

Załącznik 3

Autoreferat

dr Alicja Magdalena Majewska

Katedra Nauk Fizjologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2023

1. Imię i nazwisko

Alicja Magdalena Majewska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

06.04.2004 stopień naukowy doktora nauk rolniczych, w zakresie ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
tytuł rozprawy doktorskiej: „Zróżnicowanie polskich lokalnych typów chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn.) pod względem plonowania, cech morfologicznych, składu chemicznego oraz aktywności biologicznej”,
promotor pracy: dr hab. Barbara Dąbrowska, prof. SGGW (dyplom z wyróżnieniem)

08.09.2000 tytuł zawodowy magistra inżyniera ogrodnictwa, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
tytuł pracy magisterskiej pt. "Wstępne badania nad uprawą tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) w Polsce",
promotor pracy: prof. dr hab. Zenon Węglarz

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

od 2011 Zakład Biochemii i Dietetyki, Katedra Nauk Fizjologicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie, - stanowisko adiunkt

2007 - 2011 Katedra Nauk Fizjologicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, SGGW w Warszawie - stanowisko naukowo-techniczne

2006 - 2007 Zakład Genetyki, Hodowli i Biotechnologii, Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka (dziś Instytut Ogrodnictwa) PIB w Skierniewicach – stanowisko adiunkt

2000 - 2004 studia doktoranckie – Katedra Roślin Warzywnych i Leczniczych, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, SGGW w Warszawie

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

4.1 Osiągnięcie naukowe pt. „**Udział limfocytów, cytokin i genów w odpowiedzi immunologicznej w atopowym zapaleniu skóry u psów**” tworzy cykl trzech, powiązanych tematycznie oryginalnych publikacji naukowych, w których jestem pierwszym i korespondencyjnym autorem:

- I. Majewska A, Gajewska M, Dembele K, Maciejewski H, Prostek A, Jank M.** Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. *BMC Vet Res.* 2016, 12:174. doi: 10.1186/s12917-016-0805-6.
(IF₂₀₁₆: 1,75, pkt MEiN₂₀₁₆: 40 , wg. punktacji po wprowadzeniu Ustawy 2.0 -Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce: pkt MEiN₂₀₂₃: 140, liczba cytowań 39)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, pozyskaniu środków na realizację badań, współudziale w opracowaniu metodyki, w zebraniu materiału do badań oraz we wszystkich analizach laboratoryjnych. Analizowałam i interpretowałam wyniki, jak również napisałam artykuł oraz wykonałam wykresy i tabele.

- II. Majewska A, Dembele K, Dziendzikowska K, Prostek A, Gajewska, M.** Cytokine and Lymphocyte Profiles in Dogs with Atopic Dermatitis after Allergen-Specific Immunotherapy. *Vaccines* **2022**, 10: 1037. doi.org/10.3390/vaccines10071037.
(IF₂₀₂₂: 7,8; pkt MEiN₂₀₂₂: 140, liczba cytowań: 2)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, pozyskaniu środków na realizację badań, współudziale w opracowaniu metodyki, w zebraniu materiału do badań oraz we wszystkich analizach laboratoryjnych. Analizowałam i interpretowałam wyniki, jak również napisałam artykuł oraz wykonałam wykresy i tabele.

- III. Majewska A, Gajewska M, Dembele K.** Effect of Allergen-Specific Immunotherapy on Transcriptomic Changes in Canine Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24: 11616. doi.org/10.3390/ijms241411616
(IF₂₀₂₂: 5,6; pkt MEiN₂₀₂₃: 140)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, pozyskaniu środków na realizację badań, współudziale w opracowaniu metodyki, w zebraniu materiału do badań oraz we wszystkich analizach laboratoryjnych. Analizowałam i interpretowałam wyniki, jak również napisałam artykuł oraz wykonałam wykresy i tabele.

Wszystkie publikacje powstały w ramach projektu badawczego nr: N N308 575940, finansowanego przez MNiEW pt. „Wpływ atopowego zapalenia skóry na profil transkryptomiczny komórek skóry i krwi obwodowej psów”. **W ww. projekcie pełniłam funkcję kierownika.**

Łączna punktacja publikacji wchodzących w cykl osiągnięcia , zgodnie z rokiem opublikowania wynosi:

Sumaryczny Impact Factor (IF) według bazy Journal Citation Reports (JCR): **15,15**

Suma punktów MNiSW: **320**

Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się odpowiednio w załącznikach 5 i 6 do Wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

4.2 Uzasadnienie tematyki badań

Atopowe zapalenie skóry (AZS) jest jedną z najczęściej występujących chorób skóry u psów, dotykającą ok 10% populacji. Jest to genetycznie uwarunkowana, przewlekła, nawracająca, zapalno-świądowa, alergiczna dermataza o charakterystycznych objawach klinicznych. Związana jest z nadmiernym uwalnianiem przeciwciał klasy IgE, które są skierowane przeciwko alergenom środowiskowym (Halliwell i wsp. 2006). Do rozwoju AZS dochodzi w wyniku współdziałania kilku czynników, takich jak: predyspozycje genetyczne, czynniki środowiskowe, nieprawidłowa struktura i funkcjonowanie (dysfunkcja) bariery naskórkowej oraz zaburzenia w odpowiedzi układu immunologicznego.

Chociaż definicja AZS obejmuje wiele aspektów patogenezy, choroba ta nie ma patognomonicznych objawów klinicznych, które pozwalałyby na postawienie jednoznacznej diagnozy na podstawie wstępnego wywiadu i badania klinicznego (Hensel i wsp. 2015). Rozpoznanie AZS u psów może być trudne, co wynika z różnorodności obrazu klinicznego, który zależy od czynników genetycznych (fenotypy związane z rasą), sezonu (różne natężenie czynników uczulających), rozległości zmian, stopnia zaawansowania choroby (ostra lub przewlekła), oraz obecności wtórnych zakażeń bakteryjnych lub innych czynników zapalnych. Dodatkowo, niektóre objawy choroby mogą przypominać inne choroby skóry, które nie są związane z AZS u psów. Podzespół Międzynarodowego Komitetu ds. Chorób Alergicznych u Zwierząt (International Committee for Allergic Diseases in Animals, ICADA) opracował wskazówki, które są pomocne w diagnozowaniu AZS u psów (Hensel i wsp. 2015). Wytyczne te obejmują trzy różne uzupełniające się sposoby oceny: 1) wykluczenie innych chorób skóry, dających zbliżone objawy, 2) szczegółowa analiza na podstawie wywiadu (historii choroby pacjenta) i objawów klinicznych, wspomagana kryteriami Favrota (Favrot i wsp. 2010), 3) wykonanie testów śródskórnych w celu wykazania czynnika odpowiedzialnego za rozwój uczulenia oraz wykonanie testów serologicznych w celu oznaczenia w surowicy poziomu swoistych przeciwciał IgE przeciw alergenom środowiskowym. Rozpoznanie choroby postawione na podstawie tylko jednej wytycznej może być błędne.

Pomimo tego że AZS stanowi istotny problem kliniczny, patogeneza tej choroby jest złożona i nie została do końca wyjaśniona, co powoduje, że leczenie AZS jest trudne, wymaga dużego doświadczenia klinicznego i nie zawsze jest skuteczne. AZS negatywnie wpływa na jakość

życia chorych psów i często wymaga leczenia przez całe życie. Najczęstszą i klinicznie istotną cechą AZS jest świąd o nasileniu od umiarkowanego do ciężkiego, któremu towarzyszy rumień, rumieniowe wykwity plamkowe i/lub grudkowe, samoczynne łysienie, zadrapania, hiperpigmentacja i lichenifikacja.

Zarówno objawy choroby, jak i etiopatogeneza atopowego zapalenia skóry są podobne u psów i u ludzi. Dzięki szeroko prowadzonym badaniom genetycznym i immunologicznym znacznie lepiej poznany jest mechanizm prowadzący do stanu zapalnego skóry w reakcji na alergen u ludzi niż u psów. Mimo to nadal potrzebne są dalsze badania dotycząca AZS u obu gatunków. AZS jest konsekwencją współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych. Zmiany genetyczne dotyczą dwóch grup genów: kodujących białka strukturalne naskórka i innych nabłonków oraz genów kodujących białka układu immunologicznego. W wyniku zmian fizykochemicznych naskórka, dochodzi do dysfunkcji bariery naskórkowej co ułatwia wnikanie alergenów środowiskowych i rozwój alergicznej reakcji zapalnej. AZS jest konsekwencją zaburzonej zarówno wrodzonej (nieswoistej), jak i nabytej (swoistej) odpowiedzi immunologicznej.

AZS jest wywołane reakcją nadwrażliwości typu I. Reakcja zapalna spowodowana jest brakiem równowagi pomiędzy pomocniczymi limfocytami T $CD4^+$: Th1 i Th2. Za inicjowanie odpowiedzi immunologicznej w skórze odpowiedzialne są komórki prezentujące antygeny (ang. *Antigen Presenting Cells*, APC). Komórki Langerhansa, jako pierwsze mają kontakt z obcymi antygenami (alergenami) i prezentują je aktywując limfocyty pamięci Th2 w skórze atopowej, jednocześnie też migrują do węzłów chłonnych i pobudzają dziewicze limfocyty T. Pobudzony dziewiczy limfocyt T $CD4^+$ różnicuje się w funkcjonalne subpopulacje limfocytów pomocniczych (Th), które różnią się profilem wydzielanych cytokin. Czynnikiem warunkującym powstanie funkcjonalnej subpopulacji limfocytów T $CD4^+$ jest m.in. środowisko cytokinowe, w którym po raz pierwszy dziewiczy limfocyt T $CD4^+$ został zaktywowany. W reakcji alergicznej dziewicze limfocyty Th różnicują się w przeważającej liczbie do limfocytów Th2. Komórki te wydzielają interleukiny: IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13, co skutkuje aktywacją limfocytów B, które stymulowane są do produkcji przeciwciał IgE, które z kolei wiążą się ze swoistymi receptorami $Fc\epsilon RI$ na komórkach tucznych, bazofilach i eozynofilach; powodując degranulację tych komórek. Uwolnione mediatory (histamina, prostaglandyny, leukotrieny) przyczyniają się do rekrutacji komórek zapalnych do miejsca reakcji i wywołują charakterystyczny obraz alergicznej reakcji natychmiastowej. Faza ostra zależna od limfocytów Th2 prowadzi do fazy przewlekłej zależnej od limfocytów Th1. Aktywacja komórek Th1 powoduje wydzielanie cytokin: interferonu gamma

(IFN- γ), IL-2, IL-12 (Bieber 2008). U psów zazwyczaj stwierdza się jedynie początkową odpowiedź typu Th2 i trudno jest rozpoznać typową odpowiedź typu Th1, ale obserwuje się raczej mieszaną odpowiedź typu Th1-Th2 (Nuttall i wsp. 2002, Schlotter i wsp. 2011). Do niedawna w badaniach koncentrowano się na zaburzonej równowadze między komórkami Th1 i Th2. Obecnie zwraca się również uwagę na rolę stosunkowo niedawno wyodrębnionych innych fenotypów limfocytów, m.in. Th17 i Th22, które kontrolują miejscową reakcję zapalną, wydzielając prozapalne cytokiny i chemokiny. Heterogenną subpopulacją są limfocyty T regulatorowe (Treg), które dzięki właściwościom supresorowym kontrolują i hamują nadmierną odpowiedź immunologiczną. Osiągają to przez hamowanie proliferacji i/lub indukcję apoptozy autoreaktywnych limfocytów efektorowych. Odbywa się to przede wszystkim w sposób zależny od bezpośredniego kontaktu pomiędzy komórkami (oddziaływanie typu: komórka-komórka), choć również przez oddziaływanie cytokin np. IL-10 i transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β , ang. transforming growth factor-beta) oraz wiązanie IL-2 ze środowiska, dzięki obecności w błonie komórkowej receptora dla tej cytokiny (CD25). W konsekwencji usunięty jest czynnik stymulujący limfocyty T, zarówno pomocnicze, jak i cytotoksyczne. Choroby alergiczne są związane z niedoborem lub upośledzoną funkcją limfocytów Treg.

Wśród genów przedstawionych w pierwszej i trzeciej publikacji cyklu znalazły się takie, których zmiany w ekspresji opisano po raz pierwszy w odniesieniu do AZS oraz immunoterapii. Dalsze badania nad ich rolą w atopii mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podłoża tej choroby u psów, jak również wskazać użyteczność tych genów i ich produktów białkowych jako markerów diagnostycznych lub prognostycznych w przebiegu leczenia AZS.

W leczeniu AZS psów głównie stosuje się terapię objawową, podając leki przeciwzapalne i przeciwświądowe. Leczenie nie daje długotrwałych efektów, a przewlekłe stosowanie leków może również wywoływać skutki uboczne. Najlepszym sposobem leczenia jest unikanie alergenów, ale nie zawsze jest to możliwe np. przy uczuleniu na roztocza kurzu domowego. Jedyną metodą leczenia przyczynowego jest swoista immunoterapia alergenowa (SITA), która daje pozytywne efekty leczenia. U większości psów cierpiących na AZS choroba towarzyszy całe życie. Z tego względu potrzebne jest dokładniejsze poznanie mechanizmów nieprawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego na alergeny, a także zmian jakie zachodzą, po zastosowanej immunoterapii.

4.3 Wprowadzenie i cel naukowy

W przypadku atopowego zapalenia skóry u psów, większość informacji o mechanizmie rozwoju tej choroby pochodzi z badań prowadzonych nad AZS u ludzi. W ostatnich latach jest jednak coraz więcej publikacji dotyczących AZS u psów, w których opisywany jest udział różnych subpopulacji limfocytów, jak i wydzielanych przez nie cytokin w patogenezie tej choroby. Większość badań przeprowadzonych zostało na próbkach zmienionej i niezmienionej chorobowo skóry, co umożliwiało analizę miejsca bezpośrednio dotkniętego stanem zapalnym (Olivry i wsp. 1997, Sinke i wsp. 1997, Nuttall i wsp. 2002, Merryman-Simpson i wsp. 2008, Schotter i wsp. 2011, Plager i wsp. 2012, Schamber i wsp. 2014). Chociaż analiza próbek skóry od pacjentów z AZS stanowi najlepszy materiał do badań nad patogenезą tej choroby, to pobranie materiału do badań jest często trudne. W przypadku psów pobranie nawet niewielkiego fragmentu skóry za pomocą biopsji jest bolesne i pozwala na uzyskanie bardzo małej ilości materiału do badań, co uniemożliwia przeprowadzenie szerszego zakresu analiz z pojedynczej próbki. Z tego powodu w prezentowanym przeze mnie cyklu publikacji dotyczących AZS u psów, analizy zostały wykonywane na krwi obwodowej psów z AZS. Krew jest łatwiej dostępna, pobieranie jej jest mniej inwazyjne, a także mniej bolesne i stresujące dla pacjenta niż pobranie próbki skóry. Krew jako materiał badawczy stanowi cenne źródło informacji o stanie zdrowia pacjenta i daje obraz reakcji organizmu na alergen.

Cytokiny są zróżnicowaną grupą białek odpowiedzialnych za przesyłanie sygnałów między komórkami. Odgrywają główną rolę w rozwoju, różnicowaniu i funkcjonowaniu komórek immunologicznie kompetentnych (limfocytów, komórek tucznych, dendrytycznych i eozynofili), jak również immunologicznie niekompetentnych. Mediatorzy te biorą udział w reakcjach zapalnych, stymulacji odpowiedzi immunologicznej komórkowej i humoralnej, wyciszaniu i regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz uczestniczą w regulacji krwiotworzenia. Podczas zapalenia alergicznego uwalniane są do krwioobiegu cytokiny syntetyzowane przez leukocyty, przyczyniając się do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej w chorobach alergicznych. Ich oddziaływanie na komórki odbywa się poprzez wiązanie się ze swoistymi receptorami w błonie komórkowej, co prowadzi do włączenia wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania sygnałów. Większość cytokin aktywuje szlak przekazywania sygnału za pośrednictwem kinaz tyrozynowych JAK (Janus kinases), białek adaptorowych oraz czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT (signal transducers and activators of transcription), które tworzą dimery i przemieszczają się do jądra komórkowego i regulują ekspresję genów docelowych. Odpowiedź immunologiczna na alergen odbywa się na kilku poziomach: komórkowym, proteomicznym i

transkryptomicznym. Z tego względu w swojej pracy przeanalizowałam profil limfocytów krwi obwodowej, poziom cytokin w osoczu oraz profil transkryptomiczny komórek jądrzastych krwi obwodowej u psów z AZS i klinicznie zdrowych psów.

Celem prezentowanych badań było uzyskanie kompleksowego obrazu różnic na poziomie komórkowym, proteomicznym i transkryptomicznym w obwodowej krwi psów z AZS w porównaniu do zdrowych, jak również prześledzenie zmian tych parametrów w krwi po zastosowaniu swoistej immunoterapii alergenowej (SITA). Dodatkowo, w swoich badaniach podjęłam próbę znalezienia nowych potencjalnych markerów molekularnych dla AZS u psów. Cel ten realizowany był w kilku etapach, czego odzwierciedleniem jest cykl trzech publikacji tworzących moje osiągnięcie naukowe.

Szczegółowe cele:

- analiza profilu limfocytów krwi obwodowej, poziomu cytokin w osoczu oraz profilu transkryptomicznego jądrzastych komórek krwi obwodowej u psów z AZS i klinicznie zdrowych psów.
- określenie, czy i w jaki sposób swoista immunoterapia alergenowa zmienia proporcje subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej oraz poziom cytokin wydzielanych przez te komórki.
- analiza zmian ekspresji genów komórek jądrzastych krwi obwodowej obserwowanych u pacjentów z AZS poddanych swoistej immunoterapii alergenowej.

4.4. Materiały i metody

Ze względu na złożoność patogenezы atopowego zapalenia skóry u psów podjęto próbę zbadania mechanizmów tej choroby na poziomie klinicznym, immunologicznym i molekularnym. Psy do badań były kwalifikowane na podstawie rozpoznania klinicznego opartego na wywiadzie i badaniu klinicznym. Diagnoza oparta była na kryteriach Willemse'a i Prélud'a, uzupełnionych o następujące kryteria Favrota: świąd przy braku zmian skórnych (pruritus sine materia), tryb życia w pomieszczeniu i wykluczenie innych przyczyn świądu utrzymującego się od co najmniej roku. U wszystkich psów z przewlekłym świądem wykluczono inne jednostki chorobowe, tj.: pasożyty skórne (świerzbowca drążącego, nużeńca psiego, alergiczne pchle zapalenie skóry). Wykluczono również zapalenie skóry na tle bakteryjnym oraz wywołane przez drożdżaki rodzaju *Malassezia* spp. na podstawie negatywnych wyników w badaniach bakteriologicznych i mykologicznych. Wykluczono również alergię pokarmową stosując dietę eliminacyjną przez 6–8 tygodni. Rozpoznanie kliniczne atopowego zapalenia skóry potwierdzono serologicznymi testami alergicznymi (panelowy test alergiczny IDEXX) oraz testami śródskórnymi (zestaw testowy

Artuvetrin, Holandia). Co najmniej 3 tygodnie przed wykonaniem testu serologicznego i testu śródskórnego nie podawano leków przeciwwzapalnych. Psy zakwalifikowane do badań były różnych ras i były pacjentami Kliniki Małych Zwierząt, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe psy będące dawcami krwi Weterynaryjnego Banku Krwi im. Milusia (Góra Kalwaria).

Krew pobrana od 20 psów z AZS oraz 8 zdrowych psów była wykorzystana do analiz immunologicznych (z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz testów immunoenzymatycznych) i transkryptomicznych. Krew była pobierana jednorazowo przed wykonaniem testów śródskórnych i rozdzielana do poszczególnych analiz. Metodą cytometrii przepływowej identyfikowano subpopulacje limfocytów T oznaczając markery charakterystyczne dla określonych populacji limfocytów: CD3 (limfocyty T), CD4 (limfocyty T pomocnicze), CD3 i CD25 (aktywowane limfocyty T), CD8 (limfocyty cytotoksyczne), CD25 i Foxp3 (limfocyty T regulatorowe). Subpopulację limfocytów B identyfikowano używając komercyjnych przeciwciał LSM 11.425 firmy BD Biosciences, które swoście rozpoznają komórki pochodzące z węzłów chłonnych psów i używane są jako narzędzie prognostyczne w badaniach nad chłoniakami z limfocytów B u psów (oryginalny opis producenta brzmi: *PE-conjugated LSM 11.425 antibody generated against cells derived from canine peripheral lymph nodes and used as a prognostic tool in dog B cell lymphoma studies*). Stężenie cytokin (IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α TGF- β) w osoczu oznaczono stosując komercyjne testy immunoenzymatyczne - ELISA. Część transkryptomiczną wykonano przy użyciu mikromacierzy ekspresyjnych, których sondy obejmowały cały genom psa (44 000 sond).

Próbki krwi przeznaczone do analizy z użyciem mikromacierzy pobierane były do specjalnych probówek (RNeasy Protect Animal Blood Kit firmy Qiagene). RNA izolowano przy użyciu odczynników z zestawu do izolacji: RNeasy Protect Animal Blood Kit (Qiagen). W doświadczeniu użyto macierzy Canine (V2) Gene Expression Microarray, 4x44K (Agilent Technologies) oraz zestawu odczynników do przepisywania, znakowania i hybrydyzacji sond firmy Agilent Technologies.

Siedem psów z AZS poddano swoistej immunoterapii alergenowej. Krew do analizy od tych psów była pobrana przed terapią oraz po trzech i sześciu miesiącach stosowania terapii. Liczebność poszczególnych subpopulacji limfocytów oraz poziom cytokin w osoczu oznaczono w próbkach sprzed SITA (skrót w j. ang.: ASIT pochodzący od nazwy: *allergen-specific immunotherapy*), po trzech i sześciu miesiącach stosowania terapii, natomiast analizę transkryptomiczną przeprowadzono na próbkach pobranych przed zastosowaną immunoterapią i po sześciu miesiącach jej stosowania.

