oraz nieaktywny czynnik XII. Na powierzchni ujemnie naładowanych błon płytek krwi aktywuje się czynnik XII (XIIa jest jego formą aktywną). Czynnik XIIa przeprowadza prekallikreinę w aktywną kallikreinę. Z kolei kallikreina konwertuje HMWK do bradykininy, a plazminogen do plazminy. Powstanie bradykininy osoczowej jest jednym z ogniw łączących hemostazę z procesem zapalnym. Natomiast w samym procesie krzepnięcia, czynnik XIIa aktywuje czynnik XI (powstaje XIa), a ten z kolei uaktywnia czynnik IX (powstaje IXa). Ten ostatni wchodzi w interakcję z aktywnym czynnikiem VIIIa na powierzchni błon płytek (w obecności jonów  $Ca^{+2}$ ) i tworzy kompleks tenazy. Na tym etapie następuje połączenie ze szlakiem zewnątrzpochodnym. W następstwie połączenia obu szlaków we wspólny tor krzepnięcia, kompleks tenazy wzmacnia działanie kompleksu protrombinazy. Następuje nasilenie i przyspieszenie konwersji nieaktywnej protrombiny (czynnik II) w aktywną trombinę (czynnik IIa). Trombina katalizuje proteolizę rozpuszczonego w osoczu fibrynogenu, w wyniku czego powstają monomery fibryny (fibryna niestabilizowana). Trombina aktywuje też czynnik XIII, który pośredniczy w polimeryzacji monomerów fibryny - fibryna (polimer) staje się mniej rozpuszczalna i bardziej lepka, stanowiąc silne rusztowanie dla powstającego zakrzepu.

Tworzenie zakrzepu jest ograniczane przez inhibitory o szerokim zakresie oddziaływania; należą do nich antytrombina (AT), białko C oraz inhibitor zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia (TFPI). Efekt hamowania aktywacji krzepnięcia pojawia się bardzo szybko, już w odpowiedzi na powstanie kompleksu TF-VIIa (inhibitorem jest TFPI). Antytrombina (AT) inaktywuje trombinę, główny aktywator krzepnięcia oraz czynnik X. W ten sposób znosi ona efekt działania kompleksu protrombinazy i „odcina” szlak wspólny krzepnięcia. Przez inaktywację czynników IX, XI i XII przyczynia się też do hamowania kompleksu tenazy i do hamowania wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia. Do inhibicji obu wspomnianych szlaków przyczynia się też białko C, inaktywując czynnik V w kompleksie protrombinazy oraz czynnik VIII w kompleksie tenazy.

Fibrynoliza prowadzi do enzymatycznej degradacji struktury zakrzepu (Chapin *et al.* 2015; Hoover-Plow 2016; Pilcher 2008; Rijken *et al.* 2009). Głównym enzymem procesu jest plazmina, powstająca z aktywacji nieczynnego plazminogenu. Do aktywacji plazminogenu dochodzi w fazie amplifikacji krzepnięcia przez czynniki kontaktu (szlak wewnątrzpochodny krzepnięcia). Dodatkowo, jest on aktywowany przez tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) oraz urokinazowy aktywator plazminogenu (u-PA). Aktywacja przez t-PA odbywa się na powierzchni fibryny - finalnego produktu krzepnięcia. Powstała plazmina rozkłada czynniki aktywujące, tj. V, VIII, IX, X, przez co hamuje szlaki wewnątrzpochodny i wspólny krzepnięcia. Degraduje też fibrynogen oraz fibrynę

niestabilizowaną, w wyniku czego powstają tzw. produkty degradacji fibryny (fibrin degradation products-FDP's), oraz fibrynę stabilizowaną, której produktami rozkładu są D-dimery. Fibrynoliza polega nie tylko na degradacji zakrzepów już istniejących, ale także, jako proces antagonistyczny do krzepnięcia, zapobiega tworzeniu się nowych. Jej przebieg jest ściśle nadzorowany przez inhibitory, wśród których do najważniejszych należą: aktywowany trombiną inhibitor fibrynolizy (TAFI; zmienia on strukturę chemiczną fibryny, co uniemożliwia wiązanie do niej plazminogenu i t-PA), inhibitory aktywatora plazminogenu (PAI-1 i PAI-2, uniemożliwiające aktywację samego plazminogenu) oraz  $\alpha$ -antypłazmina (rozkładająca plazminę).

Prawidłowe funkcjonowanie hemostazy jest ściśle uzależnione od precyzyjnej równowagi między sprawnie działającymi mechanizmami jej składowych, czynnikami je aktywującymi i hamującymi oraz relacji komórkowych (płytki - pozostałe komórki krwi, komórki śródbłonna naczyń i komórki przestrzeni okołonaczyniowej) (Blair *et al.* 2009; Foley *et al.* 2016; Iba *et al.* 2018; Spronk *et al.* 2003). Nawet krótkotrwałe zachwianie tej równowagi może prowadzić z jednej strony do krwawień, a z drugiej, do tworzenia się zakrzepów w naczyniach, a nawet rozsianego wewnątrznaczyniowego wykrzepiania krwi (DIC) (Rijken *et al.* 2008; Spronk *et al.* 2003). Utrata krwi lub obecność zakrzepów prowadzi do stanu niedokrwienia tkanek i narządów oraz pojawienia się powikłań zakrzepowo-zatorowych. Ich konsekwencją mogą być różnego stopnia problemy zdrowotne, a także wydłużenie czasu zdrowienia. Duża dynamika (krótki czas) przebiegu mechanizmów zaburzonej (np. zaktywowanej) hemostazy nierzadko bywa też przyczyną nagłej śmierci organizmu z powodu braku możliwości podjęcia natychmiastowego postępowania terapeutycznego, w szczególności gdy problem dotyczy narządów krytycznych, takich jak mózg (udary), serce (zawały) czy płuca (zatory) (Spronk *et al.* 2003).

Zmieniona reaktywność mechanizmów hemostazy powodowana jest przez różne, wrodzone lub nabyte, zaburzenia strukturalne lub funkcjonalne poszczególnych jej składowych. Mogą one pojawić się w efekcie chorób dotyczących bezpośrednio krwi lub jej tworzenia, ale także w chorobach niehematologicznych, stanach pourazowych i wyniku zabiegów operacyjnych (Antoniak 2018; Blair *et al.* 2009; Gentry 2004; Hoffman *et al.* 2007; Long *et al.* 2016; Pilcher 2008; Riddel *et al.* 2007; Schuliga 2015; van der Poll *et al.* 2014; Wolberg *et al.* 2012). Zaburzenia krzepnięcia i fibrynolizy bywają też obserwowane w stanach nie związanych z chorobą, np. podczas intensywnego wzrostu i dojrzewania organizmu czy ciąży i porodu. Bez względu na przyczynę oraz okoliczności występowania, skutki zmian aktywności hemostazy często stanowią poważny problem zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej.

### **Cele naukowe osiągnięcia**

Jeszcze do niedawna, badanie procesów hemostazy było prawie wyłącznie domeną medycyny człowieka. W efekcie, większość procedur diagnostycznych (a co za tym idzie, dostępność odpowiednich odczynników, kalibracja urządzeń do pomiarów parametrów krzepnięcia czy opracowanie szczegółowych zakresów referencyjnych) dotyczyły mechanizmów krzepnięcia i fibrynolizy zachodzących w krwi ludzkiej. Jednak gwałtowny rozwój nauk weterynaryjnych, w tym hematologii, kardiologii, chirurgii czy nauki o

chorobach wewnętrznych powoduje, że niezbędne staje się również szczegółowe poznanie zjawisk hemostazy zachodzących u poszczególnych gatunków zwierząt. Należy podkreślić, że pomimo bardzo intensywnego, ogólnego rozwoju koagulologii jako nauki medycznej, nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów oraz istotnych parametrów krzepnięcia u zwierząt, a odpowiednie dane literaturowe pozostają skąpe i wrywkowe (Pichler 2008). Mając na uwadze to, jak poważny i szeroki jest wpływ hemostazy na utrzymanie homeostazy ustroju oraz na wystąpienie i przebieg choroby, w trakcie mojej pracy naukowo-badawczej podjęłam się kompleksowych badań nad hemostazą u zwierząt zdrowych i w różnych stanach patologicznych. Badania takie mogą być przydatne w wielu aspektach medycyny weterynaryjnej, np. w doborze dodatkowych, specyficznych i czułych metod badań diagnostycznych czy monitorowaniu przebiegu choroby, a także mogą pozwolić na skrócenie terapii lub rekonwalescencji oraz na ocenę ryzyka potencjalnego zaostrzenia lub powikłania istniejącego stanu patologicznego. Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że różne gatunki zwierząt są wykorzystywane jako model doświadczalny do badań w zakresie medycyny regeneracyjnej i transplantacyjnej oraz chirurgii i kardiologii człowieka, poznanie procesów hemostazy u tych zwierząt jest niezwykle istotne do oceny potencjalnego ryzyka związanego z określonym zabiegiem czy procedurą medyczną (Giraud *et al.* 2011; Foley *et al.* 2014; Ibrahim *et al.* 2006; Martini *et al.* 2001; Pearce *et al.* 2007; Sartoretto *et al.* 2016; Siller-Matula *et al.* 2008; Vodička *et al.* 2005). Dodatkowo, celem prowadzonych przeze mnie badań było opracowanie ustandaryzowanych metod diagnostycznych w zakresie koagulologii weterynaryjnej, przy wykorzystaniu dostępnej aparatury i odczynników stosowanych w medycynie człowieka.

### **Opis prac stanowiących osiągnięcie naukowe**

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe opisują badania, które przeprowadziłam u zwierząt zdrowych i w różnych stanach patologicznych.

Wyniki badań mechanizmów hemostazy u świń zdrowych zostały przedstawione w **publikacji nr 1:**

**Pliszczak-Król A., Rząsa A., Gemra M., Król J., Łuczak G., Zyzak A., Zalewski D., Iwaszko-Simonik A., Graczyk S. Age-related changes of platelet and plasma coagulation parameters in young pigs.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2016; 28(5): 561-567. <https://doi.org/10.1177/1040638716658928>.

(punkty MNiSW: **30**      IF<sub>2016</sub>: **0,925**)

Badania dotyczyły oceny zmian w zakresie hemostazy płytkowej i osoczowej u świń zdrowych w okresie od pierwszych dni po urodzeniu do zakończenia pierwszego roku życia. Głównym powodem wyboru tego gatunku zwierzęcia jako obiektu badań był fakt, że świnię są wykorzystywane jako model doświadczalny w badaniach biomedycznych dla medycyny regeneracyjnej i transplantacyjnej człowieka. Ponadto, celem badań było określenie, czy przy tak dużym stopniu złożoności procesów hemostazy wszystkie jej komponenty uzyskują pełną sprawność w tym samym czasie, oraz w jakim stopniu mechanizmy krzepnięcia uzależnione są od zmian w organizmie zwierząt zachodzących w trakcie wzrostu i



dojrzewania. Świnie cechują się intensywnym wzrostem i przyspieszonym dojrzewaniem, a niektóre rasy osiągają dojrzałość płciową już w 9. - 15. tygodniu życia. W tym czasie masa ich ciała może wzrosnąć kilkadziesiąt (ok. 80) razy, natomiast masa wątroby i śledziony, odpowiednio, nawet 50 i 117 razy (Friedman *et al.* 1994). Tak szybki, asynchroniczny rozwój ciała i narządów wewnętrznych może być przyczyną zaburzeń funkcji fizjologicznych, w tym i hemostazy. Ocena parametrów hemostazy może mieć praktyczne znaczenie w monitorowaniu zdrowia tych zwierząt, a ponadto wartości poszczególnych parametrów mogą być wykorzystane w analizie porównawczej podobnych procesów u innych gatunków zwierząt i u człowieka (Pilcher 2008; Vodička *et al.* 2005).

