Dr n. wet. Sławomir Lewicki

AUTOREFERAT

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii
Zakład Medycyny Regeneracyjnej
i Biologii Komórki

Załącznik 1.

1 Sławomir Lewicki

e-mail: lewickis@gmail.com

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

2004 - magister inżynier Biotechnologii, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, praca magisterska pt: „Analiza polimorfizmu typu SNP na chromosomie Y w populacji polskiej i niemieckiej", wykonana w Pracowni Genetyki Molekularnej Człowieka, Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny).

2010 - doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, rozprawa doktorska pt: „Ocena wpływu jonów chromu (III) podawanych w formie chlorku lub pikolinianu na białka ścieżki przekaźnictwa insulinowego oraz receptory estrogenowe α i β", wykonana w Katedrze Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie.

Edukacja, staże zagraniczne i krajowe:

2017 - Stypendium Dyrektora WIHE na wyjazd zagraniczny - staż naukowy w Institute of Genetics and Development of Rennes (IGDR), Francja. 3 tygodnie.

2014 - 2017 - zakończenie szkolenia specjalizacyjnego z Epidemiologii dla magistrów.

3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.

2010 - 2012, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Zakład Medycyny Regeneracyjnej, stanowisko: **Starszy Specjalista Badawczo-Techniczny.**

2012 - do chwili obecnej: Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Zakład Medycyny Regeneracyjnej, stanowisko: **Adiunkt**, **Kierownik Pracowni** Inżynierii Komórkowej i Badania Procesów Regeneracji.

2012 - 2016 - Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, stanowisko: **Ekspert zewnętrzny.**

2015 - 2016 – Almamer Szkoła Wyższa, Wydział Ochrony Zdrowia, stanowisko: **Adiunkt, Wykładowca.**

2016 - do chwili obecnej: Wojskowy Instytutu Higieny i Epidemiologii, stanowisko: **Zastępca Kierownika Zakładu** Medycyny Regeneracyjnej i Biologii Komórki.

2016 - 2017 - Wyższa Szkoła Inżynierii i Zdrowia, Wydział Zdrowia, stanowisko: **Wykładowca.**

2017 - do chwili obecnej - Klinika Pediatrii, Nefrologii i Alergologii Dziecięcej, Wojskowy Instytut Medyczny, stanowisko: **Wolontariusz.**

4 Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

cykl jednotematycznych publikacji na temat:

Ocena możliwości wykorzystania preparatów z rośliny *Rhodiola kirilowii* do wspomagania funkcji układu immunologicznego w okresie ciąży i laktacji – badania na modelu mysim.

4.1 Na cykl publikacji składają się następujące pozycje:

1. **Lewicki S,** Stankiewicz W, Skopińska-Różewska E, Wilczak J, Leśniak M, Suska M, Siwicki AK, Skopiński P, Zdanowski R. Spleen content of selected polyphenols, splenocytes morphology and function in mice fed *Rhodiola kirilowii* extracts during pregnancy and lactation. Pol J Vet Sci. 2015; 18(4):847–55. doi:10.1515/pjvs.2015.0110. **IF - 0,719, MNiSW - 20.**

   Wkład w powstanie pracy: zaplanowanie badań, merytoryczny nadzór nad utrzymaniem zwierząt, pomoc w pobieraniu materiału, analiza wyników, przygotowanie wersji anglojęzycznej pracy. Udział procentowy szacuję na 60%.

2. **Lewicki S**, Bałan BJ, Skopińska-Różewska E, Zdanowski R, Stelmasiak M, Szymański Ł, Stankiewicz W. Modulatory effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts on the immune system of offspring. Exp Ther Med. 2016; 12(5):3450-8. doi: 10.3892/etm.2016.3759. **IF - 1,261, MNiSW - 15.**

   Wkład w powstanie pracy: zaplanowanie badań, merytoryczny nadzór nad utrzymaniem zwierząt, pomoc w pobieraniu materiału, analiza wyników, przygotowanie wersji anglojęzycznej pracy. Udział procentowy szacuję na 60%.