4.5 Przedstawianie uzyskanych wyników

Pierwsza publikacja z cyklu p.t. **“Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis”** obejmuje wyniki dotyczące analizy subpopulacji limfocytów, poziomu cytokin oraz ekspresji genów w komórkach jądrazstych krwi obwodowej psów z atopowym zapaleniem skóry, biorących udział w odpowiedzi immunologicznej na alergen.

Analiza cytometryczna wykazała, że procentowy udział limfocytów T ($CD3^+$) i B we krwi obwodowej u psów z AZS był istotnie niższy niż u zdrowych, odsetek limfocytów Th ($CD3^+CD4^+$) był podobny w obu grupach, natomiast procent limfocytów T cytotoksycznych (Tc: $CD3^+CD8^+$) był istotnie wyższy u psów z AZS w porównaniu ze zdrowymi. Większość wcześniej opublikowanych wyników innych grup badawczych wykazywało inną tendencję. U pacjentów z AZS zwiększał się odsetek limfocytów T zarówno Th ($CD3^+CD4^+$), jak i Tc ($CD3^+CD8^+$), jednak wyniki te dotyczyły przede wszystkim skóry atopowej. Wykazano, że w skórze atopowej zmienionej chorobowo odsetek limfocytów T zarówno $CD4^+$ jak i $CD8^+$ zwiększał się w porównaniu ze skórą zdrowych psów. Dominującym typem limfocytów T w naskórku były komórki $CD4^+$. W niezmienionej skórze atopowej również występował naciek limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$, ale nie obserwowano wyraźnej przewagi limfocytów T $CD4^+$. Limfocytów B było niewiele i wykrywano je jedynie w skórze zmienionej chorobowo (Olivry i wsp. 19997, Sinke i wsp. 1997).

Hennino i wsp. (2007, 2011) wykazali, że limfocyty T $CD8^+$ biorą udział w rozwoju zapalenia skóry w AZS zarówno u myszy, jak i u ludzi. Autorzy zaobserwowali, że do skóry eksponowanej na roztocza kurzu domowego (*Dermatophagoides farine*) jako pierwsze przed innymi subpopulacjami leukocytów naciekały limfocyty T $CD8^+$. Jest tylko kilka doniesień opisujących subpopulacje limfocytów we krwi obwodowej psów z AZS. Tarpataki i wsp. (2012) wykazali, że podwyższyła się wartość stosunku liczby limfocytów T $CD4^+$ do T $CD8^+$ u psów z AZS w porównaniu do psów zdrowych. Natomiast wyniki badań Taszkun (2013) oraz Verde i wsp. (2022) były porównywalne z wynikami uzyskanymi przez nasz zespół badawczy i opisywały niezmienny odsetek limfocytów T $CD4^+$ u psów z atopią w stosunku do psów zdrowych. Natomiast istotny wzrost odsetka limfocytów T $CD8^+$, spowodował zmniejszenie stosunku liczby limfocytów T $CD4^+$ do limfocytów T $CD8^+$ u psów z AZS. Dotychczas zwracano uwagę przede wszystkim na rolę limfocytów T $CD4^+$ w odpowiedzi na alergen. Istotnie statystycznie zwiększony odsetek limfocytów Tc ($CD8^+$) we krwi obwodowej psów z AZS wykazany w moich badaniach sugeruje, że limfocyty Tc również odgrywają ważną rolę w przebiegu AZS u psów.

W swojej pracy określiłam również procent limfocytów T regulatorowych (Treg), uznawanych za komórki, które biorą udział w utrzymaniu tolerancji na alergen, a w chorobach alergicznych ich aktywność jest zaburzona. Dzięki właściwościom supresorowym limfocyty Treg hamują aktywność, proliferację i/lub stymulują apoptozę limfocytów efektorowych. Populacja limfocytów Treg jest heterogenna pod względem obecności różnych markerów powierzchniowych i można ją podzielić na kilka subpopulacji. Naturalne regulatorowe limfocyty T powstają w grasicy w trakcie różnicowania i dojrzewania limfocytów T CD4⁺, są definiowane na podstawie obecności markerów CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ i wydzielania dużych ilości IL-10 i TGF-β. Na obwodzie dają początek innym subpopulacjom regulatorowych limfocytów T CD4⁺: m.in. indukowanym Treg (iTreg) powstającym w obecności IL-10 i IFN-α i syntetyzującym duże ilości IL-10 i umiarkowanie stężenie TGF-β lub niesyntetyzującym tej cytokiny. Inną różnicującą się subpopulacją są limfocyty Th3 powstające w obecności TGF-β i IL-4, biorące udział w tolerancji pokarmowej. Publikowane wyniki dotyczące limfocytów Treg w AZS zarówno u ludzi jak i psów są rozbieżne. Ou i wsp. (2004) wykazali dwukrotnie większą liczbę limfocytów Treg w krwi obwodowej pacjentów z AZS w porównaniu do osób zdrowych. Również Agrawal i wsp. (2011) stwierdzili zwiększoną liczbę komórek Treg w krwi chorych na AZS w porównaniu z osobami zdrowymi. Natomiast inni autorzy (Reefer i wsp. 2008, Szegedi i wsp. 2009 oraz Brandt i wsp. 2009) stwierdzili, że liczba limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) u pacjentów z AZS i zdrowych osób jest taka sama. Li i wsp. (2019) uważają, że sprzeczne wyniki wskazują na złożoną rolę limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ w inicjacji i rozwoju AZS oraz że komórki Treg mogą być zaangażowane w rozwój AZS tylko u niektórych pacjentów. Podwyższenie poziomu Treg w krwi obwodowej może być mechanizmem kompensującym ciężki stan zapalny u pacjentów z AZS (Samahy i wsp. 2015). Niektórzy autorzy widzą korelację między zwiększoną liczbą limfocytów Treg i ciężkim stanem choroby. Wyniki dotyczące liczebności limfocytów Treg w krwi obwodowej psów również nie są jednoznaczne. Keppel i wsp. (2008) oraz Herrmann i wsp. (2023) wykazali taką samą liczbę tych limfocytów Treg w krwi u psów z AZS i zdrowych. W prowadzonych przeze mnie badaniach stwierdziłam większy odsetek limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) we krwi psów z atopią w porównaniu ze zdrowymi. Podobne wyniki uzyskały inne zespoły badawcze (Beccati i wsp. 2016, Hauck i wsp. 2016). Jedna z hipotez zakłada, że na wyższy odsetek limfocytów Treg u psów z AZS może mieć wpływ przewlekły stan chorobowy. Mimo wyższego odsetka limfocytów Treg u psów z AZS, nie obserwuje się efektów ich działania, co może oznaczać, że nie spełniają swojej funkcji lub wykazują za słabą reakcję. Badania *in vitro* prowadzone na ludzkich limfocytach T wykazały, że limfocyty Treg pochodzące od dawców, którzy byli uczuleni na trawę nie hamowały proliferacji, jak również nie hamowały syntezy

cytokin przez limfocyty T CD4⁺CD25⁻ przy wysokich dawkach antygeny, podczas gdy limfocyty Treg od dawców nieatopowych zachowały swoje właściwości supresorowe (Bellinghausen i wsp. 2005). Agrawal i wsp. (2011) sugerują, że liczba limfocytów Treg u osób z AZS może się nie zmniejszać, ale ich działanie może być zaburzone. Wydaje się, że podobnie jest u psów z AZS, u których liczba limfocytów Treg jest podobna lub wyższa niż u psów zdrowych, a mimo to reakcja alergiczna nie jest zahamowana. Meau i wsp. (2022) oraz Pelly i wsp. (2017) sugerują, że dysfunkcja limfocytów Treg może być związana z ich skłonnością do różnicowania się w efektorowe limfocyty Th pod wpływem cytokin wykazujących nadekspresję (m.in. IL-4) u pacjentów z AZS. W konsekwencji limfocyty Treg tracą swoje właściwości supresorowe i nabywają fenotyp podobny do limfocytów Th2 (z ang. Th2-like Tregs). Powyższe dane wskazują, że u osób i psów zdrowych limfocyty Treg aktywnie kontrolują odpowiedź na alergen, natomiast występowanie chorób alergicznych wiąże się między innymi z upośledzeniem ich funkcji i osłabieniem zdolności regulacyjnych.

Z zaburzoną proporcją limfocytów T poszczególnych subpopulacji wiąże się również zbyt wysokie bądź zbyt niskie stężenie cytokin wydzielanych przez te komórki. Cytokiny, będące białkami aktywującymi wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, odgrywają główną rolę w rozwoju, różnicowaniu i funkcjonowaniu limfocytów, komórek tucznych, dendrytycznych i eozynofili, które biorą udział w odpowiedzi immunologicznej. W prezentowanych przeze mnie badaniach oznaczyłam stężenie kilku cytokin: IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, INF- γ , TGF- β , TNF- α w osoczu psów chorych na AZS i zdrowych. Wybrane cytokiny odrywają rolę w odpowiedzi immunologicznej na alergen i są wydzielane przez określone populacje komórek. Poznanie zmiany stężenia tych białek w osoczu psów chorych, może wskazać na większą bądź mniejszą aktywność poszczególnych subpopulacji limfocytów. W nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej na alergen zwraca się uwagę na dysproporcję w liczbie limfocytów Th1 i Th2. W początkowej, ostrej fazie AZS limfocyty Th2 i eozynofile stanowią dominujące subpopulacje leukocytów, co ma związek ze wzmożoną syntezą i wydzielaniem interleukin: IL-4, IL-5, IL-13. W przewlekłym przebiegu AZS następuje zwrot w kierunku komórek Th1 wydzielających IFN- γ i IL-12, a także IL-2. W niektórych badaniach wykazano, że faza przewlekła charakteryzuje się nie tylko obecnością komórek Th1, ale mieszanym profilem Th1 i Th2 (Nuttall i wsp. 2002, Schlotter i wsp. 2011). Wynika to z dynamicznego charakteru tego procesu.

Na podstawie prezentowanych przeze mnie badań trudno jest jednoznacznie określić fazę odpowiedzi immunologicznej. Profil stężenia cytokin w osoczu częściowo wskazuje na dominację subpopulacji limfocytów Th2, jednak interpretacja nie jest oczywista. Stwierdziłam istotnie wyższy poziom IL-13 i niezmienny poziom IL-4 w osoczu u psów z AZS w porównaniu z

osobnikami zdrowymi. Podobne wyniki przedstawił Schlotter i wsp. (2011), którzy wykazali wzrost ekspresji genu *IL13* w skórze zmienionej i niezmienionej chorobowo u psów z AZS względem skóry psów zdrowych, natomiast taką samą ekspresję genu *IL4* zarówno w skórze psów z AZS jaki i zdrowych. Wyższą ekspresję genu *IL13* odnotowano w skórze psów ekspozowanych na alergen roztoczy kurzu domowego (house dust mites- HDM) przez 24 i 48 godzin, natomiast ekspresja genów innych interleukin wydzielanych przez komórki Th2, w tym *IL4* była niska i nie zmieniała się istotnie w czasie (Marsella i wsp. 2006). Ponadto, u ludzi po ekspozycji na alergen HDM wydzielanie IL-13 do krwi obwodowej również następowało wcześniej i znacznie dłużej niż w przypadku IL-4 (Wakugawa i wsp.2001, La Grutta i wsp. 2005). Wyniki uzyskane w moich badaniach, jaki i powyżej cytowane sugerują, że IL-13 odgrywa ważną rolę w nieprawidłowej odpowiedzi układu immunologicznego na alergen, być może większą niż IL-4, której rola dotychczas uważana była za wiodącą.

IFN- γ jest cytokiną aktywującą m.in. limfocyty Th. Wzrost stężenia IFN- γ świadczy o zwiększonej liczbie i aktywności komórek Th1. W moich badaniach IFN- γ był wykrywalny tylko u dwóch psów chorych i dwóch psów zdrowych. Przypuszczalnie poziom IFN- γ w osoczu może być cechą osobniczą. Po zastosowanej immunoterapii IFN- γ wykryto również tylko u dwóch psów, tych samych, co przed terapią. Podobne wyniki uzyskał zespół Hayashiya i wsp. (2002), którzy stwierdził ekspresję genu *IFNG* we krwi dziewięciu z dziesięciu psów zdrowych - kontrolnych i dwóch z ośmiu psów z AZS. Średnio poziom transkryptu *IFNG* był niższy u psów z AZS niż u kontrolnych. Wytwarzanie IFN- γ może być związane ze stopniem zaawansowania zmian skórnych oraz rodzajem badanej tkanki lub może być wydzielany miejscowo i nie osiągać wykrywalnego poziomu w krwi obwodowej.

W swoich badaniach wykazałam istotnie wyższe stężenie czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α -ang. tumor necrosis factor α) w osoczu psów z AZS w porównaniu ze zdrowymi zwierzętami. Podobną tendencję opisali Nuttalla i wsp. (2002), pokazując wyższą ekspresję genu *TNFA* w zmienionej chorobowo skórze psów z AZS w porównaniu z nieuszkodzoną i zdrową tkanką kontrolną. Wynik ten wydaje się być bezpośrednio związany ze stanem atopowego zapalenia u badanych psów. TNF- α jest cytokiną prozapalną, wywierającą działanie pleiotropowe na różne typy komórek i odgrywającą kluczową rolę w patogenezie przewlekłych chorób zapalnych (Bradle 2008). U pacjentów podatnych na alergię obserwuje się nadmierne wydzielanie tej cytokiny. Istnieje wiele potencjalnych źródeł TNF- α : makrofagi, limfocyty T, komórki tuczne, eozynofile i neutrofile (Stanley i Lacy 2010). W chorobie atopowej TNF- α jest rozpoznawany jako cytokina należąca do profilu limfocytów Th1. Jej wyższe stężenie może być również związane z wyższym odsetkiem limfocytów Tc u psów z AZS, co wykazałam w moich badaniach.

TNF- α jest nieswoistym mediatorem prozapalnym, indukującym podwyższenie poziomu cząsteczek adhezyjnych w błonie cytoplazmatycznej komórek i wydzielanie eotaksyn wpływających na rekrutację eozynofili, neutrofilów i monocytów do miejsc zapalenia. Niektóre badania wykazały, że TNF- α upośledza aktywność regulacyjną naturalnych limfocytów Treg poprzez szlak sygnałowy receptora TNF- α 2 (TNFR2), wpływając również na obniżenie poziomu czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (ang. forkhead box P3) (Lin i wsp. 2008). Inne doniesienia wskazują, że ekspresja receptora TNFR2 ulega podwyższeniu w subpopulacji limfocytów Treg o lepszych zdolnościach supresyjnych. Ponadto wykazano na modelu mysim, że TNFR2 stabilizuje fenotyp i funkcję komórek Treg, nawet w środowisku silnie zapalnym, które wpływa destabilizująco na obecność Foxp3 w komórkach Treg (Chen i wsp. 2013). Inne badania wykazały, że TNF- α hamuje funkcję komórek Treg u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, wpływając na obniżenie poziomu Foxp3 (Valencia i wsp. 2006), oraz aktywuje kanoniczny szlak sygnałowy NF- κ B, zaburzając tym funkcje supresorowe limfocytów Treg, pomimo że poziom Foxp3 nie zmienia się i jest stabilny (Nagar i wsp. 2010). Być może podwyższone stężenie TNF- α w prezentowanych przeze mnie badaniach wpływa negatywnie na aktywność i właściwości supresyjne limfocytów Treg u psów z AZS.

Pomimo tego że u psów z AZS było więcej limfocytów Treg, to stwierdziłam niższe stężenie IL-10 i TGF- β (w tym przypadku nie była to różnica statystycznie istotna), czyli cytokin wydzielanych przez te komórki. Obu cytokinom przypisuje się działanie immunosupresyjne, przeciwzapalne. Ich zadaniem jest kontrolowanie lub wyciszenie aktywności limfocytów T, a w atopowym zapaleniu skóry tłumienie przede wszystkim odpowiedzi limfocytów Th2 (Agrawal i wsp. 2011). IL-10 jest syntetyzowana przez limfocyty Treg, ale również przez limfocyty Th2, B, monocyty/makrofagi, komórki dendrytyczne i tuczne. IL-10 hamuje wytwarzanie cytokin prozapalnych i błonowych receptorów tych cytokin. Jest także silnym supresorem przeciwciał IgE swoistych dla alergenu, jednocześnie indukuje wytwarzanie IgG4 przez limfocyty B. Większość badań dotyczących AZS u psów nie wykazuje różnicy w stężeniu IL-10 w osoczu psów z AZS w porównaniu ze zdrowymi (Keppel i wsp. 2008, Martini i wsp. 2021, Mazrier i wsp. 2021). Nie stwierdzono również różnicy w ilości transkryptów genu *IL-10* w skórze psów ze zmianami i niezmienionej chorobowo (Nuttall i wsp. 2002), jak również we krwi obwodowej psów (Hayashiya i wsp. 2002). Natomiast Koury i wsp. (2019) wykazali istotne obniżenie stężenia IL-10 w surowicy psów z AZS, a Maeda i wsp. (2007) zaobserwowali obniżoną ekspresję genu *IL10* we krwi psów z AZS podczas prowokacji alergenem. Otrzymane wyniki moich badań wpisują się w tę tendencję. Stężenie IL-10 w osoczu psów z AZS było istotnie niższe w porównaniu do zdrowych psów.

TGF- β 1 jest wydzielany przez limfocyty Treg i podobnie jak IL-2 wpływa na różnicowanie dziewiczych obwodowych limfocytów T w limfocyty iTreg poprzez indukcję ekspresji genu *FOXP3*. TGF- β 1 odgrywa ważną rolę regulatorową w kontroli przeżywalności, proliferacji, różnicowania i rozwoju limfocytów T i B, komórek dendrytycznych i makrofagów, syntezy cytokin, a także produkcji przeciwciał przez limfocyty B. Niemniej jednak rola TGF- β 1 w AZS nie została w pełni poznana, a opublikowane dotychczas wyniki często są sprzeczne. Schlotter i wsp. (2011) nie zaobserwowali żadnej różnicy w ekspresji genu *TGFB1* w skórze psów z AZS zmienionej i niezmienionej chorobowo. Natomiast Nuttall i wsp. (2002) wykazali niższy poziom *TGFB1* w skórze zmienionej i niezmienionej chorobowo u psów z AZS w porównaniu z tkanką kontrolną. We krwi psów z AZS ekspozowanych na alergen poziom mRNA *TGFB1* obniżył się po czterech dniach. Wyniki uzyskane w moich badaniach wskazują, że pomimo wyższego odsetka limfocytów Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) w krwi obwodowej u psów z AZS, stężenie wydzielanych cytokin przeciwzapalnych przez te komórki było niższe niż u psów zdrowych i niewystarczające, aby chronić organizm przed patologiczną odpowiedzią immunologiczną na alergeny. Wyniki te prawdopodobnie wskazują na zaburzenie funkcji limfocytów Treg u psów z AZS.

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie ekspresji genów w komórkach jądrzastych krwi obwodowej u psów z AZS i zdrowych psów z wykorzystaniem mikromacierzy. Przeprowadzona analiza nie wykazała zmian w ekspresji genów kodujących cytokiny odgrywające kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej u psów z AZS. Natomiast geny, których ekspresja uległa zmianie były bezpośrednio, lub pośrednio powiązane z regulacją różnicowania i proliferacji subpopulacji limfocytów T (Treg, Th1, Th2) oraz z syntezą i wydzielaniem badanych cytokin. Produkty białkowe wielu z tych genów pełnią funkcje aktywatorów lub inhibitorów transkrypcji genów docelowych (np. cytokin), lub pośredniczą w przekazywaniu sygnałów w szlakach komórkowych.

Jednym z genów regulowanych u psów z AZS był gen *VEGFA* - kodujący czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor) izoforma A. VEGF jest czynnikiem wzrostu zwiększającym przepuszczalność naczyń krwionośnych i proliferację komórek śródbłónka. Aktywność tego białka jest 50 000 razy większa od histaminy (Koczy-Baron i Kasperska- Zajac 2014). VEGF jest wymieniany również jako cytokina prozapalna, odgrywająca rolę w patogenezie AZS. Mediator ten jest zaangażowany w regulację rozwoju zmian chorobowych. Zwiększając przepuszczalności naczyń ułatwia tworzenie obrzęku i przechodzenie komórek z krwiobiegu do miejsc toczącego się zapalenia. Jest też czynnikiem inicjującym powstanie odczynu zapalnego, uczestniczy w ostrych i przewlekłych procesach zapalnych. Bierze również udział w angiogenezie i przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. W badaniach na myszach i ludziach wykazano wyższą ekspresję *VEGFA* w skórze chorych na AZS, jak również

wyższe stężenia białka VEGF-A zarówno w skórze jak i w surowicy chorych na AZS w porównaniu do zdrowych kontroli (Zhang i wsp. 2006, Chen i wsp. 2008, Amarbayasgalan i wsp. 2012, Koczy-Baron i wsp. 2012, Varricchi i wsp. 2015, Samochocki i wsp. 2016). W prezentowanych przeze mnie badaniach tendencja była inna, ekspresja *VEGFA* była niższa w komórkach jądrazstych krwi obwodowej pacjentów z AZS w porównaniu do psów zdrowych. Badania Cobiella i wsp. (2020) pokazały, że stężenie VEGFA było niewykrywalne w surowicy zarówno u psów z AZS jak i zdrowych, natomiast w warstwie rogowej naskórka było na tym samym poziomie u psów z AZS jaki i zdrowych. Uzyskane wyniki badań własnych oraz innych zespołów wskazują, że zmiany stężenia VEGF u psów z AZS wykazują inną tendencję niż u ludzi myszy.