Badaniami objętych było 50 zdrowych świń (25 knurków i 25 loszek) rasy mieszanej (Wielka Biała Polska × Polska Biała Zwisłoucha), wybranych losowo z 14 różnych miotów, hodowanych w tych samych warunkach fermowych. Krew do badań pobierana była najpierw w 2. dniu życia, a następnie w 3., 4., 5., 6., 8., 10., 18., 20. i 24. tygodniu. Dla oceny hemostazy pierwotnej, we krwi pełnej określone były: ogólna liczba płytek (PLT), średnia objętość płytki (MCV) i odsetek płytek olbrzymich P-LCR). Pomiarów te wykonano przy użyciu analizatora hematologicznego PROCAN PE 6800 (Procan Electronics Inc., Chiny). Dla oceny hemostazy wtórnej, w osoczu pozyskanym z pobranej krwi oznaczony został czas protrombinowy (PT; pozwala ocenić sprawność szlaku zewnątrzpo pochodnego i toru wspólnego krzepnięcia), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT; pozwala ocenić sprawność szlaku wewnątrzpo pochodnego i toru wspólnego krzepnięcia), czas trombinowy (TT; jest on miarą sprawności toru wspólnego krzepnięcia), a także stężenie fibrynogenu. Pomiarów dokonano przy użyciu koagulometru Coag Chrom 3003 (Bio-Ksel, Polska). W celu kalibracji i walidacji pracy obu aparatów oraz aby wyznaczyć zakresy referencyjne badanych parametrów dla świń, takie same oznaczenia wykonano na materiale pozyskanym od 40 dorosłych (w wieku: 12. miesięcy), zdrowych loch, tej samej rasy i utrzymywanych w tych samych warunkach hodowlanych. Oznaczenia wszystkich parametrów w każdej próbce osocza wykonano dwukrotnie, zarówno u prosiąt doświadczalnych jak u świń kontrolnych.

Ogólna liczba płytek (PLT) podlegała istotnym wahaniom przez cały okres trwania doświadczenia (od  $422 \times 10^9/L$  u prosiąt 2-dniowych do  $340 \times 10^9/L$  w 18. tygodniu), osiągając wartość maksymalną  $730 \times 10^9/L$  w 4. tygodniu życia. Starsze prosięta (od 20. tygodnia) miały już PLT na poziomie zbliżonym do tego, jaki występuje u osobników dojrzałych ( $400 - 450 \times 10^9/L$ ). Różnicom PLT pomiędzy grupami wiekowymi towarzyszyła indywidualna zmienność tego parametru u poszczególnych prosiąt w każdej grupie doświadczalnej. MPV w tym czasie nie ulegała znaczącym zmianom i mieściła się w zakresie 8,4 - 9,8 fL. Obserwowano natomiast wahania dotyczące P-LCR - spadek z 19,5% u prosiąt 2-dniowych do 12,7% u prosiąt 4-tygodniowych, a następnie wartości zmieniające się w sposób odwrotnie proporcjonalny do PLT w kolejnych okresach.

Spośród badanych parametrów krzepnięcia osoczewego, jedynie PT cechował się wyraźną stabilnością (początkowo wynosił 16,3 sek., jednak od 3. tygodnia uległ skróceniu i we wszystkich grupach wiekowych mieścił się już w zakresie 12,2 - 15,3 sek.). Z kolei aPTT i TT wykazywały dużo większą zmienność. Przez pierwsze 5 tygodni życia prosiąt aPTT był dość krótki (17,8 - 19,9 sek.), następnie zaczął się wydłużać do maksymalnej

wartości (52,5 sek.) w 20. tygodniu, a później ponownie skracać, osiągając 34,2 sek. u świń w wieku 1 roku. Zmienność wartości (16,7 - 24,5 sek.) w poszczególnych przedziałach wiekowych wykazywał także czas trombinowy (TT). Należy podkreślić, że różnice wartości mierzonych czasów notowano nie tylko w odniesieniu do wieku zwierząt, ale także obserwowano je w poszczególnych grupach doświadczalnych pomiędzy samicami i samcami. Parametrem, który również podlegał istotnym wahaniom u badanych świń, był fibrynogen. Jego stężenie w osoczu, początkowo bardzo niskie (1,9 g/L u prosiąt 2-dniowych), rosło w miarę dorastania zwierząt (do 3,7 - 6,1 g/L).

Opisane powyżej w sposób kompleksowy zmiany dotyczące parametrów hemostazy płytkowej i osoczowej u świń w trakcie rozwoju osobniczego nie miały jak dotąd odzwierciedlenia w dostępnym piśmiennictwie. Ponieważ wcześniejsze dane literaturowe przedstawiały wyniki pomiarów tylko niektórych parametrów hemostazy u świń, a często też dotyczyły one zwierząt w tylko jednej, określonej kategorii wiekowej, trudno było na ich podstawie przeprowadzić dokładniejszą analizę dojrzewania procesów krzepnięcia u tego gatunku. Przykładowo, żadne z dostępnych doniesień, dotyczących zarówno świń ras dużych jak i świń miniaturowych, nie stwierdzało tak wysokich wartości aPTT (52,5 sek.), jakie obserwowano w badaniach własnych u prosiąt 10. tygodniowych. Fakt ten może mieć jednak duże znaczenie praktyczne, zważywszy że wartości aPTT u świń między 10. a 24. tygodniem życia są podobne do wartości tego czasu mierzonych u niemowląt. Analiza uzyskanych wyników badań własnych wykazała, iż parametry hemostazy płytkowej stabilizowały się już w pierwszych tygodniach życia prosiąt, osiągając szybko (do 6. tygodnia) wartości zbliżone do wartości referencyjnych dla świń dojrzałych. Czas ten był znacznie krótszy niż czas stabilizacji parametrów hemostazy osoczowej (8 tygodni dla PT czy 10-18 tygodni dla aPTT). Wskazuje to na różny czas dojrzewania poszczególnych mechanizmów (składowych) hemostazy, co jest zapewne determinowane przez różne tempo rozwoju tkanek i organów, np. szpiku kostnego (jako miejsca powstawania i dojrzewania płytek krwi) czy wątroby (miejsca wytwarzania białek biorących udział w krzepnięciu).

Wyniki badań mechanizmów hemostazy u koni wykazujących objawy choroby obturacyjnej płuc oraz u koni zdrowych zostały ujęte w **publikacji nr 2**:

**Pliszcak-Król A., Gemra M., Kozdrowski R., Zalewski D., Iwaszko A. Involvement of hemostasis in pathophysiology of RAO in horses.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2020; 230. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110128>.  
(punkty MEiN: **70** IF<sub>2020</sub>: **2,046**)

Astma (nawracająca choroba obturacyjna płuc-RAO) jest chorobą koni o podłożu alergicznym, która pojawia się wskutek długotrwałej ekspozycji na alergeny wziewne (obecne w sianie, słomie i kurzu) (Bullone *et al.* 2014; Leclere *at al.* 2011). Jej istotą jest proces zapalny, w wyniku którego dochodzi do przewlekłego skurczu i obturacji dróg oddechowych oraz nadprodukcji śluzu. Objawami choroby są świszczący oddech, kaszel oraz wysiłek oddechowy podczas ruchu. Ponieważ wyeliminowanie alergenów z otoczenia zwierzęcia jest niezmiernie trudne, choroba często ma charakter przewlekły i prowadzi do

nieodwracalnej przebudowy ścian dróg oddechowych, pogrubienia błony podstawnej, przerostu mięśni gładkich i gruczołów śluzowych oraz angiogenezy. W efekcie, trudności w oddychaniu ulegają nasileniu. Mechanizmy hemostazy, które w warunkach fizjologicznych biorą udział w ochronie i ewentualnej naprawie nabłonka oraz głębszych warstw ścian dróg oddechowych, ulegają aktywacji oraz dodatkowo zaostrzają i komplikują opisany proces patologiczny. Aktywne krzepnięcie oraz upośledzona fibrynoliza nasilają proces zapalny, a ten pogłębia uszkodzenie i dysfunkcję płuc. Obecność trombiny i fibryny w wydzielinie oskrzelowej przyczynia się do wysięku osocza i wzmożenia produkcji śluzu, w następstwie czego dochodzi do obrzęku ścian dróg oddechowych i ograniczenia przepływu powietrza. RAO u koni często jest porównywane z astmą u ludzi (Bullone *et al.* 2014; Leclere *at al.* 2011). Podejrzewa się, że patogenezą tych chorób (w tym rola mechanizmów hemostazy) u obu gatunków mogą być podobne. Ponieważ nie napotkałam żadnych danych literaturowych dotyczących hemostazy u koni z aktywną postacią RAO, podjęłam badania, których celem była ocena zaangażowania mechanizmów krzepnięcia i fibrynolizy w przebiegu tej jednostki chorobowej.

Badania przeprowadzono u 20 koni rasy mieszanej o masie ciała  $550 \pm 50$  kg, w wieku 5 - 15 lat, które zostały podzielone na dwie grupy (R i C) po 10 osobników w każdej. Grupę R stanowiły konie z aktywną postacią RAO. Do grupy C należały konie zdrowe. Przynależność koni do grupy weryfikowana była na podstawie wywiadu i wyników badań klinicznych, gazometrycznych krwi, hematologicznych, biochemicznych osocza oraz endoskopii dróg oddechowych i cytologii płynu oskrzelowo-pęcherzykowego (bronchoalveolar lavage fluid, BALF). W celu zaostrzenia RAO, przed rozpoczęciem badań zwierzęta trzymane były przez 48 godzin w niedostatecznie wietrzonych stajniach, gdzie znajdowały się słoma i siano z widocznym porostem pleśni. Przez taki sam czas, w stajniach o podobnych warunkach przetrzymywane były również konie grupy C. Osocze pozyskane z krwi pobieranej od wszystkich zwierząt doświadczalnych stanowiło materiał do badania następujących parametrów: czasu protrombinowego (PT), częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT) oraz trombinowego (TT), stężenia fibrynogenu (Fb) oraz D-dimerów, a także aktywności aktywatorów (czynniki II-XII) oraz inhibitorów krzepnięcia (antytrombina-AT i białko C). Pomiarów dokonywano przy pomocy koagulometru Coag Chrom 4000 (Bio-Ksel, Polska). Aby wykonać kalibrację i walidację pracy aparatu oraz wyznaczyć zakresy referencyjne badanych parametrów dla koni, podobne oznaczenia wykonano również w przypadku osocza pozyskanego z krwi dodatkowej grupy 80 zdrowych osobników tego gatunku, obu płci, w tym samym przedziale wiekowym i o podobnej masie ciała, które nie były narażone na działanie alergenów. Grupa tych koni stanowiła także grupę kontrolną dla opisanego w publikacji eksperymentu. Wszystkie parametry w każdej badanej próbce oznaczane były dwukrotnie.

U koni obu grup (R i C) eksponowanych na alergeny nie stwierdzono zmian w zakresie czasów PT i TT. W efekcie ekspozycji wydłużył się tylko aPTT - u koni zdrowych o 8 sek. (choć pozostał w zakresie referencyjnym), u koni z RAO aż o 40,4 sek. Różnica między końmi zdrowymi, zarówno eksponowanymi jak i nieeksponowanymi na alergeny, a końmi z RAO była statystycznie istotna przy  $p < 0,05$ . U koni eksponowanych zdrowych i koni z RAO wzrosły też stężenia fibrynogenu (odpowiednio do: 4,1 i 5 g/L) i D-dimerów

(odpowiednio do: 259,1 i 226,9  $\mu\text{g/L}$ ) w porównaniu do koni zdrowych nie poddanych ekspozycji, u których stężenie Fb wynosiło 3,4 g/L a D-dimerów 141,2  $\mu\text{g/L}$ . Kontakt z alergenami wpłynął w sposób zróżnicowany na aktywność czynników (aktywatorów) krzepnięcia. Czynniki II, VIII i X wykazywały wzrost aktywności w obu grupach doświadczalnych (R i C) na podobnych poziomach. Wzrost ten, w porównaniu do grupy koni zdrowych nieekspozowanych, był statystycznie istotny (przy  $p < 0,05$ ). Nieznacznie obniżoną aktywność wykazywały z kolei czynniki VII i XII. Bardzo niską aktywność czynników IX i XI obserwowano w osoczu koni zdrowych, narażonych na oddziaływanie alergenów, w porównaniu do koni zdrowych nieekspozowanych - różnica ta była statystycznie istotna. U koni z RAO aktywność czynnika IX pozostała niezmienną, zaś czynnika XI znacznie się nasiliła. U żadnego z badanych koni nie stwierdzono zmian aktywności czynnika V. Aktywność AT u koni z zastrzoną postacią RAO była obniżona i wynosiła 84,7%. W porównaniu do obu grup koni zdrowych (zarówno narażonych na działanie alergenu, jak i nieekspozowanych), u których AT kształtowała się na jednakowym poziomie (99,2%), różnica ta była statystycznie istotna ( $p < 0,05$ ). Kontakt z alergenami spowodował u koni nasilenie aktywności białka C do poziomu 126% w grupie C i 133% w grupie R. Oba te wyniki, choć nie przekroczyły zakresu referencyjnego dla wspomnianego parametru, to jednak statystycznie różniły się ( $p < 0,05$ ) od wartości aktywności białka C (101,9 %) mierzonej u koni zdrowych nieekspozowanych.