3. **Lewicki S**, Skopińska-Różewska E, Bałan BJ, Kalicki B, Patera J, Wilczak J, Wasiutyński A, Zdanowski R. Morpho-functional renal alterations in progeny of mice fed *Rhodiola kirilowii* extracts or epigallocatechin during pregnancy and lactation. J Med Food. 2017; 20(1):86-92. doi: 10.1089/jmf.2016.0126. **IF - 1,955, MNiSW - 20.**

   Wkład w powstanie pracy: zaplanowanie badań, merytoryczny nadzór nad utrzymaniem zwierząt, pomoc w pobieraniu materiału, analiza wyników, przygotowanie wersji anglojęzycznej pracy. Udział procentowy szacuję na 60%.

4. **Lewicki S,** Skopińska-Różewska E, Brewczyńska A, Zdanowski R. Administration of *Rhodiola kirilowii* extracts during mouse pregnancy and lactation stimulates innate but not adaptive immunity of the offspring. J Immunol Res. 2017; 2017:8081642. doi:10.1155/2017/8081642. **IF - 3,276, MNiSW - 25.**

   Wkład w powstanie pracy: zaplanowanie badań, merytoryczny nadzór nad utrzymaniem zwierząt, pomoc w pobieraniu materiału, wykonanie badań i analiza wyników, przygotowanie wersji anglojęzycznej pracy. Udział procentowy szacuję na 85%.

5. **Lewicki S**, Skopińska-Różewska E, Lewicka A, Zdanowski R. Long-term supplementation of *Rhodiola kirilowii* extracts during pregnancy and lactation does not affect mother health status. J Matern Fetal Neonatal Med. 2017; 2:1-7. doi: 10.1080/14767058.2017.1393069. **IF - 1,826, MNiSW - 20.**

   Wkład w powstanie pracy: zaplanowanie badań, merytoryczny nadzór nad utrzymaniem zwierząt, pomoc w pobieraniu materiału, wykonanie badań i analiza wyników, przygotowanie wersji anglojęzycznej pracy. Udział procentowy szacuję na 85%.

4.2 Omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników

Funkcjonowanie układu immunologicznego oraz możliwość modulacji jego działania były dla mnie bardzo interesującym zagadnieniem już na etapie studiów. Praca w Wojskowym Instytucie Higieny i Epidemiologii pozwoliła mi na realizację badań naukowych w tym zakresie. Trafiłem do zespołu prof. Ewy Skopińskiej-Różewskiej, która przez wiele lat zajmowała się oceną wpływu związków pochodzenia naturalnego (głównie ekstraktów z roślin) na układ immunologiczny i procesy angiogenezy. Badania prowadzone przeze mnie w tym okresie skupiały się głównie na

ocenie różnych związków pochodzenia naturalnego (w formie ekstraktów i żeli z roślin lub gotowych komercyjnie preparatów) w aspekcie zwiększania efektywności układu immunologicznego i hamowania procesów patologicznej angiogenezy. W trakcie prowadzenia tych badań pojawił się pomysł określenia możliwości wykorzystania ekstraktów z różeńca Kiryłowa (*Rhodiola kirilowii*) jako suplementu diety wspomagającego działanie układu immunologicznego, który mógłby być stosowany w okresie ciąży i laktacji. Suplement ten w założeniu miał być stosowany zamiennie z antybiotykoterapią.

Leczenie chorób bakteryjnych w okresie ciąży i laktacji jest problematyczne ze względu na negatywny wpływ antybiotyków na rozwój płodów i niemowląt. Agencja FDA (ang. Food and Drug Administration) podzieliła antybiotyki na 5 grup (A, B, C, D, X) w zależności od potencjalnego ryzyka wystąpienia działań niepożądanych u ich potomstwa. Generalnie tylko antybiotyki z grupy A są uważane za bezpieczne w okresie ciąży i laktacji [1]. Prenatalna ekspozycja na antybiotyki może modyfikować system immunologiczny u potomstwa. Potomstwo matek leczonych w czasie ciąży antybiotykami z grupy penicylin i cefalosporyn (grupa B) po stymulacji patogenem wykazuje zmniejszoną intensywność odpowiedzi swoistej, a zwiększoną intensywność odpowiedzi nieswoistej [2]. Ponadto, prenatalne narażenie na antybiotyki wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju astmy i otyłości w dzieciństwie [3].