Synteza VEGF jest stymulowana przez szlak sygnałowy indukowany przez TGF- β 1, w którym białka Smad2 i Smad3 ulegają aktywacji i tworzą heterokompleksy z Smad4 (Lan i wsp. 2011). Kompleks białek SMAD jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie łączy się z określonymi sekwencjami nukleotydów i aktywuje transkrypcję genów docelowych (Chen i wsp. 2003, Nakamura i wsp. 2004, Wahl i wsp. 2004). Analiza mikromacierzy wykazała niższą ekspresję *SMAD2* (ang. *SMAD family member 2*) u pacjentów z AZS. Wydaje się, że obniżona ekspresja *SMAD2* przyczyniła się do obniżonej ekspresji *VEGFA* u psów z AZS, co łączy się również z obniżonym stężeniem TGF- β 1 w osoczu psów z AZS. Wyniki te są zgodne z badaniami wykazującymi bezpośredni związek między ekspresją VEGF, a indukowaną przez TGF- β 1 sygnalizacją Smad2 (Aki i wsp. 2015).

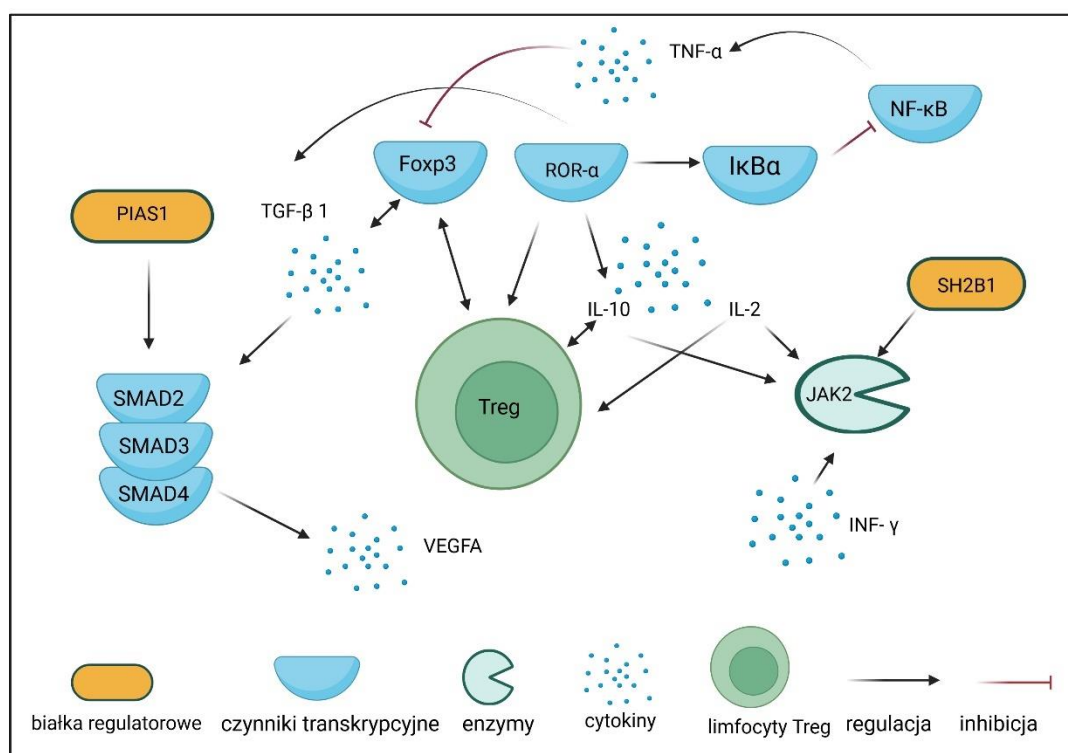
PIAS1 (ang. *protein inhibitor of activated STAT*) to kolejny gen, którego produkt białkowy jest bezpośrednio zaangażowany w regulację aktywności transkrypcyjnej *SMAD2*. Wykazano, że białko PIAS1 moduluje aktywację kompleksu Smad2/4 i dodatkowo promuje hamowanie proliferacji, w którym pośredniczy Smad2/4 (Yang i wsp. 2013). Zatem obniżenie ekspresji *SMAD2* obserwowane u pacjentów z AZS w przedstawionych przeze mnie badaniach może być również związane z obniżeniem ekspresji genu *PIAS1*.

Kolejny gen, którego ekspresja była obniżona u psów z AZS to *RORA* (retinoid-related orphan receptor α). Badania pokazują, że białka należące do rodziny receptorów sierocych związanych z retinoidami (ROR, ang. retinoid-related orphan receptor) uczestniczą w regulacji różnicowania wielu typów komórek układu immunologicznego m.in. Treg, Th17 (Słominski i wsp. 2014). Białka z rodziny ROR regulują transkrypcję genów poprzez wiązanie się w jądrze komórkowym z określonymi odcinkami DNA, zwanymi elementami odpowiedzi w rejonie promotorowym genów docelowych (RORES - ROR response elements) (Jetten i wsp. 2009). Receptory ROR mogą działać zarówno jako represory, jak i aktywatory transkrypcji genów,

oddziałujące z korepresorami, jak i koaktywatorami transkrypcji. ROR α negatywnie reguluje odpowiedź zapalną poprzez zakłócanie szlaku sygnałowego NF- κ B i jest jednym z czynników transkrypcyjnych aktywujących ekspresję genu I κ B α , głównego inhibitora aktywności NF- κ B. Ponieważ synteza TNF- α jest indukowana przez szlak sygnałowy NF- κ B, ROR α przyczynia się do osłabienia odpowiedzi zapalnej wywoływanej przez TNF- α (Delerive i wsp. 2001). Wyniki prowadzonych przeze mnie badań wykazały obniżoną ekspresję genu *RORA* u psów z AZS, a stężenie TNF- α w osoczu było istotnie wyższe u chorych psów, co sprzyjało utrzymywaniu się stanu zapalnego. ROR α jest regulatorem genów w limfocytach Treg odpowiedzialnych za tłumienie alergicznego zapalenia skóry. Delacja genu *RORA* u myszy nie wpłynęła na liczbę limfocytów Treg w skórze, natomiast negatywnie wpłynęła na ich właściwości supresyjne, czego efektem było nasilenie alergicznego zapalenia skóry typu drugiego podczas uczulania. Wyniki te sugerują, że obecność białka ROR α zapobiega konwersji limfocytów Treg w efektorowe limfocyty T wydzielające IL-4 (Malhotra i wsp. 2018). Wykazano wyższą ekspresję genu *RORA* w limfocytach Treg znajdujących się w ludzkiej skórze niż we krwi. Białko ROR α bierze udział w aktywacji promotora genu *IL-10*, w limfocytach Tr1 (Farez i wsp. 2016). Prezentowane przeze mnie wyniki wydają się być spójne z innymi badaniami. W swoich badaniach wykazałam obniżenie zarówno stężenia IL-10 w surowicy, jak i obniżenia ekspresji genu *RORA* u psów z AZS w porównaniu ze zdrowymi. Wyższy odsetek limfocytów Treg i niższa ekspresja *RORA* u psów z AZS sugeruje dysfunkcję limfocytów Treg.

Spośród badanych cytokin IL-2, IL-10 i INF- γ wykazywały niższe stężenie w osoczu krwi psów z AZS niż u zwierząt zdrowych. Cytokiny te działają poprzez wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy JAK/STAT, w którym białko adaptorowe SH2B1 (SH2B adaptor protein 1) (białko zawierające domenę SH2) odgrywa rolę silnego aktywatora kinazy JAK2 (Rui i wsp. 1999). Obniżenie ekspresji genu *SH2B1* u badanych przeze mnie psów z AZS może być związane z obniżonym poziomem cytokin, które pełnią rolę ligandów aktywujących szlak sygnałowy JAK/STAT w komórkach odpornościowych krwi obwodowej.

Podsumowując wyniki pierwszej publikacji poniżej zamieściłam wykres, który przedstawia potencjalne bezpośrednie i pośrednie interakcje pomiędzy białkami kodowanymi przez geny, które wykazują zmienioną ekspresję u psów z AZS oraz cytokinami, których stężenie również sprawdzałam w tym eksperymencie.



Druga publikacja z cyklu p.t. „**Cytokine and Lymphocyte Profiles in Dogs with Atopic Dermatitis after Allergen-Specific Immunotherapy**” obejmuje wyniki dotyczące wpływu swoistej immunoterapii alergenowej (SITA) na profil cytokin i limfocytów w krwi obwodowej psów z AZS.

Najlepszym sposobem leczenia AZS jest unikanie alergenów. Niestety w większości przypadków jest to niemożliwe, dlatego konieczne jest leczenie objawowe. U ciężko chorych psów terapia reaktywna obejmuje miejscowe i/lub doustne podawanie glikokortykosteroidów, cyclosporyny, oklacytynibu i lokivetmabu ze względu na ich skuteczność kliniczną oraz wysoki wskaźnik powodzenia, wynoszący 70–80% (Olivry i wsp. 2010, Gedon i Müller, 2018). Warto pamiętać, że leki te mogą powodować działania niepożądane. Według Olivry i Banovic (2019), gdy u pacjenta przez kilka tygodni nie występują objawy kliniczne, należy przejść do drugiej fazy leczenia AZS – terapii proaktywnej, której celem jest zapobieganie nawrotom choroby lub ich opóźnienie. W drugiej fazie można zastosować swoistą immunoterapię alergenową (SITA). U około 50–75% zwierząt cierpiących na AZS stosowanie SITA jest skuteczne (Gedon i Müller 2018, Fischer i Müller 2019). Podstawowym celem swoistej immunoterapii alergenowej jest zmniejszenie objawów wywołanych przez alergeny i zapobieganie nawrotowi choroby w dłuższej perspektywie. Obecnie jest to jedyny sposób leczenia modyfikujący przebieg choroby alergicznej (Moote i wsp. 2010, Frew 2010).

Znacznie więcej wiadomo o mechanizmie działania SITA u ludzi niż u psów. Zmiany zachodzące w układzie immunologicznym pod wpływem SITA są złożone i nadal nie do końca poznane. Skuteczna immunoterapia u ludzi powoduje przejście od odpowiedzi immunologicznej Th2-zależnej do Th1-zależnej (Moote i wsp. 2010). Celem SITA jest indukcja tolerancji obwodowych limfocytów T na alergeny, modulowanie progów aktywacji komórek tucznych i bazofilów oraz zmniejszenie uwalniania histaminy (Akdis i Akdis 2011). Tolerancja obwodowa jest związana z indukcją alergenowo-swoistych limfocytów T regulatorowych. Limfocyty Treg działają wielokierunkowo, wydzielając cytokiny przeciwzapalne IL-10 i TGF- β , a także poprzez obecność w błonie cytoplazmatycznej cząsteczek odpowiedzialnych za wyhamowanie aktywności komórek docelowych, np. cytotoksyczny antygen limfocytów T4 (CTLA-4), ligand markerów CD80 i CD86 obecnych w błonie cytoplazmatycznej APC oraz białko programowanej śmierci komórki -1 (PD-1, ang. programmed cell death protein -1). Limfocyty Treg hamują również proliferację limfocytów T swoistych dla alergenu i wydzielanie cytokin, bezpośrednio lub pośrednio zmniejszając aktywność i degranulację komórek efektorowych, takich jak komórki tuczne, bazofile i eozynofile (Sirvent i wsp. 2016, Van de Veen i wsp. 2017). Mechanizm odpowiedzi na SITA u psów nie był badany tak szeroko jak u ludzi. Istnieje niewiele danych dotyczących zmian w odpowiedzi komórkowej u psów poddawanych immunoterapii. Dlatego celem badań było określenie, w jaki sposób immunoterapia zmienia proporcję subpopulacji limfocytów we krwi obwodowej oraz poziom cytokin wydzielanych przez te komórki.

Analizując otrzymane wyniki stwierdziłam, że swoista immunoterapia alergenowa zmieniała liczbę limfocytów poszczególnych subpopulacji oraz stężenie wydzielanych przez te komórki cytokin we krwi obwodowej psów chorych na AZS. Wyniki nie pozwoliły jednak na zaobserwowanie wyraźnego kierunku zmian. Przed zastosowaną terapią średni odsetek limfocytów Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) u pacjentów z AZS był wyższy w porównaniu do zdrowych psów. Po trzech miesiącach terapii odsetek limfocytów Treg istotnie spadł, a po 6 miesiącach ponownie znacząco wzrósł (z wyjątkiem jednego pacjenta). Zmiany odsetka limfocytów Treg podczas terapii u poszczególnych pacjentów różniły się. U dwóch pacjentów odsetek limfocytów Treg wzrósł po 6 miesiącach SITA w porównaniu do stanu przed leczeniem. Trudno jest wyjaśnić, dlaczego odsetek limfocytów Treg u wszystkich psów spadł po 3 miesiącach stosowania SITA, a następnie po 6 miesiącach znów wzrósł. Być może liczba limfocytów Treg zależała od stężenia podawanych alergenów. Na początku terapii podawano mniejsze dawki alergenów, i stopniowo je zwiększano, a od 12 tygodnia terapii dawkę zwiększano do najwyższej. Prawdopodobnie dłuższy czas (ponad 6 miesięcy) podawania wysokiej dawki alergenów spowodowałby zwiększenie liczby limfocytów Treg. Badanie Santosa i wsp. (2019) dotyczące

narażenia pszczelarzy na jad błonkoskrzydłych wykazało, że poziom Foxp3 w limfocytach Treg krwi obwodowej wzrastał podczas ekspozycji na dużą dawkę alergenu (w tym przypadku jadu pszczelego) i był istotnie wyższy w sezonie pszczelarskim w porównaniu do okresu zimowego. Natomiast Keppel i wsp. (2008) wykazali, że liczba limfocytów Treg we krwi obwodowej chorych psów na AZS i zdrowych była taka sama, a zwiększała się od trzeciego miesiąca stosowania SITA. Dane te nie są całkiem porównywalne z wynikami moich badań, ze względu na fakt, że Keppel i wsp. (2008) zdefiniowali populację limfocytów Treg jako CD4⁺Foxp3⁺, a ja w swoich badaniach populację limfocytów Treg zdefiniowałam na podstawie ekspresji CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Tendencja zmiany odsetka limfocytów B była odwrotna - w moich badaniach po trzech miesiącach immunoterapii zaobserwowałam mniejszy odsetek limfocytów B. Ponadto, stężenie TGF-β w osoczu było najwyższe u psów z AZS przed leczeniem, w porównaniu do poziomu uzyskanego po 3 i 6 miesiącach terapii, ale nie różniło się istotnie od stężenia u psów zdrowych. Jednakże, analizując wyniki poszczególnych pacjentów, w dwóch przypadkach zaobserwowałam wzrost poziomu tej cytokiny po 6 miesiącach terapii w porównaniu do stanu przed terapią. Choć w badaniu Martini i wsp. (2022) nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu TGF-β w osoczu u psów z AZS podczas stosowania SITA, to można zauważyć tendencję do zmniejszania się stężenia tej cytokiny w trakcie terapii. SITA natomiast nie wpłynęła na średnie stężenie IL-10 w osoczu u pacjentów z AZS w trakcie leczenia. Również Martini i wsp. (2022) nie wykazali zmian w poziomie IL-10 w osoczu po 3, 6 i 12 miesiącach stosowania immunoterapii. Analizując wyniki poszczególnych pacjentów w prezentowanych przeze mnie badaniach, można zauważyć, że u trzech psów poziom IL-10 wzrósł po 6 miesiącach leczenia w porównaniu do stanu przed terapią. Są to dosyć zaskakujące wyniki, wydawało się bowiem, że pod wpływem immunoterapii liczba limfocytów Treg powinna się zwiększyć, a wraz z nimi stężenie wydzielanych przez nie cytokin IL-10 i TGF-β1.

Skuteczność kliniczna immunoterapii wynika z przywrócenia tolerancji obwodowej na swoisty alergen, przez osłabienie funkcji alergenowo-specyficznych limfocytów Th2 i wzmocnienie funkcji limfocytów Th1. Tendencję tę można częściowo zaobserwować w moich badaniach. Spadek poziomu IL-13 w osoczu podczas terapii sugeruje zmniejszenie aktywności Th2. Zaskakujące jest jednak to, że u czterech pacjentów poziom IL-4 (interleukiny wydzielanej także przez komórki Th2) wzrósł po 6 miesiącach SITA. Co ciekawe, poziom IL-13 u tych pacjentów obniżył się. Poziom IL-4 był porównywalny u psów kontrolnych i pacjentów z AZS przed SITA. Aktywność komórek Th1 jest jeszcze trudniejsza do określenia. IFN-γ wykryto tylko u dwóch psów z AZS i u dwóch psów kontrolnych. U jednego pacjenta w trakcie terapii poziom tej cytokiny wzrósł, a u drugiego obniżył się. Shida i wsp. (2004) stwierdzili, że poziomy mRNA

IFNG i *IL4* były niższe u psów z AZS w porównaniu ze zdrowymi psami kontrolnymi, a po immunoterapii poziom *IFNG* był istotnie wyższy niż wcześniej, podczas gdy poziom mRNA *IL4* nie uległ zmianie. W przypadku IL-2 po 6 miesiącach SITA u wszystkich psów zaobserwowano wzrost poziomu tej cytokiny w porównaniu do poziomu przed terapią i jednocześnie większy odsetek aktywowanych limfocytów T ($CD3^+CD25^+$), co wskazuje na zwiększony poziom łańcucha α receptora IL-2 (CD25). Warto zauważyć, że u trzech pacjentów z AZS stężenie IL-2 było niewykrywalne przed terapią. Wyniki te wydają się potwierdzać korzystny wpływ immunoterapii. IL-2 jest wydzielana przez aktywowane komórki T $CD4^+$ subpopulacji Th1 (Létourneau i wsp. 2009). Należy podkreślić, że szlaki sygnałowe indukowane za pośrednictwem IL-2 są niezbędne do rozwoju i przeżycia limfocytów Treg, bezpośrednio regulując funkcje czynnika transkrypcyjnego Foxp3 w ludzkich i mysich limfocytach Treg (Almeida i wsp. 2001, Curotto de Lafaille i wsp. 2004, Zorn i wsp. 2006). Dodatkowo, w trakcie immunoterapii obniżył się poziom cytokiny prozapalnej TNF- α w porównaniu do stężenia stwierdzanego u chorych psów na AZS przed terapią. TNF- α jest wydzielany na wczesnym etapie uczulenia na alergen, a następnie w fazie efektorowej reakcji alergicznej nadal pobudza kaskadę zapalną. Ma zdolność polaryzacji odpowiedzi w kierunku Th2 (Choi i wsp. 2012, Ahmad i wsp. 2018). Co więcej, znacząco najwyższy odsetek limfocytów Tc ($CD8^+$) zaobserwowano u pacjentów z AZS przed stosowaniem SITA. Terapia spowodowała zmniejszenie liczby limfocytów Tc do wartości podobnej dla zdrowych psów. Hemino i wsp. (2007, 2011) stwierdzili, że limfocyty T $CD8^+$ biorą udział w inicjacji stanu zapalnego w skórze u myszy, jak i u ludzi z AZS. Obserwowane w moich badaniach obniżenie poziomu TNF- α i zmniejszenie liczby limfocytów Tc ($CD8^+$) wydaje się potwierdzać korzystny efekt zastosowanej terapii SITA.

Trzecia publikacja włączona do prezentowanego cyklu p.t. **“Effect of Allergen-Specific Immunotherapy on Transcriptomic Changes in Canine Atopic Dermatitis”** jest kontynuacją badań opisanych w drugiej publikacji.

Prezentowane badania dotyczą tych samych psów chorych na AZS, co opisywane w poprzedniej publikacji, poddanych swoistej immunoterapii alergenowej (SITA). Krew do badań była pobierana w tym samym momencie co do analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i przeprowadzenia testów serologicznych. Przedmiotem mojego zainteresowania były komórki jądrowe krwi obwodowej, jako źródło informacji o zmianach ekspresji genów pod wpływem SITA u psów z AZS.

Analiza statystyczna otrzymanych danych wykazała 521 transkryptów o zmienionej ekspresji, spośród których 241 reprezentowało geny o dobrze opisanych funkcjach. W publikacji opisałam dziewięć genów: *RARRES2*, *DPP10*, *SLPI*, *PLSCR4*, *MMP9*, *NTSR1*, *CBD103*, *DEFB122* i *IL36G*, których ekspresja zmieniła się pod wpływem zastosowanej immunoterapii i które wydają się istotne w kontekście zmian zachodzących w odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z AZS pod wpływem zastosowanej terapii. Analizując dane otrzymane przy użyciu mikromacierzy ekspresyjnych, porównywałam wyniki uzyskane od psów zdrowych (grupa kontrolna) oraz psów z AZS przed stosowaniem SITA i po 6 miesiącach stosowania immunoterapii. Geny te nie były wcześniej opisywane w literaturze jako markery atopowego zapalenia skóry, ale ich funkcje wydają się być bezpośrednio lub pośrednio powiązane z występowaniem AZS.