Znaczne wydłużenie aPTT u koni z RAO przy niezmiennych PT i TT wskazuje na możliwość zaburzeń w fazie amplifikacji krzepnięcia u tych zwierząt. Normalnie w tej fazie procesu niewielkie ilości wytworzonej wcześniej trombiny powodują nasilenie aktywacji płytek krwi oraz czynników VIII, IX, XI i XII, co znacznie wzmacnia i przyspiesza proces krzepnięcia. Jest to również etap, w którym procesy hemostatyczne ściślej współpracują z mechanizmami reakcji zapalnej. Znaczne wydłużenie fazy wzmocnienia po ekspozycji na aeroalergeny może sugerować spowolnienie krzepnięcia u koni z RAO. Zwierzęta te nie wykazywały jednak zwiększonej skłonności do krwawień ani wybroczynowości. Przeciwnie, wzrost poziomu D-dimerów sugeruje, że ekspozycja na alergeny mogła wręcz aktywować proces krzepnięcia. Co ciekawe, opisane zmiany parametrów krzepnięcia u koni z RAO były dość podobne do tych opisywanych u koni wykazujących silne objawy kolkowe, u których, wg niektórych autorów, zaburzenia hemostazy spełniają kryteria rozlanego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC). U koni z RAO badanych w niniejszej pracy, zmiany dotyczące krwi i układu krzepnięcia (trombocytopenia, wydłużenie aPTT, obniżenie aktywności AT, wzrost stężenia D-dimerów) również mogłyby świadczyć o inicjacji procesu przypominającego, w pewnym stopniu, DIC. Jednak nieobecność innych, typowych dla DIC, zmian parametrów hemostazy (np. brak wydłużenia PT, brak spadku stężenia fibrynogenu), a także niewystępowanie odpowiednich objawów klinicznych, sugerują, że opisywane zmiany parametrów hemostazy u koni z RAO odpowiadają raczej silnej reakcji zapalnej.

W **publikacji nr 3** opisałam wyniki badań parametrów hemostazy u owiec zdrowych, u których doszło do uszkodzenia tkanek w wyniku zabiegu chirurgicznego i wprowadzenia implantu.

**Pliszczak-Król A., Kiełbowicz Z., Król J., Antończyk A., Gemra M., Skrzypczak P., Prządka P., Zalewski D., Bieżyński J., Nicpoń J. Parameters of hemostasis in sheep implanted with composite scaffold settled by stimulated mesenchymal stem cells - evaluation of the animal model. Materials 2021; 14(22), 6934. <https://doi.org/10.3390/ma14226934>.**

(punkty MEiN: 140 IF<sub>2021</sub>: 3,623)

Zmiany degeneracyjno-martwicze i ubytki tkanek oraz towarzyszące im zniszczenie naczyń krwionośnych i nerwów stanowią ogromne wyzwanie dla medycyny regeneracyjnej i transplantacyjnej człowieka (Gaihre *et al.* 2017). Problemem są nie tylko martwica tkanek, toksyczne produkty rozpadu komórek oraz wtórne infekcje, ale również dyskomfort natury fizycznej (związany z utrudnieniami w wykonywaniu określonych funkcji) oraz psychicznej (wynikający z negatywnych wrażeń estetycznych). Jedną z metod terapii, zyskującą coraz większe uznanie, jest implantacja substytutów biologicznych - syntetycznych skafoldów. Materiały te mają strukturę mikroporowatą, a zasiedlone dodatkowo komórkami macierzystymi, czynnikami wzrostu, lekami lub genami, nie tylko wypełniają ubytki tkanek, ale także wspomagają procesy ich regeneracji i naprawy (Thrivikraman *et al.* 2017; Tollemar *et al.* 2015). Implantacja skafoldu jest jednak zabiegiem inwazyjnym - do organizmu pacjenta wprowadzone zostają np. stymulowane komórki czy substancje biomodulujące, które nie tylko naruszają integralność ustroju, ale także mogą zmieniać interakcje między komórkami gospodarza i mechanizmami biologicznymi (w tym też relacje między poszczególnymi komponentami hemostazy). Większość dotychczasowych badań dotyczących wpływu skafoldów na mechanizmy krzepnięcia i fibrylizy odnosi się do hemostazy miejscowej, niewiele natomiast wiadomo na temat zjawisk w zakresie hemostazy ogólnoustrojowej. Dlatego też, celem kolejnego doświadczenia (przeprowadzonego we współpracy z Katedrą i Kliniką Chirurgii UP we Wrocławiu) była ocena parametrów hemostazy osoczowej i fibrylizy u owiec po jednostronnej implantacji skafoldu kompozytowego [ceramiczno-poly-(ε-caprolaktonowego)], zasiedlonego komórkami mezenchymalnymi szpiku kostnego (BM-MSC), stymulowanymi czynnikiem wzrostu fibroblastów 2 (FGF-2) i białkiem morfogenetycznym kości 2 (BMP-2).

Do doświadczenia użyto 9 owiec rasy Merynos, u których wykonano zabieg chirurgicznej implantacji skafoldu do trzonu kości żuchwy. Materiał do badań stanowiło osocze pozyskane z krwi pobranej od zwierząt bezpośrednio przed zabiegiem (T0) oraz 1 godz. (T1), 24 godz. (T2), 3 dni (T3) i 7 dni (T4) po zabiegu. Mierzone były następujące parametry: czas protrombinowy (PT), czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT); stężenia fibrynogenu (Fb) oraz D-dimerów (produktów fibrynolitycznej degradacji fibryny); aktywność aktywatorów (czynników II-XII) oraz inhibitorów krzepnięcia (antytrombiny [AT] i białka C). Pomiarów dokonywano przy użyciu koagulometru Coag Chrom 4000 (Bio-Ksel, Polska). Urządzenie to zostało wcześniej skalibrowane i zwalidowane do pracy z osoczem owiec. Ponadto, określone zostały zakresy referencyjne badanych parametrów poprzez wykonanie tych samych oznaczeń w osoczu pozyskanym od osobnej grupy 21 zdrowych owiec tej samej rasy, w podobnym wieku i o zbliżonej masie ciała. Owce te

stanowiły też grupę kontrolną dla doświadczenia. Wszystkie parametry u zwierząt doświadczalnych i kontrolnych mierzone były dwukrotnie.

Implantacja skafoldu powodowała nieznaczne wydłużenie czasów PT i aPTT - zmiany pojawiły się już w 1 godz. po zabiegu i utrzymywały się przez cały okres obserwacji. Wydłużenie PT, choć nie przekraczało 1 sek. w T1, było statystycznie różne ( $p < 0,05$ ) w porównaniu z PT przed implantacją (T0). Najdłuższy PT (14,8 sek.) mierzony był 24 godz. po zabiegu (T2), a różnica względem T0 wynosiła 2,4 sek. - była istotna przy  $p < 0,01$ . W kolejnych dniach (T3 i T4) PT był krótszy niż w T2, choć pozostawał dłuższy niż w T0. Podobną tendencję zmian obserwowałam w odniesieniu do aPTT. Najdłuższy aPTT stwierdzony był w T2 (33,9 sek.) i przewyższał on wartość zmierzoną w T0 (26,5 sek.) o 7,4 sek. (różnica statystyczna przy  $p < 0,01$ ). W T3 i T4 wartości aPTT, chociaż nadal pozostawały dłuższe niż przed operacją, powróciły do zakresu referencyjnego. Aktywność większości czynników (tj. II, VII, VIII, IX, X i XII) uległa zmniejszeniu w okresie bezpośrednio po zabiegu (T1 i T2). Natomiast aktywność czynnika XI wzrosła w T1, a następnie w T2 obniżyła się i zbliżyła do wartości mierzonej przed implantacją. W kolejnych dniach (T3 i T4) wszystkie badane czynniki zwiększyły swoją aktywność, a różnice były statystycznie istotne dla czynnika IX (w T3,  $p < 0,05$ ) i dla XI (w T3,  $p < 0,01$ ). Porównując do czasu T0, aktywności czynników mierzone w T3 i T4 wykazywały znaczną zmienność. Podobnie, aktywność antytrombiny w okresie pooperacyjnym była obniżona, a do wartości sprzed operacji powróciła dopiero w 7. dniu (T4). Z kolei aktywność białka C obniżyła się nieco później (dopiero 24 godz. po implantacji) i na krótko, a od 3. dnia już stale rosła, przekraczając w tym czasie poziom T0. Pod koniec doświadczenia (T4) jego aktywność pozostawała nasiloną, choć nadal mieściła się w zakresie referencyjnym - była statystycznie różna od aktywności w T0 przy  $p < 0,01$ . Stężenie fibrynogenu w osoczu owiec bezpośrednio po zabiegu (T1) było obniżone, a następnie stopniowo wzrastało osiągając najwyższą wartość w 7. dobie (T4, 8,4 g/L). Wyniki mierzone w T3 i T4 różniły się statystycznie ( $p < 0,01$ ) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w T0 (2,7 g/L). Natomiast stężenie D-dimerów praktycznie nie zmieniało się przez cały czas doświadczenia.

Pierwsze zmiany wartości badanych parametrów hemostazy jakie zaobserwowałam u owiec operowanych pojawiły się już w 1 godz. po zabiegu (T1). Wydłużenie czasów krzepnięcia (PT i aPTT), obniżenie aktywności prawie wszystkich czynników krzepnięcia (z wyjątkiem XI) i AT, a także stężenia fibrynogenu, świadczyły o spowolnieniu mechanizmów hemostazy. Jednak z uwagi na krótki czas pomiędzy kolejnymi pomiarami tych parametrów (odstęp pomiędzy T0 a T1 wynosił ok. 3 godz.), zmiany te wynikały raczej z wyczerpania i utraty tych białek podczas kontrolowanego krwawienia śródoperacyjnego. Pierwsza doba po implantacji (T2) była momentem przełomowym; dalszemu pogłębieniu się spowolnienia krzepnięcia zaczęły przeciwdziałać procesy związane z uaktywnieniem krążących w osoczu nieaktywnych aktywatorów hemostazy oraz uwolnieniem podobnych czynników z aktywnych płytek krwi - nastąpił wzrost aktywności czynników II, V, X oraz AT, a także wzrost stężenia fibrynogenu. Obniżenie aktywności białka C (negatywne białko ostrej fazy) oraz leukocytoza wskazywały na równoległe rozwijający się proces zapalny. Kompensacja ta miała łagodny charakter - nie nastąpiła jeszcze pełna aktywacja fazy wzmocnienia (szlaku wewnątrzpochodnego krzepnięcia, o czym świadczyła niska

aktywność czynników VIII-XII), ani też fibrynolizy (zmiany stężenia D-dimerów były niewielkie). Nie było też dalszej znaczącej aktywacji ze strony układu zewnątrzpochodnego (brak aktywacji czynnika VII) - nie pogłębiało się uszkodzenie tkanek. W kolejnych dniach (T3 i T4) proces wyrównywania spowolnienia krzepnięcia był jeszcze wyraźniejszy - skróceniu uległy PT i aPTT, nasiliła się (choć w różnym stopniu i w różnym czasie) aktywność wszystkich badanych modulatorów hemostazy (czynników II-XII, AT i białka C) oraz wzrosło stężenie fibrynogenu. Połączenie mechanizmów hemostazy i stanu zapalnego w pełni zaktywowało fazę amplifikacji, co spowodowało wzmocnienie i przyspieszenie krzepnięcia. Obserwowana tendencja narastania aktywności aktywatorów i inhibitorów krzepnięcia oraz stężenia fibrynogenu utrzymywała się do czasu zakończenia doświadczenia. Jednak dynamika obserwowanych wzrostów była słabsza. Prawdopodobnie wiązało się to ze spowolnieniem zapalenia (u owiec obniżyła się też liczba leukocytów we krwi), osłabieniem stymulacji syntezy białek uczestniczących w krzepnięciu oraz ich zużywaniem. Analizując zmieniające się wartości mierzonych parametrów w kolejnych okresach czasu zaobserwowałam, że istniało przesunięcie czasowe pomiędzy zmianami aktywności czynników regulujących procesy hemostazy, a momentem ujawnienia się odpowiednich efektów. Efekt rozkojarzenia w czasie widoczny był też w odniesieniu do skutków współdziałania hemostazy i zapalenia. Ponieważ średnie wartości większości parametrów mierzonych w poszczególnych okresach czasu po implantacji pozostawały w odpowiednich zakresach referencyjnych, a wartości tylko nielicznych przekraczały górną ich granicę i tylko na krótki czas, świadczy to, że przeprowadzony zabieg nie miał negatywnego wpływu na skuteczność i zdolność kontrolowania procesu hemostazy u owiec. Implantacja skafoldu kompozytowego, zasiedlonego komórkami mezenchymalnymi, stymulowanymi BMP-2 i FGF-2, jak również zastosowana technika operacyjna wydają się być bezpieczne i nie wiążą się z wystąpieniem ryzyka zakrzepowo-zatorowego albo krwotoczności u owiec doświadczalnych.