Alternatywą dla antybiotyków i/lub sposobem na zmniejszenie ich niekorzystnego działania mogą być immunomodulatory pochodzenia roślinnego, w tym korzenie i kłącza roślin rodzaju *Rhodiola*. Rodzaj *Rhodiola* (rodzina *Crassulaceae*) składa się z ponad 200 gatunków, z których ponad 20 wykazuje właściwości lecznicze. Były one stosowane w tradycyjnej medycynie w Azji i Europie jako leki tonizujące, adaptogenne, przeciwdepresyjne i przeciwzapalne [4]. Ekstrakty z tych roślin wykazują także korzystne działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i immunomodulacyjne [5-8]. Ekstrakty z roślin *Rhodiola*, suplementowane przez 7 dni zmniejszają rozmiar infekcji u myszy, które zostały zakażone *Pseudomonas aeruginosa*. Obserwowano u tych myszy istotne zwiększenie liczby leukocytów we krwi oraz zwiększenie ich aktywności metabolicznej [9, 10]. Ekstrakty z roślin rodzaju *Rhodiola* wykazują również bezpośrednie działanie przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne w stosunku do wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) i *Mycobacterium tuberculosis* [11, 12]. Obecnie opracowywanych jest kilka nowych terapii klinicznych,

opierających się na zdolnościach wyciągów z roślin gatunków *Rhodiola* do stymulowania układu odpornościowego [13].

Kobiety w ciąży spożywają szereg produktów spożywczych zawierających znaczne ilości polifenoli (owoce, jarzyny, kakao, herbata, czekolada, kawa, herbaty ziołowe i owocowe oraz różne suplementy diety powszechnie obecne na rynku). Istnieje więc uzasadniona obawa, że równoczesne spożywanie wielu produktów roślinnych zawierających anty-angiogenne substancje może negatywnie wpłynąć na rozwój płodów i powodować różnego typu zaburzenia u dorosłego potomstwa. Choć preparaty z roślin gatunku *Rhodiola* (np. *Rhodiola rosea, Rhodiola qudrifida)* są już obecne na rynku i dopuszczone do stosowania jako suplementy diety, brak jest badań dotyczących ich ewentualnego niekorzystnego działania na angiogenezę płodową (co mogłoby prowadzić do zaburzeń rozwojowych narządów), a także ewentualnego niekorzystnego wpływu na rozwijający się układ odpornościowy potomstwa. Jeżeli okazałoby się, że ekstrakty z *Rhodiola kirilowii* nie będą miały niekorzystnego wpływu na potomstwo karmionych myszy, mogłyby, po przeprowadzeniu odpowiednich badań u ludzi, znaleźć zastosowanie w leczeniu infekcji u kobiet ciężarnych, zastępując lub uzupełniając leczenie antybiotykami.

Celem wykonanych przeze mnie badań było porównanie dwóch wyciągów: wodnego (RKW) i wodno-alkoholowego (RKW-A) otrzymanych z korzeni *Rhodiola kirilowii*. Różnica w działaniu biologicznym między tymi dwoma wyciągami polegała na tym, że wyciąg wodno-alkoholowy hamował angiogenezę indukowaną u myszy szczepu Balb/c komórkami syngenicznego nowotworu Sarcoma L-1, a wyciąg wodny nie wykazywał takiej aktywności [14]. W przeciwieństwie do wyciągu wodnego *Rhodiola kirilowii,* wyciągi wodne pozostałych badanych przez nas roślin z rodzaju *Rhodiola* (*Rhodiola rosea i Rhodiola quadrifida)*, a także wszystkie wyciągi wodno-alkoholowe, hamowały angiogenezę nowotworową. Podejrzewałem, że podawanie ciężarnym myszom wyciągu wodnego nie wpłynie negatywnie na zdrowie matek i ich potomstwa. Przypuszczenia te były analizowane w ramach grantu NCN nr 2012/05/B/NZ7/03219. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu badawczego stały się podstawą do wskazania mojego osiągnięcia naukowego (wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