Pierwszy gen, na który zwróciłam uwagę to *RARRES2* (ang. *retinoid acid receptor responder protein 2*), znany również jako *TIG-2* (ang. *tazarotene-induced gene-2*). *RARRES2* wykazywał istotnie niższą ekspresję u psów z AZS w porównaniu do zdrowych psów, a także niższą ekspresję u psów po 6 miesiącach stosowania SITA. Gen ten koduje pre-prochemerynę, która w procesie obróbki potranslacyjnej przekształcana jest w aktywną formę białka o nazwie chemeryna. Chemeryna zaliczana jest do chemokin odgrywających istotną rolę zarówno we wrodzonej, jak i nabytej odporności komórkowej. Wiążąc się z receptorami powoduje chemotaksję komórek immunologicznie kompetentnych, głównie makrofagów i komórek dendrytycznych (Zheng i wsp. 2008, Zhao i wsp. 2014). *RARRES2* należy do grupy docelowych genów odpowiedzi na retinoidy. Niektóre dermatozy, w tym AZS (nadwrażliwość typu I) i łuszczyca (choroba autoimmunologiczna), są chorobami związanymi ze zmianami w szlakach sygnałowych pośredniczonych przez retinoidy (Saurat i wsp. 1999, Mihály i wsp. 2011). Mihály i wsp. (2011) wykazali, że u pacjentów z AZS stężenie kwasu all-trans-retinowego (ATRA) było niższe zarówno w skórze ze zmianami, jak i bez zmian. Ekspresja genu *RARRES2* była obniżona w skórze z AZS w porównaniu ze skórą zdrowych osób (Zheng i wsp. 2008). Choć nie ma dostępnych danych na temat zmian w ekspresji *RARRES2* w komórkach krwi obwodowej, czy molekularnego mechanizmu działania chemeryny w odniesieniu do AZS, udokumentowano ochronną rolę tej chemokiny w innych chorobach alergicznych, np. astmie alergicznej. Badanie na mysim modelu BALB/c wykazało, że podawanie chemeryny łagodziło alergiczne zapalenie dróg oddechowych (Zhao i wsp. 2014). Wyniki te sugerują, że ekspresja *RARRES2* jest obniżona w chorobach alergicznych i stosowanie chemeryny mogłoby mieć pozytywny efekt ochronny lub terapeutyczny w chorobach alergicznych.

Kolejnym genem, który wykazywał istotnie niższą ekspresję u psów z AZS w porównaniu do zdrowych i traktowanych SITA był *DPP10* (ang. *dipeptidylpeptidase-like 10*). Ekspresja tego genu pod wpływem terapii wzrosła do poziomu obserwowanego u psów zdrowych. Ekspresję genu *DPP10* można powiązać z ekspresją genu *SLPI* (ang. *secretory leukocyte peptidase inhibitor*). Ekspresja genu *SLPI* była na tym samym poziomie u pacjentów z AZS przed i po 6-miesięcznej terapii i była istotnie wyższa u psów zdrowych. Geny *DPP10* i *SLPI* nie były wcześniej opisane w kontekście AZS, natomiast zwracano na nie uwagę w odniesieniu do chorób alergicznych. Według Zhanga i wsp. (2018) mutacja punktowa w genie *DPP10* prowadzi do zwiększonej reaktywności dróg oddechowych po prowokacji alergenem. Nadexpresja genu *DPP10* znacząco zwiększała aktywację receptora glukokortykoidowego (GCR) nawet bez leczenia glukokortykoidami. Sugeruje to, że białko DPP10 może wpływać na produkcję endogennych kortykosteroidów przeciwzapalnych. Z kolei wyciszenie genu *DPP10* w ludzkich komórkach nabłonka dróg oddechowych wpłynęło na obniżenie zdolności GCR do translokacji do jądra i wiązania się z sekwencjami regulatorowymi w DNA. Nadexpresja *DPP10* spowodowała również obniżenie poziomu białka SLPI, którego synteza jest indukowana przez IL-1 β . TNF- α i IL-1 β działają synergicznie, TNF- α stymuluje wydzielanie IL-1 β . W prezentowanych badaniach nie sprawdzałam stężenia IL-1 β w osoczu, ale określiłam stężenie TNF- α w osoczu psów. Najwyższe stężenie TNF- α w osoczu odnotowano u pacjentów z AZS przed terapią. TNF- α może mieć udział w podwyższeniu ekspresji genu *SLPI*. Osiecka i wsp. (2022) stwierdzili wyższe stężenie SLPI w osoczu u osób z AZS w porównaniu do osób zdrowych. Ludzki gen *DPP10* zidentyfikowano jako gen kandydujący do prognozowania podatności na astmę, częstą chorobę dróg oddechowych związaną z atopowym zapaleniem i nadreaktywnością na różne czynniki (Zagha i wsp. 2005, Zhang i wsp. 2018). Sugeruje to, że białko DPP10 może również odgrywać rolę ochronną w AZS u psów. Wykazano również, że białko SLPI pośredniczy w hamowaniu syntezy TGF- β oraz jest inhibitorem elastazy, przyczyniając się do zakłócenia różnicowania się komórek Treg ((Müller i wsp. 2012). Wyższy poziom TGF- β wydzielanych przez komórki dendrytyczne wymaga dodatkowej aktywności elastazy, co sprzyja wzrostowi liczby komórek T CD4⁺Foxp3⁺ ((Tateosian i wsp. 2011).

Analiza mikromacierzy ekspresyjnych wykazała również zmiany w ekspresji genu *PLSCR4* (ang. *phospholipid scramblase 4*), przy czym najwyższą ekspresję stwierdzono u psów z AZS przed terapią, podczas gdy ekspresja u zdrowych psów i u pacjentów po 6-miesięcznym stosowaniu SITA była podobna. Py i wsp. (2009) wykazali, że błonowe skramblazy fosfolipidowe (PLSCR1 i PLSCR4) lokalizują się w błonach limfocytów T CD4⁺ i bezpośrednio oddziałują z receptorem CD4, a SLPI jest ligandem dla PLSCR1 i PLSCR4. SLPI może zakłócać interakcję

CD4 z PLSCR1 i PLSCR4. Być może, w prezentowanych przeze mnie badaniach, wyższa ekspresja genu *SLPI* u psów z AZS przed terapią jest związana z wyższą ekspresją genu *PLSCR4*.

Analiza transkryptomyczna wykazała również zmiany w ekspresji genu *MMP9* (ang. *matrix metalloproteinase 9*). Ekspresja *MMP9* była na podobnym poziomie u psów z AZS przed i po 6-ciu miesiącach stosowania SITA i istotnie wyższa w porównaniu do zdrowych psów. Enzym MMP-9 (znany również jako żelatynaza B) należy do grupy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej zdolnych do degradacji białek budujących błony podstawne oraz macierz zewnątrzkomórkową, co umożliwia przebudowę tkanek i migrację komórek. MMP-9 jest jednym z kluczowych enzymów w rozwoju i przebiegu reakcji zapalnej po ekspozycji na alergen. Komórki układu immunologicznego odpowiedzialne za wywoływanie zapalenia, takie jak: komórki tuczne, eozynofile, neutrofile, limfocyty T, makrofagi syntetyzują i wydzielają MMP-9. Ta metaloproteinaza promuje migrację i aktywację komórek odpornościowych, regulując aktywność czynników wzrostu, cytokin, a zwłaszcza chemokin (Ram i wsp. 2006, Ingram i Kraft 2015 Puxeddu i wsp. 2019). Harper i wsp. (2010) wskazali na dominującą obecność metaloproteinaz: MMP-8 i MMP-9 na powierzchni skóry w ostrej postaci AZS u ludzi. Ekspresja genu *MMP-9* była podwyższona w ostrej fazie AZS w porównaniu do przewlekłej. Purwar i wsp. (2008) wykazali wpływ IL-13 na syntezę MMP-9 w warstwie podstawnej keratynocytów. Wykazano również, że TNF- α w hodowli *in vitro* ludzkich eozynofili pochodzących od pacjentów z atopową astmą powodował wzrost aktywności MMP-9 (Schwingshackl i wsp. 1999). W prezentowanych w drugiej publikacji z cyklu wynikach wykazałam istotny wzrost poziomu IL-13 i TNF- α we krwi pacjentów z AZS przed terapią. Możliwe, że wyższe stężenia tych cytokin przyczyniało się do wyższej ekspresji genu *MMP9*. Wykazano, że *SLPI* może bezpośrednio lub pośrednio indukować transkrypcję *MMP-9*, ale również poprzez interakcję z plazminą, białko to reguluje aktywację i uwalnianie MMP-9 (Hoskins i wsp. 2011). Moje badania wykazały wyższą ekspresję obu genów *SLPI* i *MMP9* u psów z AZS. Badanie Poachanukoona i wsp. (2015) wykazało dodatkowo, że MMP-9 może być również aktywowane przez proteazy obecne w ekstrakcie alergenowym z roztoczy kurzu domowego (HDM).

W moich badaniach zastosowana SITA wpłynęła na obniżenie ekspresji genu *NTSR1* (ang. *neurotensin receptor 1*) u psów z AZS. Najwyższą ekspresję *NTSR1* odnotowano u pacjentów z AZS przed zastosowaniem SITA. *NTSR1* jest receptorem dla neurotensyny (NTS), która bierze udział w patogenezie zapalnych chorób skóry, szczególnie tych powodowanych stresem, drapaniem się i poceniem (Ferris i wsp. 1985, Ostlere i wsp. 1995, Qiu i wsp. 2017). Wykazano, że stężenie NTS wzrasta w skórze gryzoni w wyniku ostrego stresu i indukuje przepuszczalność naczyń, oddziałuje na komórki tuczne poprzez łączenie się z receptorem *NTSR*, stymulując je do

wydzielania histaminy (Carraway i wsp. 1982, Feldberg i wsp. 1998, Singh i wsp. 1999, Donelan i wsp. 2006). W badaniach innych zespołów wykazano także, że poziom NTS w surowicy chorych na AZS był wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Ekspresja genu *NTS* była również wyższa w zmienionej chorobowo skórze pacjentów z AZS w porównaniu do grupy kontrolnej (Vasiadi i wsp. 2013). Natomiast nie stwierdzono różnicy w ekspresji genu *NTSR1* w skórze ze zmianami chorobowymi u pacjentów z AZS w porównaniu z grupą kontrolną (Vasiadi i wsp. 2013). Białka NTS i NTSR wykryto w skórze ze zmianami, natomiast nie wykryto w skórze osób zdrowych. Aktywacja NTSR powoduje wydzielanie cytokin zapalnych CXCL8 i TNF- α (Alysandratos i wsp. 2012). W prezentowanych przeze mnie badaniach podwyższony poziom TNF- α w osoczu psów może być spowodowany podwyższoną ekspresją genu *NTSR1* w komórkach krwi obwodowej u pacjentów z AZS przed leczeniem. W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat poziomu neurotensyny i jej receptora (NTSR1) w skórze psów lub we krwi obwodowej, oraz roli tych białek w przebiegu choroby AZS. Wydaje się jednak, że wskazane są dalsze badania dotyczące roli NTS i NTSR w kontekście AZS u psów.

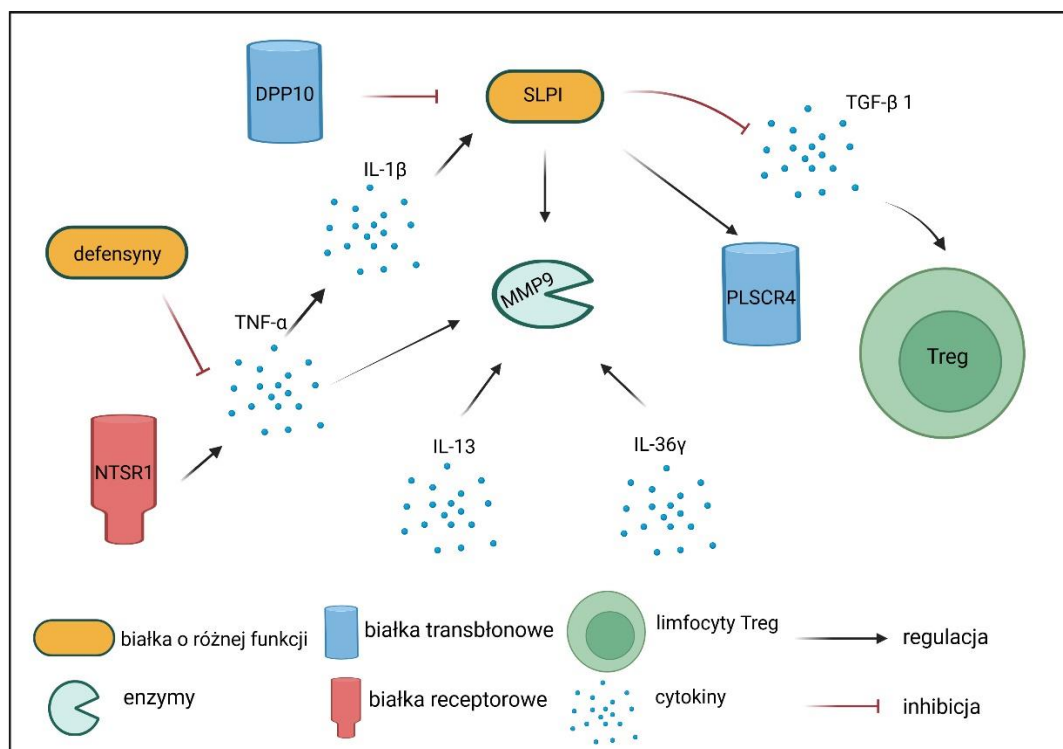
Kolejnymi genami, wykazującymi zmienioną ekspresję u psów z AZS poddanych immunoterapii są geny kodujące białka należące do β -defensyn: *CBD103* i *DEFB122*. β -defensyny stanowią pomost pomiędzy odpowiedzią wrodzoną a nabytą (Semple i wsp. 2012, Shelley i wsp. 2020). Są peptydami kationowymi, które wykazują działanie przeciwbakteryjne. Białka te mogą bezpośrednio zabijać czynniki zakaźne poprzez ich interakcję ze składnikami anionowymi w błonie cytoplazmatycznej drobnoustrojów (Toke 2005, van Damme i wsp. 2009). Atopowemu zapaleniu skóry u psów towarzyszą wtórne zakażenia bakteryjne, najczęściej wywołane przez gronkowcowe ropne zapalenie skóry i drożdżakowate zapalenie skóry wywołane przez *Malassezia* spp (Hensel i wsp. 2015). Nieprawidłowy poziom defensyn może przyczyniać się do wadliwej wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. β -defensyny mogą wykazywać działanie pro- i przeciwzapalne, co zależy od wielu czynników, m.in. od stadium choroby i narażenia na patogeny (Semple i wsp. 2012). Mogą one wpływać na chemoatrakcję limfocytów T CD4⁺ pamięci i niedojrzałych komórek dendrytycznych, poprzez wiązanie się z CCR6 (Yang i wsp. 1999). Mogą również tłumić działanie TNF- α i IL-6. Analiza wyników uzyskanych w moich badaniach wykazała najwyższą ekspresję genu *CBD103* u psów po 6-sześcioletniej terapii SITA i różniła się ona istotnie od ekspresji u psów zdrowych. W przypadku genu *DEFB122* immunoterapia podwyższyła istotnie ekspresję tego genu, prawie do poziomu jaki stwierdzono u zdrowych psów. Trudno jest zinterpretować zaobserwowane zmiany w ekspresji tych dwóch genów. Dane literaturowe dotyczące ww. defensyn są niejednoznaczne. Van Damme i wsp. (2009) stwierdzili ekspresję genu *CBD103* zarówno w skórze, jak i w komórkach jednojądrzastych krwi

obwodowej wszystkich badanych zdrowych psów, a także w wielu innych tkankach (dwunastnica, nerki, jądra, szpik kostny i płuca). Natomiast ekspresja genu *DEFB122* nie była wykrywalna w komórkach krwi obwodowej, a w skórze transkrypty tego genu były obecne w ponad 50% badanych próbek. W badaniach przeprowadzonym przez Lancto i wsp. (2013) wykazano ekspresję genów *CBD103* i *DEFB122* w próbkach skóry z różnych miejsc ciała zdrowych psów (pach, czoła, wewnętrznej strony uda, łopatki i brzucha). Van Damme i wsp. (2009, a także Lancto i wsp. (2013) wykazali zmniejszoną ekspresję genu *CBD103* w skórze psów z AZS zmienionej chorobowo i bez zmian w porównaniu do skóry zdrowych psów, natomiast inni autorzy Leonard i wsp. (2012) nie odnotowali żadnej różnicy w ekspresji tego genu. Wszyscy autorzy nie wykazali różnicy w ekspresji *CBD103* pomiędzy skórą ze zmianami i bez zmian u pacjentów z AZS. Lancto i wsp. (2013) wykazali niższy poziom transkryptu *DEFB122* w skórze ze zmianami chorobowymi i bez zmian u psów z AZS w porównaniu do skóry psów zdrowych. Ze względu na zróżnicowane wyniki dotyczące poziomu β -defensyn w krwi obwodowej i skórze psów cierpiących na AZS potrzebne są dalsze badania nad rolą tych peptydów w AZS u psów. Możliwe, że nieprawidłowy poziom defensyn może również przyczyniać się do nieprawidłowej wrodzonej odpowiedzi immunologicznej.

Analiza wyników mikromacierzy wykazała również, że pod wpływem immunoterapii ekspresja genu *IL36G* istotnie wzrosła i była podobna do ekspresji u zdrowych psów. IL-36 γ jest jedną z izoform interleukiny 36 (IL-36) należącej do nadrodziny interleukiny 1 (IL-1). IL-36 γ bierze udział w aktywacji komórek odpornościowych, prezentacji antygeny i wpływa na syntezę czynników prozapalnych (YUan i wsp. 2019). Izoformy interleukiny IL-36 są najbardziej aktywne w tkankach stanowiących bariery anatomiczne takie jak skóra, płuca, oskrzela i jelita. Ich główną funkcją jest regulacja interakcji środowiska z organizmem, gdyż stanowią pierwszą linię obrony przed mikroorganizmami (Gresnigt i wsp. 2013). Ekspresję genu *IL36* można stwierdzić w keratynocytach, limfocytach B, limfocytach T, komórkach dendrytycznych i monocytach (Garlanda i wsp. 2008, Turtoi i wsp. 2010, Vigne i wsp. 2011, Vigne i wsp. 2012, Suárez-Fariñas i wsp. 2015, Buhl i Wenzel 2019). W zdrowej skórze IL-36 jest syntetyzowana na niskim, fizjologicznym poziomie. Jiang i wsp. (2017) stwierdzili, że IL-36 γ jest ważna dla kontroli procesu gojenia ran po urazach skóry. Ekspresja mRNA i synteza białka IL-36 γ były podwyższone w zranionej skórze. Problematiczna wydaje się jednak niekontrolowana synteza IL-36 γ , która może powodować zaburzenie homeostazy, co może prowadzić do tworzenia środowiska cytokinowego polaryzującego odpowiedź w kierunku zapalenia, a to w konsekwencji do zaindukowania chorób tła immunologicznego np. łuszczycy. Wielu autorów sugeruje, że IL-36 może być biomarkerem łuszczycy i jest również wykorzystywana jako cel terapeutyczny. Stwierdzono jednak, że poziom

IL-36 γ w innych zapalnych chorobach skóry, takich jak atopowe zapalenie skóry, liszaj płaski, wyprysk kontaktowy, podostry toczeń rumieniowaty skórny i ziarniniak grzybiczy, jest znacznie niższy niż w łuszczycy (Suárez-Fariñas i wsp. 2015). Geny o wyższej ekspresji w atopowym zapaleniu skóry są indukowane w większym stopniu przez cytokiny wydzielane przez limfocyty Th2: IL-13 i IL-4 niż przez cytokiny IL-17A, IL-17A/TNF, IL-36 α , β , γ i IFN- α . Zatem niska ekspresja genu *IL36G* obserwowana w moich badaniach u pacjentów z AZS wydaje się być zgodna z wynikami uzyskanymi przez inne zespoły. W badaniu D’Erme i wsp. (2015) poziom transkryptu *IL36G* w skórze osób z AZS był nieco wyższy niż w skórze zdrowej, jednak wyniki te nie były istotne statystycznie. Inne badania wykazały, że ekspresja *IL36* zależy od fazy i stopnia zaawansowania choroby. Wykazano zwiększoną ekspresję *IL36A*, *IL36G* i *IL-36RN* w skórze ze zmianami chorobowymi u pacjentów z AZS w porównaniu ze skórą bez zmian (Suárez-Fariñas i wsp. 2015, Tsang i wsp. 2020). Tengvall i wsp. (2020) opisali zwiększoną ekspresję *IL36G* w skórze psów z AZS z łagodnymi zmianami w porównaniu ze zdrową skórą kontrolną. Należy podkreślić, że wszystkie opisane powyżej wyniki odnoszą się do zmian w ekspresji *IL36G* bezpośrednio w próbkach ludzkiej skóry, podczas gdy w naszym badaniu niższa ekspresja transkryptu *IL36G* była charakterystyczna dla komórek krwi psów z AZS. Być może niedobór IL-36 γ powoduje zaburzenia w utrzymaniu homeostazy, która jest istotna w pierwszej linii obrony i gojeniu ran. Obniżona ekspresja genu *IL36G* u psów z AZS obserwowana w prezentowanych przeze mnie badaniach może być jednym z czynników przyczyniających się do nadmiernej reakcji na alergen.

Podsumowując wyniki drugiej i trzeciej publikacji poniżej zamieściłam wykres, który przedstawia potencjalne bezpośrednie i pośrednie interakcje pomiędzy białkami kodowanymi przez geny o zmienionej ekspresji u psów z AZS przed i po stosowaniu SITA, a badanymi przeze mnie cytokinami odgrywającymi ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej na alergeny.



Podsumowanie

Psy chore na AZS wykazywały wyższy odsetek limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej. Wyniki te sugerują, że oprócz powszechnie podkreślanej przyczyny nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej na alergen, związanej z zaburzoną równowagą pomiędzy limfocytami Th1 i Th2, limfocyty Tc w istotny sposób przyczyniają się do rozwoju tej odpowiedzi. Ponadto zaobserwowany wzrost stężenia IL-13 w osoczu krwi psów z AZS w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi oraz brak różnicy w poziomie IL-4 pomiędzy osobnikami zdrowymi i atopowymi, wskazują na ważniejszą rolę IL-13 w zmianach wywołanych zapaleniem alergicznym u psów. Wysokie stężenia TNF-α wykryte w osoczu psów atopowych dodatkowo potwierdziły utrzymującą się alergiczną odpowiedź zapalną u pacjentów z AZS. Chociaż odsetek limfocytów Treg był wyższy u psów z AZS niż u zdrowych psów kontrolnych, to niższe stężenia IL-10 i TGF-β1 w osoczu psów z atopią wskazuje na upośledzenie funkcji limfocytów Treg u pacjentów z AZS, czemu dodatkowo sprzyja podwyższony poziom TNF-α.