### **Wnioski**

1. Do oceny parametrów hemostazy u zwierząt z powodzeniem mogą być wykorzystywane odczynniki stosowane w koagulologii człowieka.
2. Przeprowadzenie badań parametrów hemostazy u zwierząt z wykorzystaniem odczynników przeznaczonych dla człowieka wymaga wcześniejszej kalibracji i walidacji aparatury pomiarowej oraz wyznaczenia zakresów referencyjnych dla poszczególnych gatunków z użyciem wysokich liczebnie puli próbek osocza.
3. Wartości parametrów hemostazy u poszczególnych gatunków zwierząt różnią się; wśród badanych, np. aPTT najkrótszy jest u owiec, a najdłuższy u koni, aktywność białka C jest zdecydowanie niższa u owiec w porównaniu do koni.  
Na wartości parametrów ma wpływ także wiek, płeć i status zdrowotny zwierząt.  
Fakty te należy brać pod uwagę przy doborze grup zwierząt doświadczalnych do badań porównawczych, np. różnych gatunków zwierząt czy zwierzęta – człowiek.

4. Czas osiągnięcia pełnej sprawności (dojrzewania) poszczególnych składowych hemostazy może być zróżnicowany, np. u świń czas stabilizacji parametrów służących do monitorowania sprawności mechanizmów krzepnięcia osocznego (PT i aPTT) był dłuższy niż czas stabilizacji parametrów hemostazy pierwotnej (płytkowej).
5. Znaczącym zmianom parametrów hemostazy nie zawsze towarzyszą odpowiednie objawy kliniczne, np. u koni ze znacznie wydłużonym aPTT nie występowała skłonność do krwawień czy wybroczynowości.
6. Zmiany parametrów określających mechanizmy hemostazy cechują się dużą dynamiką – mogą pojawiać się i zanikać w stosunkowo krótkim czasie .

### Literatura

- Antoniak S. The coagulation system in host defense. *Res Pract Thromb Haemost.*, 2018; 2: 549-557. Doi: [10.1002/rth2.12109](https://doi.org/10.1002/rth2.12109).
- Blair P., Flaumenhaft R. Platelet  $\alpha$ -granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.*, 2009; 23: 177-189. Doi: [10.1016/j.blre.2009.04.001](https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001).
- Bullone, M., Lavoie, J.P. Asthma “of horses and men” – how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences? *Mol. Immunol.* 2015; 66: 97–105. Doi: [10.1016/j.molimm.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.005).
- Chapin J.C., Hajjar K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.*, 2015; 29(1): 17-24. Doi: [10.1016/j.blre.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003).
- de Witt S.M., Verdoold R., Cosemans J.M.E.M., Heemskerk J.W.M. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thromb Res.*, 2014; 133 S2: S139-S148. Doi: [10.1016/S0049-3848\(14\)50024-2](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50024-2).
- Foley J.H., Conway E.M. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. *Circ Res.*, 2016, 118: 1392-1408. Doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.306853](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306853).
- Friedman L, Gaines D.W., Newell R.F., Sager A.O., Matthews R.N., Braunberg R.C. Body and organ growth of the developing Hormel-Hanford strain of male miniature swine. *Lab Anim.*, 1994; 28: 376–379. Doi: [10.1155/2011/532127](https://doi.org/10.1155/2011/532127).
- Gaihre, B.; Uswatta, S.; Jayasuriya, A.C. Reconstruction of craniomaxillofacial bone defects using tissue-engineering strategies with injectable and non-injectable scaffolds. *J Funct Biomater.*, 2017; 8, 49. Doi: [10.3390/jfb8040049](https://doi.org/10.3390/jfb8040049).
- Gentry P.A. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J.*, 2004; 168: 238-251. Doi: [10.1016/j.tvjl.2003.09.013](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.013).
- Giraud S, Favreau F., Chatauret N., Thuillier R., Maiga S., Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol.*, 2011; 53: 21–27. Doi: [10.1155/2011/532127](https://doi.org/10.1155/2011/532127).



- Hoffman M., Monroe D.M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am.*, 2007; 21: 1-11. Doi: [10.1016/j.hoc.2006.11.004](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2006.11.004).
- Hoover-Plow J. Does plasmin have anticoagulant activity ? *Vasc Health Risk Manag.*, 2010; 6: 199-205. Doi: [10.2147/vhrm.s9358](https://doi.org/10.2147/vhrm.s9358).
- Iba T., Levy J.H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. *J Thromb Haemost.*, 2018; 16: 231-241. Doi: [10.1111/jth.13911](https://doi.org/10.1111/jth.13911).
- Ibrahim Z, Busch J., Awwad M., Wagner R., Wells K., Cooper D.K.C. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*, 2006; 13: 488–499. Doi: [10.1111/j.1399-3089.2006.00346.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2006.00346.x).
- Laurens N., Koolwijk P., De Matt M.P.M. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.*, 2006; 4: 932-939. Doi: [10.1111/j.1538-7836.2006.01861.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01861.x).
- Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Lavoie, J.P. Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology*, 2011; 16: 1027–1046. Doi: [10.1111/j.1440-1843.2011.02033.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2011.02033.x).
- Long A.T., Kenne E., Jung R., Fuchs T.A., Renne T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost.*, 2016; 14: 527-437. Doi: [10.1111/jth.13235](https://doi.org/10.1111/jth.13235).
- Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2007, 27: 1686-1693. Doi: [10.1161/ATVBAHA.107.141911](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.141911).
- Martini L., Fini M., Giavaresi G., Giardino R. Sheep model in orthopedic research: A literature review. *Comp. Med.* 2001; 51: 292–299. PMID: 11924786.
- Monroe D.M., Hoffman M. The clotting system – a major player in wound healing. *Haemophilia*, 2012; 18 (Suppl. 5): 11-16. Doi: [10.1111/j.1365-2516.2012.02889.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02889.x).
- Opneja A., Kapoor S., Stavrou E.X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb Res.*, 2019; 179: 56-63. Doi: [10.1016/j.thromres.2019.05.001](https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.001).
- Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E., Pearce S.G. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review. *Eur Cells Mater.* 2007; 13: 1–10. Doi: [10.22203/ecm.v013a01](https://doi.org/10.22203/ecm.v013a01).
- Pichler L. Parameters of coagulation and fibrinolysis in different animal species – a literature based comparison. *Vet Med Austria/Wien. Tierärztl. Maschr.*, 2008; 95, 282-295.
- Riddel J.P., Aouizerat B.E., Miaskowski Ch., Lillicrap D.P. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.*, 2007; 24(3): 123-131. Doi: [10.1177/1043454206298693](https://doi.org/10.1177/1043454206298693).
- Rijken D.C., Lijnen H.R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *J Thromb Haemost.*, 2009; 7: 4-13. Doi: [10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03220.x).
- Sartoretto S.C., Uzeda M.J., Miquel F.B., Nascimento J.R. Sheep as an experimental model for biomaterial implant evaluation. *Acta Ortop. Bras.* 2016; 24: 262–266.

Doi: [10.1590/1413-785220162405161949](https://doi.org/10.1590/1413-785220162405161949).

Schuliga M. The inflammatory actions of coagulant and fibrinolytic proteases in disease. *Mediators of Inflammation*, 2015; ID 437695. Doi: [10.1155/2015/437695](https://doi.org/10.1155/2015/437695).

Siller-Matulla J., Plasenzotti R., Spiel A., Quehenberger P., Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost.*, 2008; 100: 397-404. Doi: [10.1160/TH08-02-0103](https://doi.org/10.1160/TH08-02-0103).

Spronk H.M.H., Govers-Riemslog J.W.P, ten Cate H. The blood coagulation system as a molecular machine. *BioEssays*, 2003; 25: 1220-1228. Doi: [10.1002/bies.10360](https://doi.org/10.1002/bies.10360).

Thrivikraman G., Athirasala A., Twohig C., Boda S.K., Bertassoni L.E. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent. Clin. N. Am.*, 2017; 61: 835–856. Doi: [10.1016/j.cden.2017.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.003).

Tollemar V., Collier Z.J., Mohammed M.K., Lee M.J., Ameer G.A., Reid R.R. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis.*, 2016; 3: 56–71. Doi: [10.1016/j.gendis.2015.09.004](https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.09.004).

van der Poll T., Herwald H. The coagulation system and its function in early immune defense. *Thromb Haemost.*, 2014; 112(4): 640-648. Doi: [10.1160/TH14-01-0053](https://doi.org/10.1160/TH14-01-0053).

Vodička P., Smetana K., Dvořánková B., Emerick T., Xu Y.Z., Ourednik J., Ourednik V., Motlík J. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005; 1049: 161–171. Doi: [10.1196/annals.1334.015](https://doi.org/10.1196/annals.1334.015).

Wolberg A.S., Aleman M.M., Leiderman K., Machlus K.R. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg.*, 2012; 114(2): 275-285. Doi: [10.1213/ANE.0b013e31823a088c](https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31823a088c).

## POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO - BADAWCZE

Zadania badawcze, które już zrealizowałam lub obecnie realizuję, przyporządkowane są profilom tematycznym moich bezpośrednich oraz dodatkowych zainteresowań badawczych, jak i tym, które wynikały z podjętej współpracy z osobami pracującymi w innych jednostkach badawczo-dydaktycznych.

### I. Radialna segmentacja jąder (RS) limfocytów krwi u ptaków

Radialna segmentacja (RS) to zjawisko występowania głębokich szczelin w jądrze limfocytów krwi. Dzielą one jądro na kilka płatów, co upodabnia je np. do ósemki lub liścia koniczyny. Powstanie ich powodowane jest depolimeryzacją mikrotubuli opasujących jądro, wychodzących z rejonu centrosomu na jednym biegunie, a schodzących się w podobnym miejscu na drugim biegunie komórki. Mikrotubule, wraz z włóknami pośrednimi i mikrowłóknami, tworzą cytoszkielet komórkowy. Cytoszkielet nadaje komórkom odpowiedni kształt, umożliwia im adhezję do podłoża i utworzenie odpowiedniej

powierzchni kontaktu z otoczeniem czy komórką docelową, przewodzi informacje z błony komórkowej do wnętrza (transdukcja sygnału) oraz indukowaną odpowiedź biochemiczną, zapewnia kompartmentację procesów metabolicznych. Podczas „ukierunkowania się” limfocytów Tc w stronę antygeny, w ich cytoplazmie przemieszczają się również w tę stronę organella komórkowe (wzdłuż mikrotubul); np. cysterny aparatu Golgiego transportują substancje lityczne (perforyny, proteazy serynowe), a także limfokiny oraz TNF, które następnie zostaną uwolnione na zewnątrz. Mikrotubule, poprzez wpływ na organizację cytoszkieletu (ciągłe zmiany długości - polimeryzacja/depolimeryzacja), w znaczący sposób determinują reaktywność limfocytów. RS przyjęto uważać za morfologiczny wyraz powyższych zmian. Podejrzewa się też, że może być ona wyrazem zaburzonego, niepełnego podziału komórki. Ponadto, ze względu na występowanie RS w limfocytach i monocytach krwi u ludzi z nowotworami układu krwiotwórczego, mononukleozą zakaźną lub cukrzycą, a także w komórkach zainfekowanych wirusami lub napromieniowanych, istnieją podejrzenia, iż RS mogłaby być wstępem do transformacji nowotworowej lub zaprogramowanej śmierci komórki.

Zjawisko radialnej segmentacji jąder limfocytów, pomimo poświęcenia mu wiele uwagi, nie zostało ostatecznie poznane, a badania nad nią były prowadzone wyłącznie z wykorzystaniem krwi ludzkiej.