Pierwszym etapem prowadzonych badań było pozyskanie materiału roślinnego i wytworzenie odpowiednich wyciągów. Było to możliwe dzięki współpracy z dr. hab. Waldemarem Buchwaldem, Kierownikiem Zakładu Botaniki, Hodowli i Agrotechniki Roślin Zielarskich Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, od którego otrzymaliśmy dwa rodzaje wyciągów: wodny (RKW, wytworzony metodą ekstrakcji wodnej) oraz 50% wodno-alkoholowy (RKW-A, wytworzony metodą perkolacji, woda/etanol). Ekstrakty były przygotowane i dostarczone do badań w formie sterylnego liofilizatu. Następnie dzięki nawiązaniu przeze mnie współpracy z dr. Jackiem Wilczakiem z Katedry Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW przeanalizowany został skład wytworzonych wyciągów. Tak przygotowane wyciągi podawane były myszom BALB/c w okresie ciąży i laktacji, od momentu wykrycia czopu kopulacyjnego do 28 dnia po urodzeniu potomstwa. Oprócz przeanalizowania składu wybranych polifenoli (salidrozydu, fisetyny, naringeniny, kemferolu, epikatechiny, luteoliny, kwercetyny, gallokatechiny, (+)-katechiny oraz kwasów: p-kumarowego, elagowego, ferulowego, chlorogenowego) w wyciągach z *Rhodiola kirilowii* oznaczano ich stężenie w wybranych tkankach i narządach matek i ich potomstwa (m.in. śledziona, nerki, wątroba, surowica, mózg, oko).

Głównym problemem badawczym była ocena efektu suplementacji wyciągami (wodnym lub 50% wodno-alkoholowym) z rośliny *Rhodiola kirilowii* myszy w okresie ciąży i laktacji na parametry zdrowotne matek i ich dorosłego potomstwa. W badaniach skupiałem się na ocenie działania układu immunologicznego, składników morfotycznych krwi oraz funkcji wybranych tkanek i narządów. Wybór tych parametrów wynikał z doświadczenia zespołu prof. Skopińskiej-Różewskiej dotyczącego prac prowadzonych z roślinnymi preparatami immunomodulującymi [15-17].

Wyniki z tej części badań przedstawiłem osobno dla myszy-matek i ich potomstwa.

Wpływ na myszy-matki

Suplementacja myszy w okresie ciąży i laktacji wodnym lub 50% wodno-alkoholowym ekstraktem z *Rhodiola kirilowii* (stężenie 20 mg ekstraktu/kg masy ciała) nie miało wpływu na średnią masę ciała w porównaniu do grupy kontrolnej (otrzymującej sterylną wodę). Nie odnotowano również różnic w średniej masie oraz indeksie masy wybranych narządów: wątroby, nerek, śledziony, mózgu oraz gałek ocznych pomiędzy badanymi grupami. Ocena makroskopowa