Analiza ekspresji genów komórek jądraztych krwi obwodowej psów chorych na AZS i zdrowych wykazała obniżoną ekspresję 59 genów u psów z AZS. Wśród genów o zmienionej ekspresji nie znalazły się geny kodujące cytokiny biorące udział w zapaleniu alergicznym;

jednakże funkcja zidentyfikowanych genów była bezpośrednio lub pośrednio związana z regulacją różnicowania i aktywnością limfocytów, a także syntezą i wydzielaniem cytokin.

Ekspresja *VEGFA* jest stymulowana przez szlak sygnałowy indukowany przez TGF- β 1, w którym białka Smad2 i Smad3 ulegają aktywacji i tworzą heterokompleksy z białkiem Smad4. Wydaje się, że na obniżoną ekspresję *SMAD2* mogło mieć wpływ obniżone stężenie TGF- β 1 w osoczu psów z AZS, co w rezultacie mogło przyczynić się do obniżonej ekspresji *VEGFA* u psów z AZS. Białko PIAS1 moduluje aktywację kompleksu Smad2/4. Zatem obniżenie ekspresji *SMAD2* obserwowane u pacjentów z AZS może być również związane ze obniżeniem ekspresji genu *PIAS1*. Obniżona ekspresja genu *SH2B1* u psów z AZS może być związane z obniżonym poziomem cytokin IL-2, IL-10 i INF- γ pełniących rolę ligandów aktywujących szlak sygnałowy JAK/STAT w komórkach odpornościowych krwi obwodowej. Wskazane jest prowadzenie dalszych badań nad szczegółową rolą ww. genów i kodowanych przez nie białek w patogenezie AZS w celu sprawdzenia, czy geny te będą mogły w przyszłości posłużyć jako dodatkowe markery prognostyczne.

Wyniki zaprezentowane przeze mnie w dwóch kolejnych artykułach naukowych stanowiących spójny, jednotematyczny cykl potwierdziły na poziomie komórkowym i molekularnym korzystny wpływ stosowania SITA u psów z AZS. Sześć spośród siedmiu psów otrzymujących SITA wykazało pozytywny efekt terapii. Immunoterapia wpływała na liczebność limfocytów różnych subpopulacji oraz na poziom cytokin w osoczu krwi obwodowej psów poddanych immunoterapii. Niższe stężenie IL-13 i TNF- α oraz niższy odsetek limfocytów Tc (CD8⁺) i wyższy odsetek aktywowanych limfocytów T (CD3⁺CD25⁺) potwierdzają korzystny efekt zastosowanej terapii SITA. Immunoterapia, jak i czas jej stosowania miały wpływ na zmianę liczebności limfocytów Treg u pacjentów z AZS. Nie jest jednak jasne, dlaczego liczba limfocytów Treg po trzech miesiącach terapii zmniejszyła się w porównaniu do stanu przed terapią, a następnie po 6 miesiącach wzrosła do poziomu przed terapią lub nawet wyższego. Należy podkreślić, że pomimo istotnych zmian w subpopulacji limfocytów i poziomie cytokin obserwowanych u badanych psów z AZS po SITA, reakcja poszczególnych pacjentów na terapię może znacznie się różnić.

Analiza ekspresji genów komórek jądrzastych krwi obwodowej psów zdrowych oraz psów z AZS przed terapią i po 6 miesiącach SITA wykazała 521 transkryptów o zmienionej ekspresji, spośród których 241 reprezentowało geny o dobrze opisanych funkcjach. W oparciu o dostępną literaturę zostało opisanych dziewięć genów (*RARRES2*, *DPP10*, *SLPI*, *PLSCR4*, *MMP9*, *NTSRI*, *CBD103*, *DEFB122* i *IL36G*), które mogą być istotne w kontekście odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z AZS. Osiem z tych dziewięciu genów (z wyjątkiem *CBD103*) wykazywało

zmienioną ekspresję u pacjentów z AZS przed terapią w porównaniu do zdrowych psów. Ekspresja pięciu z dziewięciu opisanych genów (*DPP10*, *PLSCR4*, *NTSR1*, *DEFB122* i *IL36G*) uległa zmianie po zastosowaniu SITA, ale tylko w przypadku trzech genów (*DPP10*, *PLSCR4* i *IL36G*) ekspresja była porównywalna z ekspresją u zdrowych psów. Ekspresja genu *RARRES2* była najniższa u pacjentów z AZS przed immunoterapią, co można powiązać ze zmianami w aktywności szlaków sygnałowych regulowanych przez retinoidy u psów z AZS. Wyższa ekspresja *DPP10* u psów po 6 miesiącach SITA w porównaniu z pacjentami przed terapią wydaje się być pozytywnym efektem stosowania terapii. Białko DPP10 pełni ochronną rolę w AZS, jest to związane z hamowaniem odpowiedzi prozapalnej poprzez stymulację wytwarzania endogennych kortykosteroidów przeciwzapalnych. Ponadto obniżona ekspresja *DPP10* u psów z AZS może być bezpośrednio powiązana ze zwiększonym poziomem transkryptów *SLPI*, co z kolei skutkuje zahamowaniem wydzielania TGF- β i nie sprzyja różnicowaniu i aktywności limfocytów Treg. Gen *PLSCR4*, koduje błonowe skramblazy, które są receptorami dla *SLPI*. Gen *PLSCR4* wykazywał najwyższą ekspresję u pacjentów z AZS przed terapią, podczas gdy jego ekspresja u zdrowych psów i pacjentów z AZS po SITA była podobna. Wzrost ekspresji genów *SLPI* i *PLSCR4* u psów z AZS przed terapią sugeruje wspólną ścieżkę regulacji tych genów. Również ekspresja *MMP9* była zwiększona u pacjentów z AZS w porównaniu ze zdrowymi psami, co mogło przyczynić się do stymulacji procesów zapalnych. Ekspresja *MMP9* była nadal podwyższona pomimo stosowanej terapii. Natomiast terapia wpłynęła na zmniejszenie ekspresji genu *NTSR1* u psów z AZS do poziomu zbliżonego u psów zdrowych. Podwyższoną ekspresję *NTSR1* można powiązać z odpowiedzią zapalną indukowaną przez alergen, ze względu na fakt, że gen ten koduje receptor neurotensyny 1, którego aktywacja powoduje wydzielanie cytokin zapalnych CXCL8 i TNF- α . β -defensyny wykazują działanie pro- i przeciwzapalne. Zależy to od wielu czynników, takich jak stadium choroby i narażenie na czynniki zakaźne. Najwyższą ekspresję genu *CBD103* odnotowano u psów po SITA i różniła się ona istotnie od ekspresji obserwowanej u psów zdrowych, natomiast ekspresja genu *DEFB122* była istotnie niższa u pacjentów z AZS przed terapią w porównaniu do ekspresji u psów zdrowych i u psów z AZS poddanych SITA. Ekspresja genu *IL36G* pod wpływ SITA wzrosła w porównaniu z ekspresją u psów z AZS i była na podobnym poziomie co u zdrowych psów. Być może niedobór IL-36 γ powoduje zaburzenia w utrzymaniu homeostazy i może być jednym z czynników przyczyniających się do nadmiernej reakcji na alergen.

Pomimo tego że atopowe zapalenie skóry jest bardzo często występującą chorobą zarówno u ludzi jak i psów, wyniki uzyskiwane przez różne zespoły badawcze są niejednoznaczne, a czasem nawet sprzeczne. Dodatkowo, znacznie lepiej poznany jest mechanizm odpowiedzi

immunologicznej na alergen u ludzi niż u psów, co powoduje, że w interpretacji wyników badań naukowych z zakresu medycyny weterynaryjnej konieczne jest odwoływanie się do wyników dotyczących AZS u ludzi. Prezentowane przeze badania są kolejnym krokiem w poznawaniu mechanizmu odpowiedzi immunologicznej w AZS u psów na poziomie komórkowym i molekularnym. Uzyskane przeze mnie wyniki stanowią bogatą bazę danych do dalszych badań w poszukiwaniu markerów dla AZS. Wśród genów przedstawionych w pierwszej i trzeciej publikacji cyklu znalazły się takie, których zmiany w ekspresji opisano po raz pierwszy w odniesieniu do AZS oraz immunoterapii. Dalsze badania nad ich rolą w atopii mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podłoża tej choroby u psów, jak również wskazać użyteczność tych genów i ich produktów białkowych jako markerów diagnostycznych lub prognostycznych w przebiegu leczenia AZS.

Bibliografia

1. Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* 2011;41:112-124.
2. Ahmad, S.; Azid, N.A.; Boer, J.C.; Lim, J.; Chen, X.; Plebanski, M.; Mohamud, R. The Key Role of TNF-TNFR2 Interactions in the Modulation of Allergic Inflammation: A Review. *Front. Immunol.* 2018, 9, 2572.
3. Akdis, C.A.; Akdis, M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011, 127, 18–27.
4. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y. Phosphatidylinositol 3-kinase class II α -isoform PI3K-C2 α is required for transforming growth factor β -induced Smad signaling in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2015;290(10):6086–105.
5. Almeida, A.R.; Borghans, J.A.; Freitas, A.A. T cell homeostasis: Thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J. Exp. Med.* 2001, 194, 591–599.
6. Alysandratos, K.D.; Asadi, S.; Angelidou, A.; Zhang, B.; Sismanopoulos, N.; Yang, H.; Critchfield, A.; Theoharides, T.C. Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PLoS One.* 2012, 7:e48934.
7. Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Content of vascular endothelial growth factor in stratum corneum well correlates to local severity of acute inflammation in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157:251-258.
8. Beccati M, Martini V, Comazzi S, Fanton N, Cornegiani L. Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: a prospective study. *Vet Dermatol.* 2016;27(1):17–e5..
9. Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J. Regulatory activity of human CD4 CD25 T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology.* 2005;116:103–11
10. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2008;358:1483–94.
11. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008; 214:149–60.
12. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R. Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2009;64:1588-1596.
13. Buhl, A.L.; Wenzel, J. Interleukin-36 in Infectious and Inflammatory Skin Diseases. *Front Immunol.* 2019, 10, 1162.
14. Carraway, R.; Cochrane, D.E.; Lansman, J.B.; Leeman, S.E.; Paterson, B.M.; Welch, H.J. Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells and elevates plasma histamine levels. *J Physiol.* 1982, 323, 403-14.
15. Chen L, Marble DJ, Agha R, et al. The progression of inflammation parallels the dermal angiogenesis in a keratin 14 IL-4-transgenic model of atopic dermatitis. *Microcirculation.* 2008;15(1):49-64.
16. Chen W, Wahl SM. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14:85–9.
17. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol.* 2013;190:1076–1084.

18. Choi, J.P.; Kim, Y.S.; Kim, O.Y.; Kim, Y.M.; Jeon, S.G.; Roh, T.Y.; Park, J.S.; Gho, Y.S.; Kim, Y.K. TNF- α is a key mediator in the development of Th2 cell response to inhaled allergens induced by a viral PAMP double-stranded RNA. *Allergy* 2012, 67, 1138–1148.
19. Cobiella D, Gram D, Santoro D. Noninvasive evaluation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) protein concentrations in the stratum corneum and serum of healthy and atopic dogs. *Vet Dermatol*. 2020;31(2):102-105
20. Curotto de Lafaille, M.A.; Lino, A.C.; Kutchukhidze, N.; Lafaille, J.J. CD25⁺T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J. Immunol*. 2004, 173, 7259–7268.
21. D'Erme, A.M.; Wilsman-Theis, D.; Wagenpfeil, J.; Hölzel, M.; Ferring-Schmitt S, Sternberg S, Wittmann M, Peters B, Bosio A, Bieber T, Wenzel J. IL-36 γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol*. 2015, 135, 1025-1032.
22. **Delerive P, Monté D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. The orphan nuclear receptor ROR α is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*. 2001;2:42-8.**
23. Donelan, J.; Boucher, W.; Papadopolou, N.; Lytinas, M.; Papaliodis, D.; Dobner, P.; Theoharides, T.C. Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103, 7759-64. doi: 10.1073/pnas.0602210103.
24. El Samahy MH, Attia EA, Saad AA, Mahmoud EY. Circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regulatory cells in patients with atopic dermatitis after narrowband-ultraviolet B phototherapy. *Int J Dermatol*. 2015;54:e424-e429.
25. Farez MF, Mascanfroni ID, Méndez-Huergo SP, Yeste A, Murugaiyan G, Garo LP, et al. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. *Cell*. 2015;162(6):1338-52.
26. Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol*. 2010;21:23-31.
27. Feldberg, R.S. Cochrane, D.E.; Carraway, R.E.; Brown, E.; Sawyer, R.; Hartunian, M.; Wentworth, D. Evidence for a neurotensin receptor in rat serosal mast cells. *Inflamm Res*. 1998, 47, 245-50. Ferris, C.F.; Carraway, R.E.; Hammer, R.A.; Leeman, S.E. Release and degradation of neurotensin during perfusion of rat small intestine with lipid. *Regul Pept*. 1985, 12, 101-11.
28. Fischer, N.M.; Müller, R.S. Allergen Specific Immunotherapy in Canine Atopic Dermatitis: An Update. *Curr. Derm. Rep*. 2019, 8, 297–302.
29. Frew, A.J. Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010, 125 (Suppl. 2), S306–S313.
30. Garlanda, C.; Mantovani, A.; O'Neill, L.A.; Mills, K.H.; Lynch, M.A. IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8. *J Neurochem*. 2008, 105, 1960-9. Gedon, N.K.; Müller, R.S. Atopic dermatitis in cats and dogs: A difficult disease for animals and owners. *Clin. Transl. Allergy* 2018, 8, 41.
31. Gedon NKY, Mueller RS. Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clin Transl Allergy*. 2018;8:41
32. Gresnigt, M.S.; van de Veerdonk, F.L. Biology of IL-36 cytokines and their role in disease. *Semin Immunol*. 2013, 25, 458-65.
33. Halliwell R, Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;114(3-4):207-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.08.013.
34. Harper, J.I.; Godwin, H.; Green, A.; Wilkes, L.E. Holden, N.J.; Moffatt, M.; Cookson, W.O.; Layton, G.; Chandler, S. A study of matrix metalloproteinase expression and activity in atopic dermatitis using a novel skin wash sampling assay for functional biomarker analysis. *Br J Dermatol*. 2010, 162,397-403.
35. Hauck V, Hügli P, Meli ML, Rostaher A, Fischer N, Hofmann-Lehmann R, Favrot C. Increased numbers of FoxP3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Vet Dermatol*. 2016;27:26–e9.
36. Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, Une S, et al. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2002;49:27–31.
37. Hennino A, Jean-Decoster C, Giordano-Labadie F, Debeer S, Vanbervliet B, Rozières A, Schmitt AM, Nicolas JF. CD8⁺ T cells are recruited early to allergen exposure sites in atopy patch test reactions in human atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:1064–7.
38. Hennino A, Vocanson M, Toussaint Y, et al. Skin-infiltrating CD8 T cells initiate atopic dermatitis lesions. *J Immunol*. 2007;178:5571–7.
39. Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res*. 2015;11:196.. doi:10.1186/s12917-015-0515-5
40. Herrmann I, Mamo LB, Holmes J, Mohammed JP, Murphy KM, Bizikova P. Long-term effects of ciclosporin and oclacitinib on mediators of tolerance, regulatory T-cells, IL-10 and TGF- β , in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2023;34:107-114.

41. Hoskins, E.; Rodriguez-Canales, J.; Hewitt, S.M.; Elmasri, W.; Han, J.; Han, S.; Davidson, B.; Kohn, E.C. Paracrine SLPI secretion upregulates MMP-9 transcription and secretion in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2011, 122, 656-62.
42. Humeau M, Boniface K, Bodet C. Cytokine-Mediated Crosstalk Between Keratinocytes and T Cells in Atopic Dermatitis. *Front Immunol.* 2022;13:801579.
43. Ingram, J.; Kraft, M. Metalloproteinases as modulators of allergic asthma: therapeutic perspectives. *Metalloproteinases In Medicine.* 2015, 2, 61-74.
44. **Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept Signal.* 2009;7:e003.**
45. Jiang, Z.; Liu, Y.; Li, C.; Chang, L.; Wang, W.; Wang, Z.; Gao, X.; Ryffel, B.; Wu, Y.; Lai, Y. IL-36 γ Induced by the TLR3-SLUG-VDR Axis Promotes Wound Healing via REG3A. *J Invest Dermatol.* 2017, 137, 2620-2629.
46. Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;123:337-44.
47. Koczy-Baron E, Jochem J, Kasperska-Zajac A. Increased plasma concentration of vascular endothelial growth factor in patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and platelet activation. *Inflamm Res.* 2012;61:1405-9.
48. Koczy-Baron E, Kasperska-Zajac A The role of vascular endothelial growth factor in inflammatory processes. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68 : 57-65
49. Koury J, Ramirez A, Xie C, Harb J, Dong Ch, Maki Ch, Ramos T, Izadyar F, Clark D, Drechsler Y, Kaur G, Hao J, Simon M. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral blood are associated with canine atopic dermatitis. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218670.
50. La Grutta S, Richiusa P, Pizzolanti G, Mattina A, Pajno GB, Citarrella R, et al. CD4(+)IL-13(+) cells in peripheral blood well correlates with the severity of atopic dermatitis in children. *Allergy.* 2005;60:391-5.
51. Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7(7):1056-1067.
52. Lancto, C.; Torres, S.M.; Hendrickson, J.A.; Martins, K.V.; Rutherford, M.S. Altered expression of antimicrobial peptide genes in the skin of dogs with atopic dermatitis and other inflammatory skin conditions. *Vet Dermatol.* 2013, 24, 414-21, e90.
53. Leonard BC, Marks SL, Outerbridge CA, et al. Activity, expression and genetic variation of canine β -defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. *J Innate Immun.* 2012;4(3):248-259.
54. Létourneau, S.; Krieg, C.; Pantaleo, G.; Boyman, O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 123, 758-762.
55. Li Y, Xu W, Yao J, Cheng H, Sun X, Li L. Correlation of Blood FoxP3+ Regulatory T Cells and Disease Activity of Atopic Dermatitis. *J Immunol Res.* 2019;2019:1820182.
56. Lin YL, Shieh CC, Wang JY. The functional insufficiency of human CD4 + CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy.* 2008;63:67-74.
57. Maeda S, Tsuchida H, Marsella R. Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Vet Dermatol.* 2007 Dec;18:422-6.
58. Malhotra N, Leyva-Castillo JM, Jadhav U, et al. ROR α -expressing T regulatory cells restrain allergic skin inflammation. *Sci Immunol.* 2018;3:eaa06923.
59. Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol.* 2006;17: 111-20
60. Martini F, Rostaher A, Favrot C, Fischer N. Interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1 plasma levels in atopic dogs before and during immunotherapy. *Vet Rec.* 2022;190:e1270.
61. Martini, F; Rostaher, A; Favrot, C. Fischer, N. Interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1 plasma levels in atopic dogs before and during immunotherapy. *Vet. Rec.* 2022, 190, e1270.
62. Mazrier H, Vogelnest LJ, Taylor RM, Williamson P. Altered plasma cytokines in dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2021; 33:131-e38.
63. **Merryman-Simpson AE, Wood SH, Fretwell N, Jones PG, McLaren WM, McEwan NA et al. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Vet Dermatol.* 2008;19: 59-66**
64. Mihály, J; Gamlieli, A; Worm, M; Rühl R. Decreased retinoid concentration and retinoid signalling pathways in human atopic dermatitis. *Exp Dermatol.* 2011, 20, 326-30. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01225.x
65. Moote, W.; Kim, H.; Ellis, A.K. Allergen-specific immunotherapy. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2018, 14 (Suppl. 2), 53.
66. Müller AM, Jun E, Conlon H, Sadiq SA. Inhibition of SLPI ameliorates disease activity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *BMC Neurosci.* 2012, 13, 30.

67. Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, Berkun Y, Ben-Horin S, Amariglio N, et al. TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA⁺ regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol.* 2010;184:3570–3581.
68. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004;172:834–42.
69. Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 2002;32:789–95.
70. Olivry T, Banovic F. Treatment of canine atopic dermatitis: Time to revise our strategy? *Vet. Dermatol.* 2019, 30, 87–90.
71. Olivry T, Foster AP, Mueller RS, McEwan NA, Chesney C, Williams HC. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Vet Dermatol.* 2010;2:4-22. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00784.x
72. Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol.* 1997;19:477–86.
73. Osiecka O, Skrzeczynska-Moncznik J, Morytko A, Mazur A, Majewski P, Bilaska B, Kapinska-Mrowiecka M, Kosalka-Wegiel J, Pastuszczyk M, Pyza E, Cichy J. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Is Present in Circulating and Tissue-Recruited Human Eosinophils and Regulates Their Migratory Function. *Front Immunol.* 2022;12:737231.
74. Ostlere LS, Cowen T, Rustin MH. Neuropeptides in the skin of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol.* 1995, 20, 462-7.
75. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:756-763.
76. Pelly V, Coomes SM, Kannan Y, et al. Interleukin 4 promotes the development of ex-Foxp3 Th2 cells during immunity to intestinal helminths. *J Exp Med.* 2017;214:1809-1826
77. **Plager DA, Torres SM, Koch SN, Kita H. Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;149: 136-42.**
78. Poachanukoon O, Meesuk L, Pattanacharoenchai N, Monthanapisut P, Dechatiwongse Na Ayudhya T, Koontongkaew S. Zingiber cassumunar ROXB. and its active constituent inhibit MMP-9 direct activation by house dust mite allergens and MMP-9 expression in PMA-stimulated human airway epithelial cells. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2015;33(1):42-51.
79. Purwar, R.; Kraus, M.; Werfel, T.; Wittmann, M. Modulation of keratinocyte-derived MMP-9 by IL-13: a possible role for the pathogenesis of epidermal inflammation. *J Invest Dermatol.* 2008, 128, 59-66.
80. Puxeddu I, Petrelli F, Angelotti F, Croia C, Migliorini P. Biomarkers In Chronic Spontaneous Urticaria: Current Targets And Clinical Implications. *J Asthma Allergy.* 2019, 12, 285-295.
81. Py B, Basmaciogullari S, Bouchet J, et al. The phospholipid scramblases 1 and 4 are cellular receptors for the secretory leukocyte protease inhibitor and interact with CD4 at the plasma membrane [published correction appears in PLoS ONE. 2009;4(4). doi: 10.1371/annotation/657cd713-aaac-4ebb-80ad-3ec8dfb12b42]. *PLoS One.* 2009;4(3):e5006. doi:10.1371/journal.pone.000500
82. Qiu, S.; Pellino, G.; Fiorentino, F.; Rasheed, S.; Darzi, A.; Tekkis, P.; Kontovounisios, C. A Review of the Role of Neurotensin and Its Receptors in Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2017, 2017, 6456257.
83. Ram, M.; Sherer, Y.; Shoenfeld, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2006, 26, 299-307.
84. Reefer AJ, Satinover SM, Solga MD, Lannigan JA, Nguyen JT, Wilson BB, et al. Analysis of CD25^{hi}CD4⁺ “regulatory” T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T(H)2-like population. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:415–22. e3.
85. Rui L, Carter-Su C. Identification of SH2-bbeta as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7172-7.
86. Samochocki Z, Bogaczewicz J, Sysa-Jędrzejowska A, McCauliffe DP, Kontny E, Wozniacka A. Expression of vascular endothelial growth factor and other cytokines in atopic dermatitis, and correlation with clinical features. *Int J Dermatol.* 2016;55:e141-e146.
87. Santos, M.C.P.; Serra-Caetano, A.; Pedro, E.; Melo, A.; Caramalho, I.; Barbosa, M.P.; Victorino, R.M.M.; Sousa, A.E. Expansion of FOXP3⁺ regulatory CD4 T cells upon exposure to hymenoptera venom during the beekeeping season. *Allergy* 2019, 74, 1182–1184.
88. Saurat, J.H. Retinoids and psoriasis: novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1999,41; S2-6.
89. **Schamber P, Schwab-Richards R, Bauersachs S, Mueller RS. Gene expression in the skin of dogs sensitized to the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. *G3 (Bethesda).* 2014;4: 1787-95.**
90. Schlotter YM, Rutten VP, Riemers FM, Knol EF, Willemse T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011;143:20–6..

91. Schwingshackl, A.; Duszyk, M.; Brown, N.; Moqbel, R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF- α . *J Allergy Clin Immunol.* 1999, 104, 983-9. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70079-5
92. Semple, F.; Dorin, J.R. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immun.* 2012, 4, 337-48. doi: 10.1159/000336619.
93. Shelley, J.R.; Davidson, D.J.; Dorin, J.R. The Dichotomous Responses Driven by β -Defensins. *Front Immunol.* 2020, 11, 1176. doi: 10.3389/fimmu.2020.01176.
94. Shida, M., Kadota M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 102, 19–31.
95. Singh LK, Boucher W, Pang X, et al. Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288:1349-1356.
96. Sinke JD, Thepen T, Bihari IC, Rutten VP, Willemse T. Immunophenotyping of skininfiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;57:13–23.
97. Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, et al. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(2):558-567.e11. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.029
98. Slominski AT, Kim TK, Takeda Y, et al. ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J.* 2014;28(7):2775-2789.
99. Stanley AC, Lacy P. Pathways for cytokine secretion. *Physiology (Bethesda).* 2010;25:218–29.
100. Suárez-Fariñas M, Ungar B, Correa da Rosa J, et al. RNA sequencing atopic dermatitis transcriptome profiling provides insights into novel disease mechanisms with potential therapeutic implications. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(5):1218-1227.
101. Szegedi A, Baráth S, Nagy G, et al. Regulatory T cells in atopic dermatitis: epidermal dendritic cell clusters may contribute to their local expansion. *Br J Dermatol.* 2009;160:984-993.
102. Tarpataki N, Terenyi M, Nagy SZ. Changes in the CD4/CD8-positive T lymphocyte ratio in the blood of atopic and non-atopic dogs. Special Issue: 7th World Congress of Veterinary Dermatology, July 24–28, 2012, Vancouver, Canada July 2012. *Vet Dermatol.* 2012;23 Suppl 1:58.
103. Taszkun I. Expression of CD3, CD4, CD8, CD21, and MHC II lymphocyte antigens and serum IL-10 concentration in dogs with atopic dermatitis complicated by purulent dermatitis *Bull Vet Inst Pulawy* 2013; 7, 365-370
104. Tateosian NL, Reiteri RM, Amiano NO, et al. Neutrophil elastase treated dendritic cells promote the generation of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T cells in vitro. *Cell Immunol.* 2011;269(2):128-134. doi:10.1016/j.cellimm.2011.03.013
105. Tengvall K, Bergvall K, Olsson M, et al. Transcriptomes from German shepherd dogs reveal differences in immune activity between atopic dermatitis affected and control skin. *Immunogenetics.* 2020;72(5):315-323.
106. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers.* 2005;80(6):717-735. doi:10.1002/bip.20286Tsang, M.SM., Sun, X. & Wong, C.K. The Role of New IL-1 Family Members (IL-36 and IL-38) in Atopic Dermatitis, Allergic Asthma, and Allergic Rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2020, 20, 40.
107. Turtoi A, Brown I, Schläger M, Schneeweiss FH. Gene expression profile of human lymphocytes exposed to (211)At alpha particles. *Radiat Res.* 2010;174:125-
108. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006;108:253–261.
109. van Damme CM, Willemse T, van Dijk A, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Altered cutaneous expression of beta-defensins in dogs with atopic dermatitis. *Mol Immunol.* 2009;46:2449-2455.
110. van de Veen W, Wirz OF, Globinska A, Akdis M. Novel mechanisms in immune tolerance to allergens during natural allergen exposure and allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2017;48:74-81.
111. Varricchi G, Granata F, Loffredo S, Genovese A, Marone G. Angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory skin disorders. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73(1):144-153. Vasiadi M, Mondolfi AP, Alysandratos KD, et al. Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2013;169:695-699.
112. Verde MT, Villanueva-Saz S, Loste A, et al. Comparison of circulating CD4+, CD8+ lymphocytes and cytokine profiles between dogs with atopic dermatitis and healthy dogs. *Res Vet Sci.* 2022;145:13-20.
113. Vigne S, Palmer G, Lamacchia C, et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood.* 2011;118:5813-5823.
114. Wahl SM, Vázquez N, Chen W. Regulatory T cells and transcription factors: gatekeepers in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:768–74.

115. Wakugawa M, Hayashi K, Nakamura K, Tamaki KJ. Evaluation of mite allergen-induced Th1 and Th2 cytokine secretion of peripheral blood mononuclear cells from atopic dermatitis patients: association between IL-13 and mite-specific IgE levels. *Dermatol Sci.* 2001;25:116–26.
116. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999;286(5439):525-528. Yuan ZC, Xu WD, Liu XY, Liu XY, Huang AF, Su LC. Biology of IL-36 Signaling and Its Role in Systemic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2532.
117. Yang N, Zhao B, Rasul A, Qin H, Li J, Li X. PIAS1-modulated Smad2/4 complex activation is involved in zinc-induced cancer cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2013;4:e811.
118. Zagha E, Ozaita A, Chang SY, et al. DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem.* 2005;280(19):18853-18861. Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res.* 2006;297:425–9.
119. Zhang Y, Poobalasingam T, Yates LL, et al. Manipulation of dipeptidylpeptidase 10 in mouse and human in vivo and in vitro models indicates a protective role in asthma. *Dis Model Mech.* 2018;11:dmm031369.
120. Zhao L, Yang W, Yang X, et al. Chemerin suppresses murine allergic asthma by inhibiting CCL2 production and subsequent airway recruitment of inflammatory dendritic cells. *Allergy.* 2014;69:763-774.
121. Zheng Y, Luo S, Wang G, et al. Downregulation of tazarotene induced gene-2 (TIG2) in skin squamous cell carcinoma. *Eur J Dermatol.* 2008;18:638-641.
122. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* 2006;108:1571-1579.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

5.1 Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Po obronieniu pracy magisterskiej w Katedrze Roślin Warzywnych i Leczniczych na Wydziale Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, SGGW promotor mojej pracy, prof. dr hab. Zenon Węglarz zaproponował mi studia doktoranckie na moim rodzimym wydziale, które rozpoczęłam w październiku 2000 roku. Moje zainteresowania naukowe były skupione na roślinie warzywniej o właściwościach przyprawowych i leczniczych jaką jest chrzan pospolity (*Armoracia rusticana* Gaertn). Badania były wielowątkowe i obejmowały: 1) ocenę wpływu warunków środowiska na wielkość i jakość plonu lokalnych typów chrzanu oraz określenie dynamiki zmian w zawartości niektórych biologicznie aktywnych związków w korzeniach i liściach podczas wegetacji, 2) określenie zróżnicowania fenotypowego i genetycznego polskich lokalnych typów chrzanu, 3) ocenę sensoryczną, 4) zbadanie właściwości przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych związków uzyskanych z korzeni chrzanu, 5) zbadanie właściwości przeciwutleniających chrzanu i jego wpływu na metabolizm zwierząt oraz 6) opracowanie metody uzyskiwania zdrowych, wolnych od wirusów sadzonek chrzanu w kulturach *in vitro*, co jest istotne, ponieważ chrzan nie zawiązuje żywotnych nasion i rozmnażany jest wegetatywnie. Badania były realizowane w ramach grantu pt. „Badania nad wartością surowcową i konsumencką oraz aktywnością biologiczną polskich ekotypów chrzanu pospolitego (*Armoracia rusticana* Gaertn.)”, finansowanego przez ówczesny Komitet Badań Naukowych (nr projektu: 6 P06R 059 21). Ze względu na szeroki wachlarz stosowanych metod badawczych w realizowanym projekcie, część analiz prowadzona była w innych ośrodkach naukowych. Współpraca ze specjalistami z różnych dziedzin pozwoliła mi poznać różne techniki badawcze. Ocena zróżnicowania genetycznego polskich lokalnych typów chrzanu była wykonana w ramach współpracy z dr Andrzejem Rafalskim w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie. Ocena była wykonana za pomocą reakcji PCR z zastosowaniem starterów semi-konserwatywnych. Przeciugrzybicze właściwości związków zawartych w soku i olejku gorczycznym otrzymanych z utartych korzeni chrzanu oraz izotiocyanianu allilu, głównego składnika olejku, były badane we współpracy z prof. dr hab. Alicją Saniewską w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (dziś Instytut Ogrodnictwa) PIB w Skierniewicach. Właściwości tych substancji sprawdzane były w warunkach *in vitro* na kilku gatunkach grzybów patogenicznych roślin. Natomiast właściwości przeciwutleniające wodnych roztworów liofilizatów liści i korzeni oraz soku wyciśniętego z korzeni oraz właściwości antybakteryjne wodnego ekstraktu liofilizowanych korzeni sprawdzane były dzięki współpracy z dr hab. Bożeną Bałasińską, prof. SGGW, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej. Badania wpływu dodatku chrzanu do diety szczurów wzbogaconej w nasycone bądź nienasycone kwasy tłuszczowe na metabolizm cholesterolu u zwierząt prowadzone były w ramach współpracy z dr hab. Bożeną Bałasińską, prof. SGGW oraz prof. dr Andrzejem Mazurem w Unite des Maladies Metaboliques et Micronutriments, INRA Clermont-Ferrand, we Francji. Współpraca z innymi ośrodkami naukowymi zaowocowała ciekawymi wynikami. Związki aktywne obecne w korzeniach chrzanu wykazały właściwości przeciwgrzybicze i przeciwbakteryjne. Olejek uzyskany z chrzanu hamował wzrost grzybnii kilku patogenów roślin

(*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis tulipe*) w warunkach *in vitro*, a także wykazał silne działanie eliminujące grzyby zasiedlające nasiona astra chińskiego (*Callistephus chinensis*). Wodny ekstrakt z korzeni niektórych typów chrzanu całkowicie zahamował rozwój *Salmonelli enteritidis*.

Badania wykonane we współpracy z różnymi ośrodkami badawczymi częściowo były opublikowane w przed obroną mojej pracy doktorskiej do 2004 roku, a część po obronie, po 2004 roku.

Publikacje do 2004 roku:

Majewska A., Bałasińska B., Dąbrowska B. In vitro and in vivo antioxidant properties of leaf and root extract and oil from different types of horseradish (*Armoracia rusticana* Gaertn.). *Folia Horticulture* 2004; 16/1:15-22

Majewska A., Dąbrowska B., Rafalski A., Wiśniewska I. Analiza kilkunastu polskich typów chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn.) z zastosowaniem semi-specyficznego PCR. *Folia Universi. Agricul. Stetinensis* 2004; 239: 237-243

Saniewska A., Dąbrowska B., **Majewska A.** Antifungal activity of horseradish (*Armoracia rusticana* Gaertn.) endogenic compounds. *Veg. Crops Res. Bull.*, 2004; 61: 121-131.

Publikacje po 2004 roku:

Jarecka A., Saniewska A., Dąbrowska B., **Majewska A.**, Wpływ związków aktywnych chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn) na wzrost i rozwój *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipe*. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 2006; 510: 235-246

Jarecka A., Saniewska A., Dąbrowska B., **Majewska A.** Hamujący wpływ związków aktywnych chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn.) na wzrost i rozwój *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipe*. *Biuletyn SPORC* 2006; 18: 47-52

Saniewska A., Dąbrowska B., **Majewska A.**, Jarecka A. Antifungal activity of essential oil from roots of some Polish local type of horseradish (*Armoracia rusticana* Gaertn.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 2005; 504:237-243

Bałasińska B., Nicolle C., Gueux E., **Majewska A.**, Demigne Ch., Mazur A., Dietary horseradish reduces plasma cholesterol in mice. *Nutr. Res.* 2005; 25: 937-945.

5.2 Aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk rolniczych zostałam zatrudniona w Instytucie Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach (obecnie Instytut Ogrodnictwa PIB) w Zakładzie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii, w Pracowni Markerów Molekularnych. W tym czasie prowadzono równolegle hodowle różnych gatunków warzyw m.in. pomidora, ogórka, marchwi. W celu identyfikacji wartościowych cech hodowlanych, stosowane były markery molekularne oparte na technice PCR m.in. RAPD, RFLP, Nested. Jednym z tematów badawczych było prowadzenie analizy genetycznej mającej na celu szczegółowe poznanie dziedziczenia cechy chłodoodporności u ogórka oraz, w dalszym etapie, wprowadzenie tej cechy do linii hodowlanych. Aby lepiej poznać mechanizm dziedziczenia oraz ułatwić

wprowadzenie cechy chłodoodporności do roślin, poszukiwane były markery DNA sprzężone z tą cechą. Również poszukiwane były markery DNA sprzężone z cechą odporności na mączniaka rzekomego dyniowatych u ogórkach. W hodowli odmian heterozyjnych marchwi wykorzystuje się linie z cytoplazmatyczną męską sterility (CMS) jako komponenty męskie. Identyfikacja roślin z cechą cytoplazmatycznej męskiej sterility możliwa jest dopiero w czasie kwitnienia roślin. Dlatego też poszukiwane były markery DNA w celu identyfikacji cechy męskiej sterility u roślin niezależnie od ich stadium rozwoju.

W instytucie Warzywnictwa im. Emila Chroboczka pracowałam 1,5 roku, a prace hodowlane są żmudne i wieloletnie. Moja praca nie zakończyła się żadną publikacją, natomiast zdobyłam wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu biologii molekularnej, którą wykorzystałam w kolejnym miejscu zatrudnienia.

W październiku 2007 zostałam zatrudniona w Katedrze Nauk Fizjologicznych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej na SGGW w Warszawie, na stanowisku naukowo-technicznym. W zakresie moich obowiązków było przede wszystkim prowadzenie analiz transkryptomicznych z wykorzystaniem techniki mikromacierzy ekspresyjnych w nowopowstałej Pracowni Genomiki Funkcjonalnej w Katedrze Nauk Fizjologicznych. Moje bogate doświadczenie w pracach z zakresu transkryptomiki przyczyniło się do otrzymania propozycji zmiany stanowiska od ówczesnego Kierownika Katedry, prof. dr hab. Tomasza Motyla. W 2011 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku adiunkta w Katedrze Nauk Fizjologicznych.

Od początku pracy w Katedrze Nauk Fizjologicznych zostałam włączona do zespołu Prof. dr hab. Tomasza Motyla i uczestniczyłam w badaniach dotyczących molekularnych mechanizmów powstawania nowotworów w gruczole sutkowym psa oraz ich przerzutowania. W jednym z eksperymentów sprawdzano jaki wpływ ma interakcja między komórkami nowotworowymi, a makrofagami na ekspresję genów w komórkach rakowych. Badania prowadzone były na kilku liniach komórek nowotworowych psa: gruczolakoraka sutka, raka anaplastycznego, raka prostego i nowotworu sutka wrzecionowatego w ko-kulturze z makrofagami. W badaniach tych wykazano, że obecność makrofagów zwiększa migrację komórek nowotworowych, co może być spowodowane nabieraniem cech makrofagów przez komórki nowotworowe. Wzajemna interakcja pomiędzy tymi komórkami prowadziła również do zwiększonej ekspresji genów szlaku Wnt w makrofagach.

Badane były również różnice w ekspresji genów pomiędzy złośliwymi kostniakomięsakami sutka psów i łagodnymi kostniakami u tego gatunku zwierząt przy użyciu mikromacierzy DNA. Geny o zmienionej ekspresji kodowały białka biorące udział w szlakach PI3K/AKT i GLI/Hedgehog.

Przerzuty są ostatnim etapem rozwoju raka gruczołu sutkowego i zwykle prowadzą do śmierci. Porównanie ekspresji genów w liniach komórkowych gruczolakoraka wyizolowanych z gruczołu sutkowego oraz w liniach komórkowych wyizolowanych z przerzutów do płuc wykazało, że geny o zmienionej ekspresji kodują białka biorące udział w regulacji struktury i ruchliwości komórek, w cyklu komórkowym i apoptozie oraz w szlaku komórkowym zależnym od greliny.

Wymienione powyżej badania były prowadzone w ramach grantów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego:

- nr N N308 012939 p.t. „Molekularne interakcje pomiędzy makrofagami i komórkami nowotworowymi guzów sutka suk”. 2010-2013
- nr N N308 230536 p.t. „Profil transkryptomiczny komórek nowotworowych nabłonka gruczołu sutkowego suki o różnym potencjale proliferacyjnym i anty-apoptotycznym”. 2009-2012

Wyniki prowadzonych badań były opisane następujących publikacjach:

Król M., Pawłowski K.M., Majchrzak K., Gajewska M., **Majewska A.**, Motyl T. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro. BMC Vet Res. 2012; 21:16. doi: 10.1186/1746-6148-8-16.

Pawłowski K.M., **Majewska A.**, Szyszko K., Dolka I., Motyl T., Król M. Gene expression pattern in canine mammary osteosarcoma. Pol J Vet Sci. 2011;14:11-20. doi: 10.2478/v10181-011-0002-2.

Król M., Pawłowski K.M., Skierski J., Turowski P., **Majewska A.**, Polańska J., Ugorski M., Morty R.E., Motyl T. Transcriptomic "portraits" of canine mammary cancer cell lines with different phenotype, J Appl Genet. 2010; 5:169-183. doi: 10.1007/BF03195725.

Król M., Polańska J., Pawłowski K.M., Turowski P., Skierski J., **Majewska A.**, Ugorski M., Morty R.E., Motyl T. Molecular signature of cell lines isolated from canine mammary adenocarcinoma metastases to lungs. J Appl Genet. 2010; 51:37-50. doi: 10.1007/BF03195709.

Pawłowski M.K., Król M., **Majewska A.**, Badowska -Kozakiewicz A., Mol J.A., Malicka E., Motyl T. Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. J. Physiol. Pharmacol. 2009; 60, Suppl. 1:85-94

Będąc w zespole Prof. dr hab. Tomasza Motyla brałam również udział w badaniach nad komórkami macierzystymi w gruczole mlekowym krów (MaSC, z ang. mammary stem cells). Dzięki obecności i aktywności komórek MaSC możliwy jest wzrost i przebudowa gruczołu mlekowego w okresie dojrzewania i laktacji. Potencjał mammogeny u jałówek mlecznych po okresie dojrzewania jest wspomagany przez większą liczbę MaSC i wyższą aktywność czynników auto- i parakrynych gruczołu mlekowego, tworzących odpowiednią niszę dla MaSC. Analiza ekspresji genów MaSC pochodzących z gruczołu mlekowego 20-miesięcznych nieciężarnych jałówek mlecznych (Holstein-Friesian, HF) i mięsnych (Limousin, LM) wykazała wyższą ekspresję genów kodujących lokalnie syntetyzowane hormony, czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny i czynniki transkrypcyjne u rasy mlecznej. Model mikrośrodowiska gruczołu mlekowego korzystny dla MaSC związany jest z regulacją ekspresji genów zaangażowanych w utrzymanie populacji MaSC, poprzez samoodnowę, proliferację, migrację i różnicowanie komórek macierzystych, co sprzyja przebudowie tkanki gruczołowej, angiogenezie, regulacji różnicowania adipocytów wchodzących w skład zrębu gruczołu sutkowego, metabolizmowi lipidów oraz pobudzaniu szlaków sygnałowych indukowanych przez hormony steroidowe oraz insulinę. Zostały zidentyfikowane 54 miRNA wykazujące inny poziom ekspresji u rasy mlecznej HF niż u rasy mięsnej LM w tkance gruczołu mlekowego jałówek po okresie dojrzewania. Główne różnice w ekspresji miRNA w gruczole mlekowym między badanymi rasami krów były związane z regulacją szlaków sygnałowych kluczowych dla rozwoju gruczołu sutkowego, takich jak: szlak pośredniczony przez czynnik wzrostu TGF-beta, szlak insulinowy, szlak pośredniczony przez Wnt oraz szlaki zapalne.