W momencie interesowania się tym zjawiskiem, nie napotkałam żadnych danych mówiących o RS u zwierząt. Jako pierwsza w Polsce podjęłam badania w tym kierunku. Publikacja **I.1.** opisuje wyniki badań wstępnych dotyczących występowania RS u kur. W celu sprawdzenia czy zjawisko to występuje w podobnych warunkach *in vitro* jak u ludzi, krew ptaków inkubowałam przez 6 godz. w temperaturach 22 i 37 °C, z dodatkiem określonych objętości (0,25 ml, 0,3 ml, 0,35 ml i 0,4 ml) różnych antykoagulantów: 1) 1,32% roztwór szczawianu sodu, 2) mieszanina 0,98% szczawianu sodu i 0,85% szczawianu amonu, 3) mieszanina 0,57% szczawianu potasu i 0,85% szczawianu amonu. Najwyższy odsetek limfocytów z jądrem segmentowanym obserwowałam po inkubacji krwi kur w temp. 22 °C z dodatkiem 0,2 ml mieszaniny nr 3. Zebrane wyniki pozwoliły mi ustalić, że RS występuje również u ptaków; pojawia się spontanicznie, ale także może być indukowana chemicznie. W publikacji **I.2.** przedstawiłam wyniki badań, podczas których oceniałam m.in. RS indukowaną szczawianami w zestawieniu z aktywnością lizosomalnej fosfatazy kwaśnej (Fk, aktywność tego enzymu pośrednio odzwierciedla stan czynnościowy limfocytów) u kurcząt, których reaktywność układu limfatycznego modulowałam podaniem hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i/lub antygeny T-zależnego (5% zawiesiny erytrocytów owcy, SRBC). Podanie obu tych czynników miało symulować napór czynników środowiska zewnętrznego: stres i stymulację układu immunologicznego. Najwyższy odsetek limfocytów z jądrem segmentowanym obserwowałam u kurcząt po podaniu wyłącznie ACTH, najniższy natomiast po podaniu SRBC. Aktywność Fk wykazywała odwrotną tendencję zmian - najwyższa była u kurcząt stymulowanych SRBC, najniższa zaś po podaniu ACTH. Zniesienie efektu przeciwstawnych zmian zauważyłam u kurcząt, którym podałam oba czynniki razem – % limfocytów z RS i aktywność Fk miały wartości pośrednie, co było prawdopodobnie wypadkową jednoczesnego oddziaływania hormonu i antygeny. Publikacja **I.3.** ujmuje wyniki badań będących kontynuacją moich zainteresowań dotyczących

zdolności limfocytów do tworzenia indukowanej RS w powiązaniu z aktywnością fosfatazy kwaśnej u kurcząt. W tym doświadczeniu czynność układu limfatycznego ptaków została zmieniona przez operacyjne usunięcie narządów limfatycznych (grasicy, torby Fabrycjusza, śledziony) i/lub stymulację antygenami: T-zależnym (SRBC) lub T-niezależnym (lipopolisacharyd [LPS] ściany komórkowej bakterii *Escherichia coli*). U wszystkich ptaków, z wyjątkiem kurcząt splenektomowanych, brak oddziaływania narządów limfatycznych wiązał się z nasileniem skłonności limfocytów do tworzenia RS, ale wykazywały one niższą aktywność Fk. Efektem oddziaływania stymulacji antygenowej u kurcząt nieoperowanych było nasilenie tworzenia RS i aktywności Fk po podaniu LPS oraz spadek odsetka limfocytów z RS i wzrost aktywności Fk po podaniu SRBC. Odpowiedź limfocytów, związana z RS i aktywnością Fk, u kurcząt operowanych stymulowanych poszczególnymi antygenami miała zróżnicowany, indywidualny charakter. Badania zespołowe, dotyczące występowania RS u innych gatunków ptaków, opisane zostały w publikacji I.4. Dotyczyły one bażantów, których układ immunologiczny stymulowany był dwoma rodzajami szczepionek: przeciwko chorobie Newcastle (NDV) i przeciwko wirusowemu krwotocznemu zapaleniu jelit (HEV) oraz podaniem antygeny (SRBC). Wykazaliśmy, że limfocyty ptaków po szczepieniu tylko przeciwko NDV miały ograniczoną zdolność do tworzenia RS - ich odsetek był niewielki (3,8%). Nasilało ją natomiast skojarzone szczepienie przeciwko obu chorobom. U bażantów, które otrzymały oba rodzaje szczepionek, efekt nasilenia RS znosiła stymulacja SRBC.

W oparciu o wyniki przedstawione w powyższych pracach można stwierdzić, że zjawisko radialnej segmentacji jąder wiąże się z niekorzystnymi procesami dotyczącymi limfocytów, za czym przemawia wyższy odsetek limfocytów z RS po podaniu ACTH (limfotoksyczny efekt uwolnionych glikokortykosteroidów) oraz po zniesieniu ochronnego i stymulującego oddziaływania narządów limfatycznych.

**I.1. Graczyk S., Pliszcak-Król A.** Wstępne badania radialnej segmentacji (RS) jąder limfocytów krwi kur. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 1996; Nr 282: 15-24.

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników oraz na sformułowaniu wniosków.

**I.2. Pliszcak-Król A.** Wpływ ACTH na RS jąder i aktywność fosfatazy kwaśnej w aktywowanych antygenem limfocytach krwi ptaków. *Med Weter.*, 2001; 57 (9): 676-679.

(punkty MNiSW: 7 IF: 0,239)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowaniu ptaków do badań: podawanie ACTH i antygenów, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami.

**I.3. Pliszcak-Król A.** Rola centralnych i obwodowych narządów limfatycznych w powstawaniu radialnej segmentacji (RS) jąder oraz kształtowaniu aktywności

fosfatazy kwaśnej w limfocytach krwi kurcząt immunizowanych. *Acta Sci Pol - Med Vet.*, 2002; 1 (1): 81-101.

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; współpracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowaniu ptaków do badań: wykonanie części zabiegów usunięcia narządów limfatycznych, podawanie antygenów, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami.

**I.4.** Graczyk S., Wieliczko A., **Pliszczak-Król A.**, Janaczyk B. Radial segmentation of blood lymphocytes nuclei in pheasants vaccinated against Newcastle Disease and Haemorrhagic Enteritis. *Acta Vet., Brno*, 2008; 77: 625 – 630.

Doi: [10.2754/avb200877040625](https://doi.org/10.2754/avb200877040625).

(punkty MNiSW: 27 IF: 0,395)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: współpracowaniu metodyki badań, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków.

Dalsze badania nad RS, które prowadziłam, obejmowały również inne wskaźniki reaktywności leukocytów krwi u zwierząt. Wyniki tych badań zostały przedstawione w następnych grupach tematycznych.

## **II. Reaktywność leukocytów krwi obwodowej u różnych gatunków zwierząt, modulowana wpływem różnych warunków doświadczalnych**

Przebieg i charakter odpowiedzi immunologicznej determinowane są stopniem dojrzałości leukocytów oraz ich zdolnością do rozpoznawania i reagowania na antygeny – substancje „obce”. Naruszenie integralności ustroju przez różne czynniki inicjuje pobudzenie tych komórek, czemu towarzyszą zmiany ich morfologii. Objawiają się m.in. reorganizacją cytoszkieletu, zmianą aktywności niektórych enzymów, zwiększonym pobieraniem jonów  $Ca^{+2}$ , syntezą immunoglobulin czy aktywacją fagocytozy. Obok zmian jakościowych, obserwuje się też zmiany ilościowe, związane nie tylko z liczbą całkowitą leukocytów we krwi, ale też i z ilościowymi proporcjami pomiędzy poszczególnymi populacjami tych komórek.

Uwaga zespołu, którego byłam członkiem, skoncentrowana była na zmianach aktywności leukocytów w odpowiedzi na doświadczalną ingerencję w reaktywność układu immunologicznego. Publikacja **II.1.** przedstawia wyniki badań, podczas których obserwowaliśmy relacje ilościowe poszczególnych populacji leukocytów i stężenia glukozy we krwi u indyków będących pod wpływem stresu (po transporcie lub unieruchomionych) oraz u indyków, u których wpływ stresu ograniczano wcześniejszym podaniem propranololu (ograniczenie oddziaływania katecholamin). Stwierdziliśmy, że u ptaków poddanych stresowi wzrosło stężenie glukozy we krwi, a populacją dominującą stały się heterofile. Natomiast udział limfocytów był znacząco obniżony. Podobne wyniki uzyskaliśmy w przypadku indyków poddanych tym samym negatywnym wpływom (transport lub

unieruchomienie), ale którym wcześniej podano propranolol. Badania wykazały, że u indyków będących pod wpływem stresu zmiany ilościowe leukocytów oraz hiperglikemia były związane z innymi, nie tylko z katecholamino-zależnymi mechanizmami. W doświadczeniu o podobnym charakterze (publikacja **II.3.**), w którym dwukrotne podanie ACTH miało imitować warunki stresowe u indyków, obserwowaliśmy odpowiedź leukocytów na śródskórne podanie fitohemaglutyniny (PHA, mitogenu pobudzającego limfocyty T). Odpowiedź ta wyrażała się powstawaniem obrzęku zapalnego (nacieku aktywowanych leukocytów) w miejscu podania PHA - nadwrażliwość typu opóźnionego (DTH). W tym miejscu (na skrzydle w okolicy łokcia) mierzyliśmy grubość fałdu skóry przed podaniem PHA i 24 godziny po jej podaniu - stosunek tych dwóch pomiarów posłużył do wyliczenia indeksu skrzydłowego (WI). Ptaki będące pod wpływem jedynie ACTH nie reagowały na podanie PHA - wartość WI była podobna, jak u ptaków kontrolnych. Do pojawienia się obrzęku skóry przyczyniło się natomiast podanie propranololu - aktywność stymulowanych przez PHA leukocytów wzrosła. Odpowiedź leukocytów na śródskórne podanie PHA, badaliśmy też u bażantów szczepionych przeciwko chorobie Newcastle (NDV) i wirusowemu krwotocznemu zapaleniu jelit (HEV) oraz stymulowanych podaniem antygeny SRBC - publikacja **II.4.** Dodatkowo, u ptaków tych ocenialiśmy zdolność do produkcji przeciwciał: anti-NDV - przy użyciu odczynu zahamowania hemaglutynacji, anti-HEV - testem precypitacji w żelu agarowym, natomiast przeciwciał anti-SRBC - testem hamowania z 2-merkaptoetanołem. Wszystkie doświadczalne bażanty wykazywały obecność przeciwciał przeciwko NDV i przeciwko HEV. Ptaki, które otrzymały tylko szczepionkę przeciwko NDV wykazywały wyższe miano przeciwciał anti-SRBC niż ptaki pozostałe. Szczepienie skojarzone (przeciwko NDV i HEV) miało wpływ immunosupresyjny - w surowicy ptaków przeciwciała anti-SRBC były mocno obniżone. Efekt ten dotyczył też odpowiedzi na PHA - obrzęk skóry nie występował po jej podaniu (brak zmian indeksu skrzydłowego). W publikacji **II.5.** opisane zostały badania wpływu podawania kurczętom ochratoksyny A w paszy. We krwi ptaków śledziliśmy zmiany morfologiczne i czynnościowe leukocytów, tj. zdolność limfocytów do tworzenia radialnej segmentacji jąder (RS) oraz zdolność heterofili do fagocytozy komórek *Saccharomyces cerevisiae*. Ochratoksyna A, produkowana przez grzyby *Aspergillus* i *Penicillium*, posiada silne działanie mutagenne, teratogenne, nefrotoksyczne i hepatotoksyczne. Zaburza procesy hemostazy i oddziałuje immunosupresyjnie. Podawaliśmy ją kurczętom w paszy przez 10 i 20 dni. Zaburzenia ilościowe w zakresie leukocytów – wzrost udziału procentowego heterofili i obniżenie udziału limfocytów, obserwowaliśmy tylko w 10. dniu doświadczenia. W tym czasie nasiliła się też zdolność fagocytarna heterofili, która narastała do końca eksperymentu. Wpływ ochratoksyny A na RS był natomiast niewielki - notowaliśmy jej nieznaczne obniżenie. Generalnie, podawanie kurczętom mikotoksyny w przyjętej dawce i przez wyznaczony czas trwania doświadczenia nie miało znaczącego wpływu na stan czynnościowy i morfologię leukocytów krwi.

Obserwację reaktywności leukocytów u kurcząt w odpowiedzi na zmiany w sposobie żywienia prowadziłam także z zespołem Zakładu Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Kurczęta brojlery żywione były paszą z dodatkiem suszonych i zmielonych korzeni tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria*

*baicalensis*) - publikacja **II.9**. W medycynie naturalnej roślinie tej przypisuje się działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe, antyoksydacyjne, a także przeciwzakrzepowe i wazoprotektywne. Ptaki, podzielone na grupy, otrzymywały dodatek badanego suplementu w paszy w ilości 0,5%, 1% lub 1,5% przez 21 i 42 dni. Połowa kurcząt w każdej grupie była stymulowana *i.v.* SRBC. U wszystkich kurcząt otrzymujących *S. baicalensis* zaobserwowaliśmy wzrost odsetka heterofili, a obniżenie odsetka limfocytów. Heterofile ptaków, w odpowiedzi na przyjmowanie wyższych dawek (1% lub 1,5%) suplementu przez krótszy czas (21 dni) wykazywały nasiloną zdolność fagocytozy *S. cerevisiae*, która ulegała jednak zdecydowanemu osłabieniu przy suplementacji trwającej dłużej (42 dni). Komórki te u kurcząt spożywających najwyższą dawkę przez 42 dni, pomimo osłabionej fagocytozy, wykazywały silniejsze możliwości przeprowadzania procesów oksydo-redukcyjnych - ich zdolność do redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT), tj. reakcji będącej pośrednim wyznacznikiem wybuchu tlenowego wspomagającego efektywność fagocytozy, była wyższa w porównaniu do ptaków pozostałych. Zdolność limfocytów do tworzenia przeciwciał anti-SRBC była zróżnicowana - miano anti-SRBC było wyższe u kurcząt karmionych paszą z najmniejszym dodatkiem suplementu (0,5%), a obniżone u tych, które otrzymywały go więcej. Tylko najmniejszy dodatek (0,5%), podawany dłużej (przez 42 dni) powodował u kurcząt wzrost odsetka limfocytów z RS, natomiast efektem żywienia ptaków wg pozostałych schematów było jego obniżenie. Powyższe badania wykazały, że w zależności od dawki i czasu trwania suplementacji *S. baicalensis* wywierała zróżnicowany wpływ na aktywność układu immunologicznego u ptaków.