narządów również nie uwidoczniła niepokojących zmian w ich budowie. Elementy morfotyczne krwi (WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCHC, RDW, RDW-a, PLT, MPV) nie różniły się między grupą kontrolną, a grupami otrzymującymi wyciągi z *Rhodiola kirilowii*. Nie zauważono również różnic w populacji komórek należących do układu odporności swoistej: komórek T (CD3+, CD4+, CD8+) oraz komórek B (CD19+) we krwi. Zauważono natomiast pewne niewielkie zmiany w składzie i funkcjonowaniu komórek odporności nieswoistej. Myszy karmione ekstraktami RKW wykazywały niższy odsetek komórek z wybuchem tlenowym w granulocytach (test PhagoBurst®). Natomiast suplementacja ekstraktem RKW-A powodowała wzrost odsetka granulocytów i monocytów we krwi z wybuchem oksydacyjnym. Inne badane składniki odporności nieswoistej nie uległy zmianie (m.in. liczba i odsetek komórek NK i odsetek komórek fagocytujących). Nie zauważono również zmian w stężeniu wybranych cytokin w surowicy: Th1 (IL-2, TNF-α, INF-γ), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) Th17 (IL-17a). Opisane wyniki zostały przedstawione w pracy oryginalnej pt. Long-term supplementation of *Rhodiola kirilowii* extracts during pregnancy and lactation does not affect mother health status (**praca nr 5**) oraz w pracy Zdanowski i wsp. [18].

Pomimo braku różnic w wadze śledzion u matek karmionych wyciągami z *Rhodiola kirilowii* zaobserwowano istotne zmiany w morfologii i strukturze śledzion. Śledziony pochodzące od matek karmionych w okresie ciąży i laktacji wyciągami z *Rhodiola kirilowii* (obie grupy) zawierały istotnie niższą liczbę komórek w przeliczeniu na gram narządu. W badaniu cytometrycznym zauważono istotne obniżenie odsetka limfocytów połączone ze wzrostem odsetka monocytów oraz granulocytów w śledzionie wyłącznie w grupie otrzymującej 50% wodno-alkoholowy wyciąg z *Rhodiola kirilowii*. Nie zauważono natomiast istotnych zmian w odsetku populacji komórek odpowiedzi nieswoistej (CD335+) i swoistej (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+) między badanymi grupami. Analiza całkowitej liczby poszczególnych populacji komórek w przeliczeniu na gram narządu wykazała brak różnic w liczbie komórek CD3+ oraz CD8+ między grupami. Wykazano natomiast, że oba wyciągi zmniejszają liczbę komórek CD4+ i CD19+. Dodatkowo wyciąg wodny w istotny sposób zmniejsza całkowitą liczbę komórek NK (CD335+). Obserwowane zmiany liczby komórek w śledzionie mogłyby sugerować pewne procesy upośledzania odpowiedzi nabytej. Dlatego postanowiono zbadać zdolność do odpowiedzi komórek śledziony (głównie komórek T i B) na stymulacje mitogenami (badania *ex vivo*). Nie wykazano istotnych różnic w aktywności proliferacyjnej splenocytów

stymulowanych: lipopolisacharydem (LPS), fitohemaglutyniną (PHA) lub konkanawaliną A (ConA). Oznacza to, że funkcjonalność tych komórek, pomimo niższej liczby w śledzionie, została zachowana. Zaobserwowane, niekorzystne zmniejszenie liczby komórek splenocytów w śledzionach jest sygnałem niepokojącym, który powinien być brany pod uwagę przy długoterminowym podawaniu wyciągów z *Rhodiola kirilowii* kobietom w ciąży. Przedstawione powyżej wyniki zostały opisane w pracy oryginalnej pt. Spleen content of selected polyphenols, splenocytes morphology and function in mice fed *Rhodiola kirilowii* extracts during pregnancy and lactation (**praca nr 1**) oraz w pracy Lewicki i wsp. [19].