Badania były prowadzone w ramach Grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N308 594138 p.t. „Ilościowa i transkryptomyczna charakterystyka komórek macierzystych w gruczole sutkowym bydła”. 2010 -2013

Wyniki zostały opisane w poniższych publikacjach:

Wicik Z., Gajewska M., **Majewska A.**, Walkiewicz D., Osińska E., Motyl T. Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *J Anim Breed Genet.* 2016; 133:31-42. doi: 10.1111/jbg.12172.

Osińska E, Gajewska M, Majewska A, Motyl T. Quantification of bovine mammary stem/progenitor cells by laser scanning and flow cytometry. *Animal Science Papers and Reports.* 2015; 33:5–11.

Osińska E., Wicik Z., Godlewski M.M., Pawłowski K., **Majewska A.**, Mucha J., Gajewska M., Motyl T. Comparison of stem/progenitor cell number and transcriptomic profile in the mammary tissue of dairy and beef breed heifers. *J Appl Genet.* 2014; 55:383-95. doi: 10.1007/s13353-014-0213-1.

Byłam również zaangażowana w badania transkryptomyczne mające na celu sprawdzenie ekspresji genów z wykorzystaniem metody mikromacierzy w tkance mięśniowej pochodzącej od 15-miesięcznych buhajów trzech ras krów: Limousin (LIM), holsztyńsko-fryzyjskiej (HF) i Hereford (HER). Mięśnie pochodzące od rasy LIM charakteryzowały się niską zawartością tłuszczu śródmięśniowego, a mięśnie ras HER i HF były marmurokowane i charakteryzowały się wyższą zawartością tłuszczu śródmięśniowego. Marmurkowatość mięsa jest związana z jego smakiem, soczystością i kruchością, a także bezpośrednio z zawartością tłuszczu śródmięśniowego. Uważa się, że mięso z wysokim poziomem marmurkowatości ma lepszą jakość sensoryczną. Preferencje konsumentów są często inne, wybierają mięso bez tłuszczu. Badania pozwoliły na zidentyfikowanie 144 genów których ekspresja różniła się w mięśni półścięgnistym rasy LIM w porównaniu z rasami HF i HER. Regulowane geny były zaangażowane w rozwój tkanki tłuszczowej.

Badania były prowadzone w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr N N311 123538 p.t. „Transkryptomiczne profile komórek satelitowych mięśni szkieletowych bydła” 2010 - 2012

Wyniki badań zostały opisane w poniższej publikacji:

Sadkowski T, Ciecierska A, Majewska A, Oprządek J, Dasiewicz K, Ollick M, Wicik Z, Motyl T. Transcriptional background of beef marbling - Novel genes implicated in intramuscular fat deposition. *Meat Sci.* 2014; 97:32-41. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.12.017.

Uczestniczyłam również w badaniach prowadzonych przez zespół dr hab. Katarzyny Grzelkowskiej-Kowalczyk, prof. SGGW (w Katedrze Nauk Fizjologicznych), dotyczących szlaków sygnałowych regulujących miogenezę mięśni szkieletowych, wpływu cytokin, na ten proces oraz roli mikroRNA w humoralnych mechanizmach wzajemnych oddziaływań tkanki tłuszczowej i mięśni szkieletowych.

Tkanka tłuszczowa i mięśnie szkieletowe mają kluczowe znaczenie w kontroli wzrostu i budowie ciała. W mechanizmach regulujących wzrost i rozwój tych tkanek pośredniczą czynniki humoralne uwalniane przez obie tkanki. Do czynników humoralnych zaliczane są cytokiny związane z odpowiedzią zapalną, m.in. IL-6, IL-8 i IL-15. Dodatkowo, mikroRNA (miRNA) odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu, rozwoju, a także funkcji i metabolizmu mięśni szkieletowych i tkanki tłuszczowej. Badania zespołu dr hab. Katarzyny Grzelkowskiej-Kowalczyk, prof. SGGW, w których brałam udział, miały na celu ocenę profilu wewnątrzkomórkowej ekspresji oraz wydzielanego miRNA przez

adipocyty i pierwotne mioblasty szczurze poddane różnicowaniu w obecności IL-6, IL-8 i IL-15, jako czynników humoralnych wydzielanych przez tkankę tłuszczową i mięśnie szkieletowe.

W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że modyfikacja profilu ekspresji miRNA komórek może być jednym z mechanizmów oddziaływania cytokin, jako czynników humoralnych obecnych w mikrośrodkowisku tkanki mięśniowej. IL-6, IL-8 i IL-15 obecne w środowisku zewnątrzkomórkowym szczurzych mioblastów pierwotnych RSkMC modyfikują profil ekspresji miRNA, powodując wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cząsteczek miRNA, których większość nie była dotychczas opisana w kontekście regulacji miogenezy i metabolizmu komórek mięśniowych. Cząsteczki miRNA, których ekspresja uległa zmianie pod wpływem badanych cytokin, poprzez regulację transkrypcji swoich genów docelowych, mogą wpływać na przebieg procesów komórkowych, istotnych dla prawidłowego przebiegu miogenezy i rozwoju funkcji komórek mięśniowych.

Podawane cytokiny (IL-6, IL-8 i IL-15) wpłynęły na profil miRNA w adipocytach linii 3T3-L1, spowodowały zwiększenie ekspresji pro-adipogennych cząsteczek miRNA (miR-21, miR-107, miR-143) oraz anty-adipogennej cząstki miR-221. IL-6 stymulowała również ekspresję anty-adipogennej cząsteczki miR-100, która powodowała hamowanie akumulacji lipidów w adipocytach.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu insulinopodobnego czynnika wzrostu: IGF-I oraz IL-15 jako bioaktywnych czynników obecnych w mikrośrodkowisku na profil ekspresji miRNA w różnicujących się szczurzych mioblastach pierwotnych RSkMC oraz miRNA wydzielanego przez te komórki. Analizowano również wpływ IL-15 na profil ekspresji i sekrecji miRNA w różnicujących się mysich adipocytach 3T3-L1. Ponadto, badano wpływ IL-15 na ekspresję wybranych elementów szlaku sygnałowego insuliny i IGF-I oraz natężenie translacji białek w mioblastach RSkMC i adipocytach 3T3-L1. Wykazano, że IGF-I wpływa na wewnątrzkomórkowy profil miRNA w mioblastach pierwotnych powodując m. in. wzrost ekspresji cząsteczek zaangażowanych w regulację metabolizmu i wrażliwości na insulinę, oraz modulując ekspresję miRNA o funkcjach pro- i anty-adipogennych. Sugeruje to, iż humoralne mechanizmy regulacyjne z udziałem mikroRNA mogą być obszarem dostosowania procesów komórkowych do dynamicznych warunków panujących w mikrośrodkowisku tkanki mięśniowej. Uczestniczyłam w części transkryptomicznej tych badań oraz byłam promotorem pomocniczym trzech doktorantów, którzy wykonywali ww. badania w ramach realizacji prac doktorskich.

Badania te były prowadzone w ramach grantu NCN, OPUS 5, nr: 2013/09/B/NZ9/00115, pt. „Rola wewnątrzkomórkowego i wydzielanego mikroRNA w humoralnych oddziaływaniach kontrolowanych przez IL-6, IL-8 i IL-15 pomiędzy adipocytami i mioblastami w czasie różnicowania”. 2014-2017

Przed wykonaniem głównego eksperymentu, mającego na celu zbadanie profilu miRNA wydzielanych do pożywki przez szczurze mioblasty pierwotne RSkMC oraz mysie adipocyty linii 3T3-L1, opracowałam metodę izolacji miRNA z pożywki kondycjonowanej oraz eksosomalnego miRNA. W toku badań wstępnych wykazałam, że obecność płodowej surowicy bydlęcej (FBS) w pożywkach doświadczalnych jest kluczowa, a jej brak może spowodować zmiany ekspresji miRNA w hodowlach wymagających dodatku FBS w standardowych warunkach wzrostu komórek. Doświadczenie przeprowadzono na hodowli komórkowej linii 3T3-L1 mysich adipocytów.

Metodę izolacji zewnątrzkomórkowego miRNA opracowałam korzystając ze środków przyznanych w ramach Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe zwierzę – bezpieczna żywność”, konkursu dla wiodących laboratoriów nr 500-07-023100-D00100-02,

pt.: „Opracowanie metody izolacji zewnątrzkomórkowego miRNA z pożywki kultur komórkowych”. – **byłam kierownikiem tego projektu.**

Wyniki badań były opisane w poniższych publikacjach:

Błaszczyk M., Gajewska M., Dymowska M., **Majewska A.**, Domoradzki T., Prostek A., Pingwara R., Hulanicka M., Grzelkowska-Kowalczyk K. Interleukin-6 mimics insulin-dependent cellular distribution of some cytoskeletal proteins and Glut4 transporter without effect on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Histochem Cell Biol.* 2022; 157: 525-546. doi: 10.1007/s00418-022-02091-3.

Milewska M., Domoradzki T., **Majewska A.**, Błaszczyk M., Gajewska M., Hulanicka M., Grzelkowska-Kowalczyk K. Interleukin-6 affects pacsin3, ephrinA4 expression and cytoskeletal proteins in differentiating primary skeletal myoblasts through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Cell Tissue Res.* 2020; 380:155-172. doi: 10.1007/s00441-019-03133-4.

Milewska M., Domoradzki T., **Majewska A.**, Błaszczyk M., Gajewska M., Hulanicka M., Ciecierska A., Grzelkowska-Kowalczyk K. Interleukin-8 enhances myocilin expression, Akt-FoxO3 signaling and myogenic differentiation in rat skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2019; 234:19675-19690. doi: 10.1002/jcp.28568.

Od wielu lat współpracuję również z dr hab. Małgorzatą Gajewską, prof. SGGW w ramach badań nad fizjologią gruczołu mlekowego krów oraz fizjologią i patofizjologią tkanki tłuszczowej.

Uczestniczyłam m.in. w badaniach mających na celu ustalenie różnic w profilu transkryptomycznym bydlęcych komórek nabłonka gruczołu mlekowego linii BME-UV1 hodowanych w standardowych warunkach na szalkach polisterynowych oraz w hodowli przestrzennej (3D) prowadzonej na powierzchni pokrytej Matrigelem. Komórki nabłonkowe BME-UV1 rosnące na plastiku tworzą równomierną monowarstwę pokrywającą całą powierzchnię szalek, natomiast w czasie hodowli na Matrigelu, tworzą one trójwymiarowe struktury sferyczne przypominające pęcherzyki wydzielnicze w gruczole mlekowym w czasie laktacji. Porównano profil transkryptomiczny komórek BME-UV1 rosnących w postaci monowarstwy do osiągnięcia ok. 90% konfluencji, oraz hodowanych przez 6 dni na Matrigelu. Przeprowadzona analiza transkryptyczna wykazała różnice w ekspresji 40 genów o znanych funkcjach biologicznych pomiędzy komórkami hodowanymi na podłożu polistyrenowym oraz tymi, które tworzyły struktury sferyczne na Matrigelu. Siedem spośród zidentyfikowanych genów wykazywało podwyższoną ekspresję w komórkach BME-UV1 hodowanych w systemie 3D, natomiast ekspresja 33 genów w tych warunkach była obniżona. Analiza ontologiczna wykazała, że produkty genów, których ekspresja była podwyższona w hodowlach 3D pełnią funkcje: białek pomocniczych, białek cytoszkieletu, enzymów regulujących przemiany metaboliczne, białek wiążących kwasy nukleinowe oraz białek transportowych. Geny o obniżonej ekspresji kodowały białka pełniące funkcje strukturalne i sygnałowe oraz uczestniczące w procesach rozwojowych organizmu. Wyniki wcześniejszych obserwacji morfologicznych komórek BME-UV1 hodowanych na Matrigelu sugerowały, że ekspresja genów kodujących ww. białka będzie wyższa w hodowlach 3D niż 2D. Szczegółowa analiza danych literaturowych pokazała jednak, że obecność składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. extracellular matrix) w Matrigelu może obniżać ekspresję genów kodujących białka cytoszkieletu w komórkach, natomiast dochodzi wówczas do intensyfikacji oddziaływań komórek z ECM poprzez tzw. adhezję ogniskową. Skutkuje to

wzmocnieniem oddziaływań pomiędzy białkami cytoszkieletu oraz prawidłową, szczytowo-podstawną polaryzacją komórek nabłonka gruczołu mlekowego.

Otrzymane wyniki opisane zostały w pracy:

Kozłowski M., Gajewska M., **Majewska A.**, Jank M., Motyl T. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 60 Suppl 1: 5-14

W kolejnych latach uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu tkanki tłuszczowej zrębu gruczołowego na rozwój nabłonka gruczołu mlekowego u krów. Badania prowadzone były na modelu *in vitro* opartym na współhodowli preadipocytów i adipocytów z komórkami nabłonka gruczołu mlekowego krowy (bMEC, ang. bovine mammary epithelial cells). Początkowo opracowano metodę izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych (bASC ang. bovine adipose derived stem cells) z torebki tłuszczowej nerki krowy oraz komórek nabłonka gruczołowego z wymienia krowy. W czasie prowadzenia kultur pierwotnych scharakteryzowano wyizolowane komórki na podstawie wybranych markerów. Komórki bASC wykazywały morfologię i cechy fibroblastów (posiadały ekspresję CD90 oraz wimentyny), a pod wpływem czynników adipogennych dodawanych do pożywki były zdolne do różnicowania w komórki tłuszczowe. Komórki bMEC wykazywały ekspresję białek MUC1 oraz cytokeratyn: 5, 14, 18 i 19 oraz zdolność syntezy alfa S1 kazeiny. Hodowla komórek bMEC w pożywkach kondycjonowanych pochodzących od adipocytów na różnym etapie różnicowania wykazała, że czynniki parakrynnne wydzielane przez adipocyty o wyższym stopniu zróżnicowania (z 12 i 14 dnia różnicowania) istotnie podwyższały aktywność proliferacyjną komórek bMEC oraz zmniejszały liczbę komórek apoptotycznych w populacji nabłonków. Z kolei w obecności pożywek kondycjonowanych pochodzących z hodowli preadipocytów o morfologii fibroblastów, komórki bMEC wykazywały istotnie wyższą zdolność do migracji.

Otrzymane wyniki zostały opisane w publikacji :

Dzięgielewska-Sokołowska Ż., **Majewska A.**, Prostek A., Gajewska M. Adipocyte-Derived Paracrine Factors Regulate the In Vitro Development of Bovine Mammary Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2023; 24:13348. doi: 10.3390/ijms241713348.

Od grudnia 2019 roku jestem jednym z wykonawców projektu badawczego: pt. „Wpływ różnych kwasów tłuszczowych na indukcję autofagii oraz aktywność metaboliczną hipertroficznym komórkom tłuszczowym” (nr projektu: 2018/31/B/NZ9/00658), przyznanego przez NCN w ramach konkursu OPUS 16 (okres realizacji: 2019-2023, kierownik projektu: dr hab. Małgorzata Gajewska, prof). Projekt ten ma na celu zbadanie wpływu różnego rodzaju kwasów tłuszczowych: średniołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (MC-SFA), długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych (LC-SFA), jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) na regulację procesu autofagii w hipertroficznym adipocytach, ich aktywność wydzielniczą oraz przemiany metaboliczne. W czasie realizacji zadań badawczych byłam promotorem pracy inżynierskiej studenta kierunku Biotechnologia, który wykonywał doświadczenia finansowane z ww. grantu, w ramach pracy pt: „Wpływ izomerów sprzężonych kwasów linolowych na ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy w adipocytach”, obronionej w 2023.

Współpracowałam również z dr hab. Joanną Pławińską- Czarnak z Katedry Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr 2011/03/B/NZ6/03711 pt.: „Wpływ zakażenia wirusem CAE na profil transkryptyczny gruczołu mlekowego kóz - badania z wykorzystaniem mikromacierzy

DNA”, 2012-2017. Brałam udział w części transkryptomicznej doświadczenia, której celem było porównanie profilu transkryptomicznego komórek pochodzących z mleka i krwi zdrowych kóz i kóz zakażonych wirusem zapalenie stawów i mózgu kóz (CAE) dwóch ras (polska barwna uszlachetniona i polska biała uszlachetniona).

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w publikacjach przedstawionych poniżej:

Pławińska-Czarnak J., Zarzyńska J., Bogdan J., **Majewska A.**, Karwański M., Kizerwetter-Świda M., Kaba J., Anusz K., Bagnicka E. An optimized method of RNA isolation from goat milk somatic cells for transcriptomic analysis *Ann. Anim. Sci.*, 2019; 19: 605–617 DOI: 10.2478/aoas-2019-0024

Pławińska-Czarnak J., Zarzyńska J., **Majewska A.**, Jank M., Kaba J., Bogdan J., Anusz K., Bagnicka E. Selected tissues of two Polish goat breeds do not differ on genomic level. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 2019; 37: 53-64

Pławińska-Czarnak J., **Majewska A.**, Zarzyńska J., Bogdan J., Kaba J., Anusz K., Bagnicka E. Gene Expression Profile in Peripheral Blood Nuclear Cells of Small Ruminant Lentivirus-Seropositive and Seronegative Dairy Goats in Their First Lactation. *Animals (Basel)*. 2021; 11:940. doi: 10.3390/ani11040940.

Współpracowałam również z naukowcami z innych ośrodków:

Współpracowałam z dr hab. Sebastianem Szmitem, prof CMKP. Brałam udział w badaniach transkryptomicznych dotyczący pacjentów z różnym stanem zaawansowania niewydolności serca. Porównano profil transkryptomiczny komórek jądrzastych krwi obwodowej od mężczyzn ze schyłkową niewydolnością serca (HF) z profilem od mężczyzn z bezobjawową dysfunkcją mięśnia sercowego. Analiza mikromacierzy wykazała 130 genów o obniżonej ekspresji i 15 genów o zwiększonej ekspresji u pacjentów ze schyłkową fazą HF. Niektóre z genów o obniżonej ekspresji należały do szlaków, których aktywność jest obniżona w kardiomiopatii. Zidentyfikowano również geny o podwyższonej ekspresji, które powiązano ze stopniem zaawansowania schyłkowej niewydolności serca (*CXCL16*) oraz geny zaangażowane w regulację ekspresji receptora czynnika aktywacji płytek krwi (*PTAFR*, *RBPSUH*, *MCC* i *PSMA7*).

Klasyfikacja pacjentów z ostrą niewydolnością serca (AHF) jest niezwykle trudna ze względu na różnice w obrazie klinicznym, różną etiologię, wpływ chorób współistniejących i zmienne rokowanie. W drugim doświadczeniu wykorzystano mikromacierze do sklasyfikowania 24 pacjentów z AHF na podstawie transkryptomu komórek jądrzastych krwi obwodowej tych pacjentów. Zidentyfikowano dwie odrębne klasy profili transkryptomicznych, które korelowały z prawidłowym i podwyższonym średnim stężeniem kreatyniny we krwi. Te dwie podgrupy pacjentów (n = 12) różniły się ekspresją ponad 6000 genów i 108 szlaków sygnałowych.

Badania zostały opisane w poniższych publikacjach:

Szmit S., Jank M., Maciejewski H., Grabowski M., Glowczynska R., **Majewska A.**, Filipiak K.J., Motyl T., Opolski G. Gene expression profiling in peripheral blood nuclear cells during refractory ischaemic end-stage heart failure. *J Appl Genet.* 2010; 51:353-68. doi: 10.1007/BF03208866.

Szmit S., Jank M., Maciejewski H., Grabowski M., Glowczynska R., **Majewska A.**, Filipiak K.J., Motyl T., Opolski G. Gene expression profiling in peripheral blood nuclear cells during refractory ischaemic end-stage heart failure. *J Appl Genet.* 2010; 51:353-68. doi: 10.1007/BF03208866

Współpracowałam z kilkoma naukowcami z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu.

Brałam udział w badaniach transkryptomicznych zespołu prof. dr hab. Emili Bagnickiej mających na celu identyfikację genów o zmienionej ekspresji w komórkach mięszu gruczołu mlekowego krów naturalnie zakażonych gronkowcami koagulazo-dodatnimi (coagulase-positive staphylococci;CPS) i gronkowcami koagulazo-ujemnymi (coagulase-negative staphylococci; CNS). Zapalenie gruczołu mlekowego u krów, które stanowi reakcję na zakażenie, pozostaje ciągle przyczyną poważnych strat w następstwie obniżenia produkcji i pogorszenia jakości mleka oraz kosztów. Duży problem stanowią zakażenia i podkliniczne zapalenia spowodowane przede wszystkim przez gronkowce koagulazo-dodatnie, bardziej patogenne ale również przez uważane ze mniej patogenne koagulazo-ujemne.

Analiza wyników z mikromacierzy wykazała, że zakażenie gronkowcami koagulazo-dodatnimi spowodowało znacznie silniejszą odpowiedź gospodarza niż w przypadku koagulazo-ujemnych. Wykazano również większą liczbę genów o zmiennej ekspresji u krów zakażonych gronkowcami koagulazo-dodatnimi niż koagulazo-ujemnymi. Stwierdzono istotny wzrost ekspresji genów *FOS*, *TNF* i genów kodujących białka głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC), co sugeruje, że białka kodowane przez te geny odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej w mięszu gruczołu mlekowego przeciwko bakteriom powodującym zapalenie gruczołu.