Dwie następne publikacje przedstawiają wyniki badań aktywności leukocytów u szczurów. Publikacja **II.2** opisuje obserwowane zmiany ilościowe i jakościowe leukocytów u szczurów z wszczepionymi komórkami nowotworów występujących u ludzi: mięsaka Yoshida, raka sutka lub wątrobiaka Morris'a. We krwi szczurów z wszczepionymi mięsakiem i rakiem obserwowałam wzrost całkowitej liczby leukocytów (WBC), z towarzyszącą neutrofilią i limfopenią. Zaburzeń ilościowych WBC nie wykazywały szczury z wątrobiakiem. Zdolność neutrofilii do fagocytozy była obniżona u wszystkich zwierząt doświadczalnych - neutrofilii fagocytykujących u szczurów z mięsakiem było dwukrotnie mniej w porównaniu do szczurów kontrolnych. Zdolność limfocytów do tworzenia spontanicznej RS była nasiloną u szczurów z mięsakiem i rakiem, natomiast prawie całkowicie została utracona u szczurów z wątrobiakiem. Wzrost odsetka limfocytów z indukowaną RS zauważyłam w krwi szczurów z rakiem i wątrobiakiem. Choć reaktywność leukocytów u wszystkich szczurów badanych zmieniała się różnie, to jednak w dużym stopniu zmiany te przypominały zmiany ilościowe i jakościowe leukocytów obserwowane w przebiegu procesu zapalnego. Tworzenie się jąder z RS w limfocytach oraz zdolność do fagocytozy komórek *S. cerevisiae* obserwowałam także u szczurów anemizowanych - publikacja **II.6**. Krew od szczurów była pobierana 3-krotnie w odstępach 7-dniowych. Przy każdym pobraniu nie stwierdzałam zaburzeń ilościowych w zakresie leukocytów, ani też erytrocytów czy płytek, co sugerowało, że czas regeneracji utraconych elementów morfotycznych był krótszy niż czas pomiędzy kolejnymi pobraniami krwi. Zanotowałam jednak obniżenie odsetka fagocytykujących neutrofilii oraz odsetka limfocytów tworzących RS.



Wraz z zespołem Zakładu Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Wydziału Stomatologicznego Akademii Medycznej we Wrocławiu (obecnie Wydział Lekarsko-Stomatologiczny Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu) badałam reaktywność leukocytów po kontakcie krwi z matrycami żelatynowo-alginianowymi - publikacje **II.7.** i **II.8.** Badania nasze miały na celu ocenę możliwości potencjalnego wykorzystania takich matryc w medycynie ludzkiej i stomatologii jako nośników leków oraz jako komponentów opatrunków hemostatycznych i kapsulek. Materiały przeznaczone do czasowego kontaktu z tkankami i krwią poddawane są szczegółowej analizie pod kątem ich biokompatybilności z tkankami oraz możliwości wywierania efektu toksycznego. Cztery rodzaje gąbek, o różnej zawartości żelatyny, alginianu sodu i glicerolu, kontaktowaliśmy z krwią świń przez 4 godziny w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu kontaktu wykonaliśmy rozmazy hematologiczne w celu stwierdzenia obecności toksycznych zmian morfologicznych w komórkach krwi oraz badania zdolności limfocytów do tworzenia RS, zdolności neutrofilów do fagocytozy i redukcji NBT. Kontakt z matrycami nie powodował zmian morfologicznych w komórkach krwi. Limfocyty miały osłabioną zdolność tworzenia RS. Neutrofile, choć wykazywały nasiloną zdolność fagocytozy, to słabiej redukowały NBT. Otrzymane wyniki sugerowały brak toksycznego oddziaływania badanych matryc w kontakcie z komórkami krwi.

**II.1.** Graczyk S., **Pliszczak-Król A.**, Kotoński B., Wilczek J., Chmielak Z. Examinations of hematological and metabolic changes mechanisms of acute stress in turkeys. EJPAU, series Veterinary Medicine, 2003; vol.6, iss.1.  
(punkty MNiSW: 6)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; pobieraniu materiału do badań, wykonaniu części analiz laboratoryjnych: wykonanie i ocena leukogramów, opracowaniu i interpretacji wyników.

**II.2.** Graczyk S., Madej J.A., **Pliszczak-Król A.**, Nowak M., Janaczyk B. Leukocytes function in the course of tumor progression in a rat model. Acta Sci Pol - Med Vet., 2004; 3(1): 45-51.  
(punkty MNiSW: 4)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; opracowaniu koncepcji i metodyki badań, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: indukowanie RS w limfocytach i jej analiza, oszacowanie liczby leukocytów, wykonanie i analiza leukogramów, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków.

**II.3.** Graczyk S., Zawadzki W., Czerski A., **Pliszczak-Król A.**, Kotoński B. Delayed type hypersensitivity reaction (DTH) in turkey treated with beta adrenergic antagonist and ACTH. EJPAU, series: Veterinary Medicine, 2004; vol.7, issue 2.  
(punkty MNiSW: 5)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; pobieraniu materiału do badań, wykonaniu testu DTH.

**II.4.** Graczyk S., Wieliczko A., **Pliszczak-Król A.**, Janaczyk B. Humoral and cellular response of Newcastle Disease and Hemorrhagic enteritis vaccinated pheasants. Acta Vet. Brno, 2006; 75: 379-386. Doi: [10.2754/avb200675030379](https://doi.org/10.2754/avb200675030379).



(punkty MNiSW: 15 IF: 0,491)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; przygotowaniu ptaków do badań: podawanie SRBC i PHA, pobieranie materiału do badań, wykonaniu części analiz laboratoryjnych.

**II.5.** Janaczyk B., **Pliszcak-Król A.**, Graczyk S., Houszka M., Rouibah K. Morphological and functional evaluation of chicken blood leukocytes in chronic ochratoxicosis. *Int J Poult Sci.*, 2006; 5(2): 191-194. Doi: [10.3923/IJPS.2006.191.194](https://doi.org/10.3923/IJPS.2006.191.194).

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; opracowaniu metodyki, pobieraniu materiału do badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: badania hematologiczne i RS, opracowaniu i interpretacji wyników.

**II.6.** **Pliszcak-Król A.**, Graczyk S., Król J., Janaczyk B. Ocena reaktywności leukocytów krwi obwodowej u szczurów animizowanych. *Med Weter.*, 2006; 62(12): 1435-1438.

(punkty MNiSW: 15)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowaniu zwierząt i pobieranie materiału do badań: pobieraniu krwi, podawanie antygenów, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami.

**II.7.** Szymonowicz M., **Pliszcak-Król A.**, Pielka S., Król J., Graczyk S., Haznar D., Pluta J. Badanie reaktywności leukocytów krwi po kontakcie z matrycami żelatynowo-alginianowymi. *Engineering of Biomaterials*, 2008; vol. XI, no 81-84: 29-30.

(punkty MNiSW: 9)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; współpracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: badania hematologiczne, indukcja RS i jej ocena, wykonanie i analiza testu NBT, wykonanie i analiza badania zdolności komórek do fagocytozy, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków.

**II.8.** **Pliszcak-król A.**, Szymonowicz M., Król J., Rybak Z., Graczyk S., Haznar D., Pluta J. Wpływ matryc żelatynowo-alginianowych na zmiany morfologiczne i czynnościowe leukocytów krwi. *Polim Med.*, 2013; 43: 153-158.

(punkty MNiSW: 6)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: badania hematologiczne, indukcja RS i jej ocena, wykonanie i analiza testu NBT, wykonanie i analiza badania zdolności komórek do fagocytozy, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami.

**II.9.** Króliczewska B., Graczyk S., Króliczewski J., **Pliszcak-Król A.**, Miśta D., Zawadzki W. Investigation of the immune effects of *Scutellaria baicalensis* on blood leukocytes and selected organs of the chicken's lymphatic system. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017; 8: 22. Doi: [10.1186/s40104-017-0152-x](https://doi.org/10.1186/s40104-017-0152-x).

(punkty MNiSW: 40 IF: 3,205)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: indukcja i analiza RS oraz opracowaniu wyników i wniosków do tej części badań.

### **III. Wpływ centralnych i obwodowych narządów limfatycznych na humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną**

W tej grupie doświadczeń oceniano wpływ usunięcia śledziony (splenektomii) na odpowiedź immunologiczną u kurcząt, którym podano dwa różne rodzaje antygenów: SRBC lub LPS - publikacja **III.1**. Odpowiedź humoralna, tj. zdolność aktywnych limfocytów B do produkcji przeciwciał oceniana była na podstawie pomiaru miana przeciwciał anti-SRBC lub anti-LPS. Dla oceny odpowiedzi komórkowej wykonano test DTH - pomiar grubości fałdu skóry w miejscu podania PHA. Dodatkowo, w celu oszacowania wpływu splenektomii na morfologię i reaktywność centralnych narządów limfatycznych, u kurcząt operowanych analizowano obraz histologiczny grasicy i torby Fabrycjusza. W wyniku splenektomii wystąpiło wyraźne obniżenie zdolności do syntezy przeciwciał - u kurcząt doświadczalnych miana przeciwciał anti-SRBC i anti-LPS były obniżone w porównaniu do ptaków kontrolnych. Nie stwierdzono natomiast różnicy w odpowiedzi komórkowej - nie było różnic w grubości fałdu skóry (nacieku komórkowego w odpowiedzi na PHA) między ptakami kontrolnymi i operowanymi. Obraz histologiczny ujawnił zmiany proliferacyjne uzależnione od rodzaju podanego antygeny w obrębie miejsc lokowania się specyficznych limfocytów, zarówno w grasicy, jak i torbie Fabrycjusza. Zestawiając zmiany w syntezie przeciwciał i zmiany histologiczne w narządach stwierdzono, że funkcje utraconego obwodowego narządu (śledziona) próbowały przejąć centralne narządy limfatyczne (grasica i torba Fabrycjusza). Nie rekompensowało to jednak wspomianej utraty. Wyniki dalszych badań nad funkcją śledziony w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej i aktywności limfocytów przedstawia publikacja **III.2**. W opisanym doświadczeniu oszacowany został wpływ ograniczenia kurczętom dostępu do pożywienia (stresu) na reaktywność grasiczo-zależnych i burso-zależnych struktur morfologicznych w śledzionie. Struktury grasiczozależne, tj. okołotętniczkowa tkanka limfatyczna (PAL), zasiedlane są przez limfocyty pochodzące z grasicy. Natomiast struktury bursozależne, tj. centra rozrodcze (GC) i perielipsoidalną tkankę limfatyczną (PEL), zasiedlają limfocyty pochodzące z torby Fabrycjusza. Kurczętom od 28. dnia życia podawano paszę co drugi dzień przez 14 lub 21 dni. Po zakończeniu doświadczenia, oceniano liczbę centrów aktywnych typu I i II na powierzchni 2,535 mm<sup>2</sup> skrawków histologicznych oraz aktywność Fk w limfocytach na całej powierzchni skrawków. Pomimo odnotowanego spadku względnej masy śledziony, u kurcząt doświadczalnych obu grup nie stwierdzono zmian w ogólnej liczbie GC. Wzrosła liczba nowo uformowanych GC typu II, co mogło być przejawem adaptacji zachodzącej w narządzie pod wpływem działającego stresora. Ograniczenie ptakom dostępu do paszy doprowadziło do osłabienia aktywności Fk w komórkach GC typu I. W pozostałych strukturach śledziony była ona zróżnicowana, a zmiany zależały od czasu trwania ograniczenia podawania paszy. Zmiany w zakresie niektórych enzymów lizosomalnych, jakie obserwowano u ptaków doświadczalnych, uzależnione były od nasilenia i czasu trwania stresu.

**III.1.** Graczyk S., Madej J., **Pliszcza-Król A.** Wpływ splenektomii na przebieg odpowiedzi humoralnej i komórkowej oraz morfologię centralnych narządów limfatycznych u kurcząt immunizowanych różnymi antygenami. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu, 1998; Nr 344: 7-15.

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; przygotowaniu zwierząt (podawanie antygenów) i pobieraniu materiału (krwi) do badań, wykonaniu części analiz laboratoryjnych: wykonanie testu DTH.

**III.2.** Graczyk S, Kuryszko J., Orda J., **Pliszczak-Król A.**, Zawadzki W., Janaczyk B. Wpływ żywienia na reaktywność struktur limfatycznych śledziony kurcząt. *Med Weter.*, 2006; 62(4): 411-415.

(punkty MNiSW: 15)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: przygotowaniu ptaków i pozyskiwaniu śledziony do badań.

#### **IV. Identyfikacja drobnoustrojów chorobotwórczych w wybranych stanach patologicznych u człowieka i u zwierząt**

Powierzchnie ciała psów i kotów mogą być zasiedlane przez różnorodne grupy mikroorganizmów. Wiele z nich należy do drobnoustrojów warunkowo chorobotwórczych, zdolnych do wywołania zakażeń w przypadku upośledzenia mechanizmów obronnych gospodarza. Osobnym problemem jest aspekt epidemiologiczny nosicielstwa bakterii u zwierząt, zwłaszcza w jamie ustnej i gardle, gdyż wiele z tych mikroorganizmów może również powodować infekcje u ludzi, np. w przypadku ran kłasnanych. Publikacja **IV.1.** jest pracą przeglądową dotyczącą tego problemu.

Badania, w których uczestniczyłam miały na celu poznanie składu gatunkowego oraz opracowanie skutecznych metod identyfikacji drobnoustrojów występujących fizjologicznie na błonach śluzowych jamy ustnej i gardła psów i kotów, a także izolowanych z przypadków zakażeń. Taką grupą bakterii o dużym potencjale zoonotycznym jest np. rodzina *Pasteurellaceae*. W publikacji **IV.3.** została opisana nowa procedura diagnostyczna, oparta na technice PCR, pozwalająca na szybką i pewną identyfikację najważniejszych przedstawicieli tej rodziny (*Pasteurella multocida*, *P. stomatis*, *P. dagmatis* oraz *P. canis*). Dodatkowo, nasze badania wykazały, że jeden z tych gatunków (*P. dagmatis*) jest drobnoustrojem heterogennym pod względem genotypowym - izolaty pochodzące od psów różnią się od tych izolowanych od kotów, co mogłoby być wykorzystane do celów epidemiologicznych - publikacja **IV.4.**

Współpraca z lekarzami klinicystami zaowocowała ponadto dwiema publikacjami opisującymi nietypowe infekcje u psów. W pierwszej z nich (publikacja **IV.2.**) wykazaliśmy prawdopodobną rolę *Providencia alcalifaciens* w zakażeniu przewodu pokarmowego, w drugiej (publikacja **IV.5.**) opisany został nietypowy przypadek kandydozy skóry u psa z uogólnioną nużycą.

**IV.1.** Król J., Florek M., **Pliszczak-Król A.**, Staroniewicz Z. Analiza mikrobiologiczna ran u ludzi po pogryzieniu przez psy i koty. *Med Weter.*, 2006; 62(5): 498-501.

(punkty MNiSW: 15)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na zbieraniu danych literaturowych i pomocy w opracowaniu manuskryptu.

**IV.2.** Król J., Janeczek M., **Pliszcak-Król A.**, Janeczek W., Florek M. Providencia alcalifaciens as the presumptive cause of diarrhea in dog. Pol J Vet Sci., 2007; vol.10, no.4: 285-287. PMID: [18198546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18198546/).

(punkty MNiSW: 20 IF: 0,291)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pobieraniu materiału (wymazów) do badań.

**IV.3.** Król J., Bania J., Florek M., **Pliszcak-Król A.**, Staroniewicz Z. Polymerase chain reaction-based identification of clinically relevant Pasteurellaceae isolated from cats and dogs in Poland. J Vet Diagn Investig., 2011; 23(5): 532-537.

Doi: [10.1177/1040638711403434](https://doi.org/10.1177/1040638711403434).

(punkty MNiSW: 35 IF: 1,214)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pobieraniu materiału (wymazów) do badań oraz pomocy w opracowaniu manuskryptu.

**IV.4.** Król J., Bania J., Podkowiak M., Florek M., **Pliszcak-Król A.**, Staroniewicz Z. Genetic diversity of Pasteurella dagmatis as assessed by analysis of the 16S rRNA and rpoB gene sequences. Curr Microbiol., 2011; 63: 87-93.

Doi: [10.1007/s00284-011-9949-6](https://doi.org/10.1007/s00284-011-9949-6).

(punkty MNiSW: 20 IF: 1,815)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pobieraniu materiału (wymazów) do badań oraz pomocy w opracowaniu manuskryptu.

**IV.5.** Król J., Florek M., Pliszcak-Król A., Staroniewicz Z. Cutaneous candidiasis in dog with demodicosis - case report. Med Weter., 2011; vol. 67, nr 7, 496-498.

(punkty MNiSW: 10)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pobieraniu materiału (wymazów) do badań oraz pomocy w opracowaniu manuskryptu.

## **V. Mechanizmy hemostazy ogólnoustrojowej - badania *in vitro* i *in vivo***

Hemostaza jest kompleksem mechanizmów, których zadaniem jest utrzymanie krwi w płynnej postaci w łożysku naczyniowym oraz zapobieganie jej krzepnięciu lub utracie, a przez to zapobieganie utracie także i innych płynów ustrojowych. Prawidłowe jej funkcjonowanie uzależnione jest od zrównoważenia kooperacji krzepnięcia i fibrylizacji, czynników je aktywujących i hamujących oraz wzajemnych relacji pomiędzy komórkami krwi i tkankami otaczającymi. Zachwianie tej równowagi może prowadzić do skaz krwotocznych lub do zakrzepicy, a w konsekwencji do krwotoków lub powikłań zakrzepowo-zatorowych, które mogą zagrażać utratą zdrowia a nawet życia.

Moje pierwsze badania procesów hemostazy u zwierząt dotyczyły ptaków. Publikacja **V.3.** opisuje wyniki obserwacji procesów krzepnięcia u kurcząt poddanych stymulacji antygenowej (LPS) oraz, którym podawano ACTH. Na podstawie czasów: protrombinowego (PT), częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT) i trombinowego (TT), a także stężenia fibrynogenu (Fb) mierzonych w osoczu, zaobserwowałam, że u ptaków poddanych czynnikowi stresowemu i/lub pod naporem antygeny sprawność

mechanizmów krzepnięcia zmieniła się. U kurcząt, które otrzymały tylko jeden z dwóch wspomnianych czynników nastąpiło wydłużenie PT i APTT, co sugerowało spowolnienie krzepnięcia. Jednak u kurcząt, którym podano LPS, miało miejsce skrócenie TT i obniżenie Fb, co wskazywałoby na próbę wyrównania tej zmiany. Łączne podanie LPS i ACTH miało efekt odwrotny, tj. nasiliło procesy krzepnięcia - aPTT i TT uległy skróceniu oraz obniżyło się stężenie Fb.

Publikacje **V.1.** i **V.2.** prezentują cykl badań, w których wraz z zespołem Zakładu Chemii Medycznej i Mikrobiologii Wydziału Chemii Politechniki Wrocławskiej obserwowałam wpływ glikokoniugatów (związków węglowodanowo-fenolowych) pozyskanych z części kwitnących krwawnicy pospolitej (*Lythrum salicaria*) na sprawność procesów krzepnięcia. *L. salicaria*, ze względu na swoje działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, gojące i przeciwbólowe, a także pozytywny wpływ na układ krążenia i różnego typu krwotoki, wykorzystywana była w medycynie ludowej. Badania miały na celu poznanie aspektów tego działania, co w przyszłości mogłoby być wykorzystane w terapii zaburzeń hemostazy u ludzi. W publikacji **V.1.** opisane zostały efekty oddziaływania glikokoniugatu *in vitro* i *ex vivo*. W badaniach *in vitro* mierzyłam PT, aPTT i TT w próbkach standaryzowanego osocza ludzkiego z dodatkiem ekstraktu zawierającego różne stężenia glikokoniugatu. Zaobserwowałam wydłużenie czasów krzepnięcia - PT przy dodatku glikokoniugatu  $\geq 250 \mu\text{g/ml}$ , aPTT przy  $\geq 15,63 \mu\text{g/ml}$ , a TT przy  $\geq 125 \mu\text{g/ml}$ , co sugerowało efekt przeciwkrzepliwy jego oddziaływania. W badaniach *ex vivo* mierzyłam PT, aPTT i TT w próbkach osocza pozyskanego z krwi szczurów, którym podano *dotętniczo* 1 ml ekstraktu zawierającego 30 mg glikokoniugatu. Krew była pobrana w 15. i 70. minucie po podaniu ekstraktu. Notowane znaczące wydłużenie PT, aPTT i TT potwierdziło hamujący wpływ badanego glikokoniugatu na krzepnięcie osoczowe. W publikacji **V.2.** przedstawione są badania *in vitro*, podczas których mierzyłam PT i aPTT w próbkach standaryzowanego osocza ludzkiego, do którego dodawano 12 różnych frakcji kwaśnych glikokoniugatów. Wśród badanych frakcji były takie, które miały wpływ ewidentnie przeciwkrzeplowy - zanotowano wydłużenie PT i/lub aPTT - oraz takie o prokrzeplowym działaniu - PT i/lub aPTT były skrócone. Efekt oddziaływania poszczególnych frakcji determinowany był różną zawartością węglowodanów, fenoli oraz kwasu uronowego w glikokoniugacie oraz ich stężeniem w próbce. Obok uczestnictwa w badaniach osoczowego krzepnięcia, brałam też udział w eksperymentach oceniających aktywność płytek krwi. Rola płytek w hemostazie polega na adhezji, agregacji, uwalnianiu substancji m.in. prokrzeplowych oraz interakcji z innymi komórkami i tworzenie czopu płytkowego. Doświadczenia opisane w publikacjach **V.4.** i **V.5.** dotyczą oceny ekspresji receptorów CD41/62 i CD62P na płytkach krwi u koni ze zdiagnozowaną astmą (nawracającą chorobą obturacyjną dróg oddechowych, RAO). W doświadczeniu opisanym w publikacji **V.4.** badaliśmy ekspresję tych receptorów u koni z zaostroszoną, w efekcie 48-godz. ekspozycji na alergeny pleśni, formą RAO. Oddzielne zawiesiny płytek stymulowanych trombiną inkubowane były z przeciwciałami monoklonalnymi: mysimi przeciw CD62P człowieka lub z mysimi przeciw CD41/61 owcy. Płytki koni z RAO wykazywały wyższą aktywność w porównaniu do koni zdrowych przebywających w tych samych warunkach - notowaliśmy 5-krotnie wyższą ekspresję CD41/61. Ekspresja CD61P była obniżona, co wiązaliśmy z możliwością ich „złuszczenia”

przez płytki i utraty w krótkim czasie po aktywacji. Przedstawione w publikacji **V.5.** doświadczenie miało podobny cel, tj. ocenę ekspresji CD41/62 i CD62P na płytkach krwi u koni z zastrzoną astmą, jednak nasilenia objawów choroby dokonano wg innego schematu. Konie przebywały w niewietrzonych stajniach, narażone na pleśnie zawarte w sianie i słomie przez 7 dni. Krew do badań pobieraliśmy od zwierząt: tuż przed rozpoczęciem doświadczenia, przez pierwsze 3 kolejne dni oraz w 7. i 14. dniu trwania doświadczenia. Intensywna i długotrwała ekspozycja na alergeny spowodowała u badanych zwierząt wysoki wzrost aktywności płytek krwi – ekspresja CD41/62 i CD62P była znacząco wyższa w porównaniu do koni zdrowych (kontrolnych) przebywających w tych samych warunkach.