Badania były finansowane z dwóch grantów:

Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N311 075339 grant promotorski "Profil ekspresji genów układu odpornościowego w patofizjologii gruczołu sutkowego krów"

Projekt European Union from the European Regional Development Fund within the Innovative Economy Operational Programme 2007 – 2013, Projekt POIG.01.01.02- 14-090/09"Biożywność -zwierzę, żywność człowiek"

Uzyskane wyniki zostały opisane w publikacji:

Kościuczuk E., Lisowski P., Jarczak J., **Majewska A.**, Rzewuska M., Zwierzchowski L., Bagnicka E. Transcriptome profiling of Staphylococci-infected cow mammary gland parenchyma. BMC Vet Res. 2017; 13:161. doi: 10.1186/s12917-017-1088-2.

Również współpracowałam z dr Grzegorzem Juszcziem, dr hab. Pawłem Lisieckim oraz dr Adrianem Stankiewiczem z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu w ramach badań z zakresu neurobiologii z wykorzystaniem techniki mikromacierzy. Badania prowadzone były na myszach poddanych stresowi psychospołecznemu. Sprawdzono ekspresję genów w korze przedczołowej i hipokampie myszy poddawanych ostrym i powtarzającym się kontaktom społecznym o różnym czasie trwania. Przewlekły stres u myszy zwiększył ekspresję genów związanych z układem naczyniowym i uszkodzeniem mózgu. Wykazano, że podwyższyła się ekspresja genów hemoglobiny w korze przedczołowej u zwierząt poddanych stresowi przez 8 i 13 dni, co sugeruje, że te geny mogą być potencjalnymi markerami przewlekłego stresu społecznego u myszy. Najdłuższy okres stresu społecznego zmienił ekspresję największej liczby genów w hipokampie, a większość wywołanych stresem zmian w transkrypcji była odwracalna po 5 dniach odpoczynku. Wyniki sugerują, że stres może wpływać na funkcje mózgu poprzez dysfunkcję układu naczyniowego wywołaną stresem.

Wyniki badań opublikowane są w poniższych publikacjach:

Stankiewicz A.M., Goscik J., **Majewska A.**, Swiergiel A.H., Juszcak G.R. The Effect of Acute and Chronic Social Stress on the Hippocampal Transcriptome in Mice. PLoS One. 2015;10:10:e0142195. doi: 10.1371/journal.pone.0142195.

Stankiewicz A.M., Goscik J., Swiergiel A.H., **Majewska A.**, Wieczorek M., Juszcak G.R., Lisowski P. Social stress increases expression of hemoglobin genes in mouse prefrontal cortex. BMC Neurosci. 2014; 15:130. doi: 10.1186/s12868-014-0130-6.

Kolejny eksperyment w ramach współpracy miał na celu sprawdzenie wpływu podwyższonego poziomu glukokortykoidów na transkryptom hipokampa myszy po 12 godzinach leczenia kortykosteronem podawanym w aktywnej fazie cyklu dobowego. Również w tym eksperymencie zastosowana była technika mikromacierzy. Uzyskane wyniki wykazały, że odpowiedzi transkryptomiczne na glukokortykoidy są niejednorodne pod względem czasu i zależą od upływu czasu po stosowaniu steroidów, przy czym niektóre geny wykazują trwałe zmiany w ekspresji podczas 9 godzin odpoczynku. Ponadto stwierdzono, że geny regulowane przez kortykosteron są również regulowane przez stres.

Wyniki doświadczenia opisane zostały w publikacji:

Jaszczyk A., Stankiewicz A.M., Gościk J., **Majewska A.**, Jezierski T., Juszcak G.R. Overnight Corticosterone and Gene Expression in Mouse Hippocampus: Time Course during Resting Period. Int J Mol Sci. 2023; 24: 2828. doi: 10.3390/ijms24032828.

W 2017 roku odbyłam dwumiesięczny staż (1.05. – 1.07.2017) u dr Chrystal Paulos w Katedrze Mikrobiologii/Immunologii i Chirurgii na Uniwersytecie Medycznym Południowej Karoliny w Charleston w Stanach Zjednoczonych (ang. Department of Microbiology/Immunology & Surgery Medical University of South Carolina w Charleston, USA). W laboratorium dr Paulos prowadzone badania związane są z zastosowaniem limfocytów T w adoptywnej terapii zwalczania czerniaka. Adoptywny transfer komórek (ACT, ang. adoptive cell transfer) jest obiecującą strategią terapeutyczną polegającą na pobraniu limfocytów osoby cierpiącej na chorobę nowotworową. Pobrane limfocyty podlegają modyfikacji i namnożeniu *ex vivo*. Końcowy etap stanowi podanie aktywowanych limfocytów pacjentowi, od którego zostały pobrane. Celem prowadzonych badań jest uzyskanie limfocytów pamięci zdolnych do długotrwałej, przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Z tego powodu trwają badania nad uzyskaniem jak największej liczby limfocytów pamięci, które wykazują wysoki potencjał ekspansji po prowokacji specyficznym antygenem. W badaniach prowadzonych przeze mnie podczas stażu, do hodowli limfocytów dodawany był specyficzny inhibitor dla podjednostki p110δ szlaku 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K) – CAL-101. Zakładano, że ta substancja przyczyni się do powstania silniejszego fenotypu limfocytów pamięci. Uzyskane wyniki pokazały, że komórki poddane długotrwałemu traktowaniu CAL-101 wykazywały wysoki potencjał proliferacji oraz wysoką ekspresję markerów dla centralnych limfocytów pamięci CD62L, CCR7, CD127. Komórki traktowane CAL-101 produkowały małe ilości TNF- α i IFN- γ , natomiast syntetyzowały dużo IL-2. Stwierdzono niską ekspresję czynników transkrypcyjnych takich jak ROR γ t, Foxp3, Helios, natomiast wysoką ekspresję czynnika transkrypcyjnego GATA3.

Odbyty przeze mnie staż na Uniwersytecie Medycznym Południowej Karoliny (ang. Medical University of South Carolina) wzbogacił moją wiedzę teoretyczną oraz praktyczną na temat adoptywnej immunoterapii przeciwnowotworowej. Nauczyłam się hodowli oraz izolacji

limfocytów T, obsługi cytometru przepływowego oraz opracowywania wyników cytometrycznych przy pomocy programu FlowJo.

Wiedza oraz umiejętności zdobyte podczas stażu zaowocowały otrzymaniem finansowania projektu p.t. „Opracowanie metody hodowli limfocytów T regulatorowych izolowanych z krwi obwodowej psów” (nr: UMO-KNOW2017/SGGW/LAB12/5) dla wiodących laboratoriów badawczych w ramach obszaru rozwój potencjału badawczego Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”. Podczas realizacji ww. projektu prowadzone były również badania do pracy magisterskiej studentki kierunku: Biologia, Biotechnologia i Bioinżynieria Zwierząt, pani Aleksandry Szymańskiej, której byłam promotorem. Praca magisterska pt. „Aktywacja i różnicowanie psich limfocytów T regulatorowych w warunkach in vitro” została obroniona w 2019 r.

Współpracowałam również z Naukowcami z Zakładu Fiziologii Zwierząt, Instytutu Fiziologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonninie w ramach badań nad wpływem obestatyiny na rozwój jelita cienkiego u 14 dniowych szczurów. Brałam udział w części transkryptomicznej badań. Analiza ekspresji genów wykazała, że MAPK3 (kinaza białkowa aktywowana mitogenami-3) jest kluczowy genem regulujący działanie obestatyiny w przewodzie pokarmowym.

Efektem tej współpracy jest publikacja:

Słupecka-Ziemilska M., Grzesiak P., Jank M., **Majewska A.**, Rak A., Kowalczyk P., Kato I., Kuwahara A., Woliński J. Small intestinal development in suckling rats after enteral obestatin administration. PLoS One. PLoS One. 2018 ;13: e0205994. doi: 0.1371/journal.pone.0205994.

W ramach współpracy z dr hab. Krzysztofem Krawczykiem z Zakładu Wirusologii i Bakteriologii, Instytutu Ochrony Roślin -PIB w Poznaniu wykonywałam mikromacierze, które były zaprojektowane do wykrywania i identyfikacji pięciu patogenów mikrobiologicznych kukurydzy: *Pantoea ananatis*, *P. agglomerans*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, wirus karłowatej mozaiki kukurydzy (MDMV) i wirus mozaiki trzciny cukrowej (SCMV). Uzyskane wyniki wskazały, że sygnały fluorescencji z sondy patogennej i kontrolnej były dobrze rozróżnione we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach.

Wyniki zostały opisane w publikacji:

Krawczyk K., Uszczyńska-Ratajczak B., **Majewska A.**, Borodynko-Filas N. DNA microarray-based detection and identification of bacterial and viral pathogens of maize. J Plant Dis Prot. 2017 124, 577–583. doi.org/10.1007/s41348-017-0098-4

Współpracuję również z zespołem badawczym prof. dr hab. Joanny Gromadzkiej-Ostrowskiej z Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka, SGGW, która od wielu lat prowadzi badania dotyczące prozdrowotnego działania spożycia beta-glukanów z owsa w różnych schorzeniach przewodu pokarmowego. Uczestniczyłam w badaniach transkryptomicznych dotyczących wpływu beta-glukanów owsa o wysokiej (G1) i niskiej (G2) masie cząsteczkowej na profil transkryptomiczny komórek krwi obwodowej szczurów z zapaleniem jelita wywołanym podaniem lipopolisacharydu (LPS). Analiza wyników wykazała, że beta-glukan G1 wpływał na ekspresję genów kodujących białka należące do szlaków sygnałowych związanych z odpowiedzią immunologiczną, natomiast beta-glukan G2 regulował ekspresję genów związanych przede wszystkim z regulacją cyklu komórkowego. Wyniki tej analizy sugerują, że beta-glukany o wysokiej i niskiej masie cząsteczkowej mogą indukować różne mechanizmy molekularne w organizmach narażonych na bodźce zapalne, takie jak LPS.

Badania były przeprowadzone w ramach grantu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, nr NN312427440 pt. „Wpływu beta-glukanów owsa na proces zapalny w przewodzie pokarmowym”. 2011-2014

A wyniki zostały opisane w publikacji:

Błaszczuk K., Gajewska M., Wilczak J., Kamola D., **Majewska A.**, Harasym J., Gromadzka-Ostrowska J. Oral administration of oat beta-glucan preparations of different molecular weight results in regulation of genes connected with immune response in peripheral blood of rats with LPS-induced enteritis. Eur J Nutr. 2019; 58: 2859-2873. doi: 10.1007/s00394-018-1838-3.

Uczestniczę również w badaniach w ramach projektu badawczego pt. „Mechanizmy działania 1-3,1-4-beta-D-glukanu z owsa we wczesnych stadiach kancerogenezy okrężnicy” (nr: 2018/29/B/NZ9/01060) finansowanego przez NCN w ramach konkursu OPUS 15, (okres realizacji: 2019-2024). Celem projektu jest określenie zdolności beta-glukanów owsa o małej masie molowej do zahamowania rozwoju zmian nowotworowych w okrężnicy na wczesnym etapie kancerogenezy. Wyniki z mikromacierzy wykonanych przeze mnie są aktualnie analizowane.

Obecnie biorę również udział w badaniach w ramach projektu pt.: „Toksyczność nanoplastiku: wpływ na oś jelito-mózg” (nr 2019/35/B/NZ7/04133) finansowanego przez NCN,, współpracując bezpośrednio z dr hab. Katarzyna Dziendzikowska i dr hab. Kamilem Brzóska, prof. IChTJ. Aktualnie przygotowwany jest materiał badawczy do analizy transkryptomu na poziomie RNA i miRNA komórek hipokampa i kory mózgowej oraz jelita.

Kolejnym ośrodkiem z którym współpracuję jest Zakład Hodowli Bydła i Produkcji Mleka, Instytutu Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wynikiem współpracy z dr hab. Anną Zielak-Steciwo, prof. uczelni, w Zakład Hodowli Bydła i Produkcji Mleka, Instytutu Hodowli Zwierząt, UP we Wrocławiu jest publikacja:

Kesek-Wozniak M., Danielewicz K., Para J., **Majewska A.**, Smieszek A., Paszczyk B., Zielak-Steciwo A. ACACA, FASN and SCD gene expression in somatic cells throughout lactation and its relation to fatty acid profile in cow milk Anim. Sci. Pap. Rep. 2023; 41: 17-26

Badania miały na celu sprawdzenie czy zmienia się ekspresja genów kodujących kluczowe enzymy odgrywające rolę w syntezie kwasów tłuszczowych w komórkach somatycznych mleka na różnych etapach laktacji oraz czy zmiana ekspresji tych genów koreluje z profilem kwasów tłuszczowych w mleku. Badania wykazały zmiany ekspresji badanych genów na różnych etapach laktacji. Stwierdzono niewiele istotnych korelacji pomiędzy ekspresją genów, a zawartością kwasów tłuszczowych w mleku.

Od niedawna współpracuję również z dr Małgorzatą Kalisz z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w ramach projektu badawczego pt. "Identyfikacja cząsteczek oraz mechanizmów regulujących funkcje śródbłonna poprzez brązowienie okołonaczyniowej tkanki tłuszczowej indukowane kwasem all-trans retinowym u myszy Apo-E" finansowanego przez NCN w ramach konkursu SONATA-16. Dotychczas wykonałam mikromacierze w celu identyfikacji genów o zmienionej ekspresji w tkance tłuszczowej okołonaczyniowej indukowanej poprzez podanie kwasu all-trans retinowego w zwierzęcym modelu miażdżycy (myszy Apo-E). Otrzymane wyniki są obecnie w trakcie analiz.

Podsumowując moją dotychczasową pracę naukową

- jestem współautorem **49** oryginalnych prac naukowych, w tym **39** znajduje się w bazie Web of Science - Journal Citation Report, rozdziału w monografii oraz z **52** dwóch doniesień konferencyjnych,
- wyniki z **18** eksperymentów mikromacierzowych, których jestem współautorem zostały zdeponowane w bazie Gene Expression Omnibus (GEO) NCBI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>)
- uczestniczyłam w realizowaniu **12** grantów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa jednego grantu byłam kierownikiem, aktualnie biorę udział w realizacji **4** grantów
- byłam również kierownikiem dwóch projektów finansowanych przez Konsorcjum Naukowe KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność” oraz jednego wydziałowego.

Łączny **Impact Factor** (wg bazy Journal Citation Reports) **wynosi 85,661** (cały uzyskany po doktoracie), a **suma punktów MEiN** wynosi **1897** z czego **9** uzyskałam przed doktoratem. (punkty były liczone zgodnie z rokiem wydania publikacji i obowiązującymi w danym roku punktacji)

Łączna liczba cytowań (wg Web of Science): **529**, w tym **500** bez autocytowań.

Hirscha: **13**

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1 Osiągnięcia dydaktyczne

Swoją działalność dydaktyczną rozpoczęłam w trakcie studiów doktoranckich.

- W latach 2000-2003 -prowadziłam ćwiczenia dla studentów Wydziału Inżynierii Produkcji (SGGW) z przedmiotu Podstawy Produkcji Ogrodniczej.
- W latach 2001-2003 -prowadziłam ćwiczenia dla studentów Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu (SGGW) z przedmiotów Nasiennictwo ogrodnicze i Warzywnictwo
- Od 2011 r roku prowadzę ćwiczenia dla studentów Wydziału Medycyny Weterynaryjnej z przedmiotów Chemii i Biochemii
- Od 2012 roku prowadzę ćwiczenia z chemii w języku angielski na kierunku Medycyna Weterynaryjna dla studentów międzynarodowych, a od 2019 r. prowadzę również ćwiczenia z Biochemii dla studentów anglojęzycznych.
- Jestem jednym z wykładowców biochemii, prowadząc wykłady z zakresu budowy, funkcji i metabolizmu aminokwasów i białek w języku polskim i angielskim.
- Od 2020 roku zostałam koordynatorem przedmiotu Chemia i w związku z tym przygotowywałam sylabus z tego przedmiotu. Od tego momentu prowadzę również wykłady z Chemii.
- W 2010 roku uczestniczyłam również w kształceniu lekarzy weterynarii w ramach studiów podyplomowych – Studium Diagnostów Klinicznych, podczas których wygłaszałam wykład na temat zastosowania metody mikromacierzy i reakcji Real time PCR w diagnostyce.
- W 2016 roku miałam wykład i kilka ćwiczeń laboratoryjnych dotyczących molekularnych technik wykorzystywanych w badaniach naukowych dla studentów szkoły doktorskiej KNOW (w ramach Konsorcjum Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę – Bezpieczna Żywność”)

Byłam promotorem pomocniczym trzech prac doktorski:

Macieja Błaszczyka: tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ wybranych cytokin na profil mikroRNA oraz ekspresję elementów sygnałowych szlaków czynników wzrostu i białek podlegających kontroli insuliny w adipocytach 3T3-L1”. Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Data obrony: 4.03.2019

Marty Milewskiej: tytuł rozprawy doktorskiej: „Znaczenie mikroRNA w mechanizmach działania wybranych cytokin na szczurze mioblasty pierwotne RSkMC w stadium proliferacji i różnicowania”. Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Data obrony: 10-04-2018

Tomasza Domoradzkiego: tytuł rozprawy doktorskiej: „Udział wewnątrzkomórkowego i wydzielanego mikroRNA w humoralnych oddziaływaniach regulujących rozwój adipocytów i mioblastów”. Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Data obrony: 13-01-2022

Byłam promotorem prac dyplomowych na kierunku: Biologia, Biotechnologia i Bioinżynieria Zwierząt:

pracy magisterskiej Aleksandry Szymańskiej, pt.: „Aktywacja i różnicowanie psich limfocytów T regulatorowych w warunkach in vitro”, 2019

pracy inżynierskiej Kamila Okraśińskiego pt. „Wpływ izomerów sprzężonych kwasów linolowych na ekspresję genów odpowiedzialnych za metabolizm glukozy w adipocytach”, 2023

Byłam recenzentem 1 pracy magisterskiej, 1 licencjackiej i 1 jednej pracy dyplomowej w języku angielskim na kierunku Weterynaria

6.2 Działalność organizacyjna i popularyzatorska

W latach 2007-2011 oraz 2019-2020 byłam członkiem Rady Naukowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej

Byłam współorganizatorem lekcji prowadzonych w ramach festiwalu nauki:

- Rok 2017 – „Chemia od kuchni” - pokazy dla dzieci na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, SGGW
- Rok 2018 – „Wieczór z Nauką” – Spotkanie z naukowcami związanymi z Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej SGGW, oprowadzanie po laboratoriach Katedry Nauk Fizjologicznych
- Rok 2019 – „Świat pierwiastków w naszym ciele” – lekcja festiwalowa dla uczniów klas 7 i 8 szkoły podstawowej
- Rok 2022 - „Chemia od kuchni” - pokazy dla dzieci na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, SGGW

Byłam członkiem Rady Naukowej monografii naukowej BIOMEDYCYNA, ŚRODOWISKO I ZDROWIE. TEORIA I PRAKTYKA. Wydawnictwo Naukowe ArchaeGraph, Łódź - Kielce 2020

Od 2007 roku jestem Opiekunem Laboratorium Genomiki Funkcjonalnej

Od roku 2022 jestem przewodniczącą przedstawicieli Katedry Nauk Fizjologicznych w zespole roboczym ds. jakości kształcenia IMW (z powołania kierownika Katedry

W 2023 r. byłam członkiem jury prezentacji posterów w ramach konferencji studenckiej: The 8th International Scientific Conference of Veterinary Medicine Students.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

7.1. Nagrody i wyróżnienia

Nagroda im. Emila Chroboczka za pracę doktorską pt.: „Zróżnicowanie polskich lokalnych typów chrzanu (*Armoracia rusticana* Gaertn.) pod względem plonowania, cech morfologicznych, składu chemicznego oraz aktywności biologicznej” – postanowienie Kapituły Nagrody, Instytutu Warzywnictwa, im. Emila Chroboczka, Skierniewice - **styczeń 2006**

Nagroda Zespołowa Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za pionierskie prace z zakresu genomiki weterynaryjnej, a w szczególności za transkryptomiczną charakterystykę procesów fizjologicznych i patologicznych u zwierząt, laureaci: prof. dr hab. T. Motyl, dr M. Gajewska, dr M. Jank, dr M. Król, **dr A. Majewska**, dr Tomasz Sadkowski - **grudzień 2011**

Nagrody przyznane przez Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych:

Nagroda I stopnia za rok 2012 za publikację: Król M., Pawłowski K.M., Majchrzak K., Gajewska M., **Majewska A.**, Motyl T. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro . BMC Vet Res. 2012; 21;16.

Nagroda I stopnia za rok 2019 za oryginalną pracę badawczą ogłoszoną w krajowym lub zagranicznym czasopiśmie z listy JCR, w języku polskim lub obcym: Milewska M, Domoradzki T, **Majewska A** , Błaszczyk M , Gajewska M , Hulanicka M, Ciecierska A, Grzelkowska-Kowalczyk K. Interleukin-8 enhances myocilin expression, Akt-FoxO3 signaling and myogenic differentiation in rat skeletal muscle cells. Journal of Cellular Physiology 2019, 234, 19675–19690. IF: 4,522; pkt. MNiSW:100

Nadgrode za rok 2019 za wyróżniającą się monografię naukową: **Majewska A**, Domoradzki T, Grzelkowska-Kowalczyk K. rozdział pt: Transcriptomic Profiling During Myogenesis. w monografii pt. Methods in Molecular Biology 2019, 1889, 127-168 (MNiSW 80).

7.2 Kursy zawodowe

2011-2012	Studia podyplomowe: Biologia molekularna z elementami biotechnologii, Wydział Geograficzno - Biologiczny, Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
czerwiec 2008	Kurs Hodowli komórek zwierzęcych Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Zakład Cytologii
czerwiec 2007	XIX Szkoła Letnia „Postępy biologii molekularnej”, Poznań Instytut Genetyki Człowieka PAN
czerwiec 2006	Warsztaty „Podstawy filogenetyki Molekularnej”, Warszawa „MBS

.....
(podpis wnioskodawcy)