Badania ekspresji CD62P na powierzchni płytek aktywowanych trombiną wg metody przedstawionej powyżej prowadziłam też we współpracy z zespołem Instytutu Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki we Wrocławiu oraz z zespołem Kliniki Niewydolności Serca i Transplantologii Instytutu Kardiologii w Warszawie. Obserwację ekspresji tych receptorów prowadziliśmy w zestawieniu ze zdolnością płytek do agregacji pod wpływem kolagenu lub adenozynodifosforanu (ADP) u świń poddanych krążeniu pozaustrojowemu (aparatu płuco-serce) przez 1 godz. i w ciągu 23 godzin po jego zakończeniu - publikacja **V.6.** W trakcie krążenia pozaustrojowego, kontakt krwi z obcymi powierzchniami aparatu płuco-serce oraz nienaturalne warunki przepływu często prowadzą u pacjentów do rozwoju ostrego ogólnoustrojowego zapalenia, a także do uaktywnienia mechanizmów hemostazy, w tym do zmian aktywności płytek krwi. Poddanie krwi w tym czasie bezpośredniemu naświetlaniu promieniami bliskiej podczerwieni (NIR) w dużym stopniu eliminuje niepożądane skutki zabiegu. W naszym doświadczeniu, krew 12 świń podczas krążenia naświetlano NIR o długości fali w zakresie 750-1100 nm (maximum intensywności 800 nm). Kontrolę stanowiło 12 świń, także poddanych krążeniu pozaustrojowemu, ale których krew nie była naświetlana. Krew od zwierząt pobierano przed rozpoczęciem krążenia, w 30. minucie jego trwania, bezpośrednio po zakończeniu oraz w 6., 12., 24. godz. od rozpoczęcia całej procedury. Płytki krwi świń kontrolnych wskutek kontaktu z powierzchniami aparatu płuco-serce uległy aktywacji - wykazywały wzmożoną skłonność do agregacji w obecności obu agonistów i wyraźnie obniżoną ekspresję CD62P (receptory w krótkim czasie po aktywacji są usuwane z powierzchni błon komórek). Efektu takiego nie obserwowaliśmy u zwierząt, których krew była naświetlana NIR - płytki agregowały znacznie słabiej a ekspresja CD62 pozostawała na względnie stałym, niskim poziomie. Otrzymane wyniki potwierdziły osłaniający i stabilizujący efekt oddziaływania zastosowanego promieniowania na badane komórki.

**V.1.** Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kańska J., Bijak J., Capek P., **Pliszczak-Król A.**, Gancarz R. An acid glycoconjugate from *Lythrum salicaria* L. with controversial effects on haemostasis. *J Ethnopharmacol.*, 2010; 131: 63-69.

Doi: [10.1016/j.jep.2010.06.001](https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.001).

(punkty MNiSW: 32 IF: 2,466)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: badania koagulologiczne (*in vitro* i *ex vivo*: PT, aPTT, TT), opracowaniu i interpretacji wyników.

- V.2.** Pawlaczyk I., Capek P., Czerchawski L., Bijak J., Tsirigotis M., **Pliszcak-Król A.**, Ganczarz R. An anticoagulant effect chemical characterization of *Lythrum salicaria* L. glycoconjugates. *Carbohydr Polym.*, 2011; 86: 277-284.

Doi: [10.1016/j.carbpol.2011.04.048](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.048).

(punkty MNiSW: 40 IF: 3,628)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; zaplanowaniu i wykonaniu części analiz laboratoryjnych: badania koagulologiczne (*in vitro*: PT, aPTT), opracowaniu i interpretacji wyników.

- V.3. Pliszcak-Król A.**, Graczyk S., Gemra M., Iwaszko-Simonik A., Król J. The influence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) administration on coagulation processes in chicken. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Veterinary Medicine*, 2012; 69(1-2): 247-248.

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na; pracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowaniu ptaków do badań: podawanie ACTH i LPS, pobieraniu materiału (krwi) do badań, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych: badania koagulologiczne, zebraniu, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, opracowaniu manuskryptu i polemice z recenzentami.

- V.4.** Iwaszko-Simonik A., Niedźwiedz A., Graczyk S., Słowikowska M., **Pliszcak-Król A.** Expression of surface platelet receptors (CD62P and CD41/61) in horses with recurrent airway obstruction (RAO). *Vet Immunol Immunopathol*, 2015; 164: 87-92.

Doi: [10.1016/j.vetimm.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.01.002).

(punkty MNiSW: 25 IF: 1,664)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na przygotowaniu materiału do analiz laboratoryjnych oraz pomocy w opracowaniu manuskryptu.

- V.5.** Iwaszko A., Borowicz H., Graczyk S., Słowikowska M., **Pliszcak-Król A.**, Niedźwiedz A. Effect of antigen challenge on dynamics of CD62P and CD41/61 expression on platelets in horses with recurrent airway obstruction (RAO). *Vet Immunol Immunopathol.*, 2018; 202: 172-178. Doi: [10.1016/j.vetimm.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.07.007).

(punkty MNiSW: 30 IF: 1,846)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na przygotowaniu materiału do analiz laboratoryjnych oraz pomocy w opracowaniu manuskryptu.

- V.6.** Drohomirecka A., Iwaszko A., Walski T., **Pliszcak-Król A.**, Wąż G., Graczyk S., Gałęcka K., Czerski A., Bujok J., Komorowska M. Low-level light therapy reduces platelet destruction during extracorporeal circulation. *Sci Rep.*, 2018; vol.8, Iss.1, Article number 16963: 1-3. Doi: [10.1038/s41598-018-35311-9](https://doi.org/10.1038/s41598-018-35311-9).

(punkty MNiSW: 40 IF: 4,011)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: współtworzeniu koncepcji badania, przygotowaniu materiału do analiz laboratoryjnych.



Prace przeglądowe dla klinicystów, dotyczące zagadnień hemostazy, w przygotowaniu których uczestniczyłam, dotyczą m.in.:

- Diagnostyki laboratoryjnej zaburzeń hemostazy u koni. W publikacji **V.7.** opisane zostały ogólna charakterystyka hemostazy i jej zaburzenia, metody pozyskania i przygotowania materiału do badań, stosowane laboratoryjne badania przesiewowe i szczegółowe oraz algorytmy interpretacji otrzymanych wyników. W publikacji **V.8.** przedstawiona została istota zaburzeń hemostazy u koni w przebiegu morzysk. Obok metod przygotowania materiału do badań, wyboru diagnostycznych badań laboratoryjnych i sposobu interpretacji wyników, zostały opisane też metody terapii tego typu zaburzeń.
- Wykorzystania osocza bogatopłytkowego (PRP) w medycynie regeneracyjnej koni. W publikacjach **V.9. - V.11.** opisane zostały: biologia płytek krwi, metody przygotowania i schemat podawania PRP oraz korzyści i ograniczenia związane z jego podawaniem.

**V.7.** Iwaszko A., **Pliszcak-Król A.**, Graczyk S. Diagnostyka laboratoryjna zaburzeń hemostazy u koni. *Magazyn weterynaryjny*, 2009; 12 (vol.18): 1286-1290.

(punkty MNiSW: 2)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji i formy manuskryptu.

**V.8.** Iwaszko-Simonik A., **Pliszcak-Król A.**, Graczyk S. Podstawy diagnostyki i terapii zaburzeń krzepnięcia krwi w przebiegu morzysk u koni. *Życie Weterynaryjne*, 2011; 86(5): 360- 364.

(punkty MNiSW: 4)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji i formy manuskryptu.

**V.9.** Iwaszko-Simonik A., Graczyk S., **Pliszcak-Król A.**, Henklewski R., Biazik A. Wykorzystanie osocza bogatopłytkowego w leczeniu ścięgien u koni. *Magazyn Weterynaryjny*, 2012; vol.21(176): 67-73.

(punkty MNiSW: 3)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji i formy manuskryptu.

**V.10.** Iwaszko-Simonik A., Graczyk S., **Pliszcak-Król A.**, Henklewski R., Biazik A. Zastosowanie komórek macierzystych oraz osocza bogatopłytkowego w medycynie regeneracyjnej koni. *Magazyn Weterynaryjny* 2014; Vol. 23 nr 208: 862-866.

(punkty MNiSW: 3)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji i formy manuskryptu.

**V.11.** Iwaszko-Simonik A., Graczyk S., **Pliszcak-Król A.** Techniki medycyny regeneracyjnej stosowane u koni. *Weterynaria w terenie, S. Choroby koni*, 2016; 58-61.

(punkty MNiSW: 3)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na pomocy w opracowaniu koncepcji i formy manuskryptu.



## VI. Inne tematy badawcze

Prace przedstawione w tym podrozdziale dotyczą badań, w których brałam udział, a które dotyczyły statusu zdrowotnego zwierząt hodowlanych.

We współpracy z zespołem Katedry Mikrobiologii Wydz. Med. Wet. Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) określałam rodzaj alergenów, które są powodem najczęściej występujących chorób atopowych u psów na terenie Dolnego Śląska - publikacja **VI.1.** Alergiczne testy skórne zawierające 25 różnych typów alergenów, wykonane zostały u psów, u których zostały wykluczone pierwotne bakteryjne, grzybicze lub pasożytnicze choroby skóry. Wśród przebadanych 40 pacjentów, dominowały bokserzy i owczarki niemieckie. Do alergenów dających najwięcej odczynów dodatnich w zastosowanym teście należały: kurz domowy, pleśnie (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*), naskórek człowieka oraz pierze gęsie i kacze.

Badania dotyczące statusu zdrowotnego krów hodowanych w rejonie przemysłowym prowadziłam wraz z zespołem toksykologów z Katedry Farmakologii Wydz. Med. Wet. Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu). Badane krowy eksponowane były na działanie zanieczyszczeń gazowych i pyłowych, emitowanych przez kopalnię i elektrownię Turów - publikacja **VI.2.** W krwi pobranej od krów oznaczane były: parametry czerwonekrwinkowe (liczba erytrocytów [RBC], stężenie hemoglobiny [Hb], hematokryt [Ht], średnia objętość erytrocytu [MCV], średnia masa hemoglobiny w erytrocycie [MCH], średnie stężenie hemoglobiny w erytrocycie [MCHC]), liczba leukocytów (WBC), liczba płytek (PLT). W osoczu oznaczaliśmy aktywność enzymów: aminotransferazy alaninowej i asparaginowej, fosfatazy alkalicznej, amylazy trzustkowej oraz stężenie: białka całkowitego, cholesterolu i bilirubiny. Wyniki badań wykazały zmiany morfologiczne erytrocytów, obniżenie Hb i MCV, wyższą aktywność aminotransferazy asparaginowej oraz stężenia cholesterolu i białka całkowitego. Mierzone wartości wymienionych parametrów nie osiągały jednak poziomów, które wskazywałyby na niepokojące zaburzenia u badanych krów, związane z zatruciem przemysłowym.

Efekty suplementacji żelazem u nowonarodzonych prosiąt badałam wraz z zespołem Zakładu Prewencji Katedry Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu - publikacja **VI.3.** Prosięta otrzymały preparat żelazowy Ferran 200 w dwóch różnych terminach: jedna grupa w 1. a druga w 4. dniu po urodzeniu. Krew do badań pobieraliśmy odpowiednio w 5. i 17. dniu życia prosiąt. Wpływ preparatu ocenialiśmy na podstawie pomiarów parametrów czerwonekrwinkowych: RBC, Ht, Hb, stężenia żelaza oraz aktywności katalazy (wyrażającej potencjał oksydo-redukcyjny osocza). Otrzymane wyniki wykazały, że podanie preparatu Fe w pierwszym 1. dniu życia wywiera korzystniejszy efekt na potencjał hemopoetyczny prosiąt – w tej grupie zwierząt notowaliśmy wyższy wzrost mierzonych parametrów w krótszym czasie po podaniu preparatu.

**VI.1.** Król J., Cierpisz J., **Pliszczak-Król A.** Zastosowanie testów skórnych w diagnostyce atopii u psów. *Życie Weterynaryjne*, 1998; 73(9): 351-353.  
(punkty MNiSW: 6)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: pobieraniu wymazów i zeszkobin skóry, pobieraniu zeszkobin ze skóry, badaniach hematologicznych oraz kwalifikacji i przygotowaniu zwierząt do testów skórnych.

**VI.2.** Kucharczak E., **Pliszcak-Król A.**, Szypoczyński K. Ocena wpływu emisji przemysłowych na parametry hematologiczne we krwi krów. W: Zielińska-Psuja B., Orłowski J.: Wybrane zagadnienia interakcji ksenobiotyków. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu 2007, 94-97.

Rozdział w monografii.

(punkty MNiSW: 0)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zaplanowaniu i wykonaniu badań hematologicznych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków.

**VI.3.** Rząsa A., Graczyk S., Gemra M., Łuczak G., Zyzak A., **Pliszcak-Król A.**, Iwaszko-Simonik A., Sucholiński M., Szymczak W., Twardoń J. Iron level and antioxidant status in two-week-old piglets. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Cluj-Napoca, Veterinary Medicine, 2012; 69 (1-2): 258-259.

(punkty MNiSW: 2)

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na: zaplanowaniu i wykonaniu badań hematologicznych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz sformułowaniu wniosków.

## Sumaryczne wskaźniki dokonań naukowych

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor: **27, 859.**

Sumaryczna punktacja MEiN: **680.**

Index Hirscha w bazie Web of Science: **5.**

Index Hirscha w bazie Scopus: **6.**

Liczba cytowań w bazie Web of Science: **109.**

bez autocytowań: **97.**

Liczba cytowań w bazie Scopus: **112.**

bez autocytowań: **101.**

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor  
publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **6, 594.**

Sumaryczna punktacja MEiN  
publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **240.**

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor  
po wyłączeniu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **21, 265.**

Sumaryczna punktacja MEiN  
po wyłączeniu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe: **440.**