Obserwowane zmiany w liczbie splenocytów mogły być związane z obecnością w wyciągach z *Rhodiola kirilowii* związków polifenolowych, które utrzymywały się w śledzionie. Wykazano, że wpływ na liczbę splenocytów w śledzionie w obu badanych grupach mogła mieć kwercetyna (im wyższe stężenie tym więcej komórek, $r=0,5164$, $p<0,01$) oraz epikatechina (im wyższe stężenie tym mniej komórek, $r=-0,4595$, $p<0,05$). Zbadano również stężenia polifenoli w surowicy matek. Matki, karmione w okresie ciąży i laktacji wodnym wyciągiem z *Rhodiola kirilowii* (RKW) posiadały istotnie niższe stężenia salidrozydu, kamferolu oraz kwasu chlorogenowego, natomiast wyższe stężenia kwasu elagowego i katechiny w porównaniu do grupy RKW-A. Co ciekawe najwyższe stężenie kwercetyny znaleziono w grupie kontrolnej, podobnie jak fisetyny, która obecna była wyłącznie w grupie kontrolnej. Różnice w zawartości polifenoli w surowicy wpływały na istotne różnice w stężeniu czynników proangiogennych w surowicach matek. W grupie RWK-A zanotowano wyższe stężenie VEGF (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego) i bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów) w porównaniu do grupy kontrolnej. Uzyskanym wynikom towarzyszyła obniżona proliferacja komórek endotelialnych (HECa10) pod wpływem suplementacji pożywki wzrostowej surowicą izolowaną od matek karmionych w okresie ciąży i laktacji wodno-alkoholowym wyciągiem *Rhodiola kirilowii* (RKW-A). W grupie RKW zaobserwowano natomiast podwyższoną migrację komórek HECa10 (pożywka suplementowana surowicą matek) w porównaniu do grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki pozwalały na stwierdzenie, że suplementacja wodno-alkoholowym wyciągiem *Rhodiola kirilowii* może powodować modulację procesów angiogenezy w rozwijających się płodach. Podobną zależność obserwowałem we wcześniejszych badaniach, w których wyciąg RKW-A hamował angiogenezę nowotworową, a wyciąg RKW nie [14]. Przedstawione wyniki zostały opisane w pracy oryginalnej pt. Spleen content of selected polyphenols, splenocytes

morphology and function in mice fed *Rhodiola kirilowii* extracts during pregnancy and lactation (**praca nr 1**) oraz w pracy Zdanowski i wsp. [18].

Podsumowując, niewielkie zmiany w odporności nieswoistej (krew) oraz odpowiedzi swoistej układu immunologicznego (śledziona) oraz brak efektów ubocznych w zakresie badanych parametrów morfotycznych krwi myszy matek należy traktować jako pozytywny efekt suplementacji, przy tak długim okresie stosowania. Zwykle roślinne leki immunomodulacyjne nie stosuje się dłużej niż 2-3 tygodnie. Wynika to z faktu, że długotrwałe podawanie środków immunostymulujących może spowodować brak stymulacji układu immunologicznego, a w skrajnych sytuacjach pogorszenie jego funkcjonalności [20]. Podobne, negatywne efekty stosowania związków pochodzenia naturalnego można wywoływać podając kilka substancji immunostymulujących w jednym preparacie (badania własne, niepublikowane).

Wpływ na potomstwo

Analiza masy zwierząt nie wykazała istotnych różnic między potomstwem z grupy kontrolnej i grupy suplementowanej wodnym wyciągiem *Rhodiola kirilowii*. Średnia masa potomstwa zwierząt, którym podawano wyciąg 50% wodno-alkoholowy była o około 7% niższa w porównaniu do grupy kontrolnej ($p<0,01$). Nie zauważono istotnych różnic w oznaczanych parametrach morfotycznych krwi obwodowej (WBC, RBC, HCT, MCH, MCHC, RDW, RDW-a, PLT, MPV) między grupą kontrolną, a grupami otrzymującymi wyciągi z *Rhodiola kirilowii*. Zanotowano istotne zwiększenie stężenia hemoglobiny (HGB) w grupie suplementowanej wodnym wyciągiem *Rhodiola kirilowii* (o około 0,6 mg/dl w porównaniu do grupy kontrolnej).

Analiza wybranych składowych układu immunologicznego (zarówno odpowiedzi swoistej jak i nieswoistej) we krwi i śledzionach potomstwa, których matki były karmione w okresie ciąży i laktacji wyciągami z *Rhodiola kirilowii* wykazała istotne różnice. Zaobserwowano istotne obniżenie się średniego odsetka limfocytów krwi obwodowej (około 6%, $p<0,05$) przy jednoczesnym zwiększeniu się średniego odsetka granulocytów (około 20%, $p<0,05$) w grupie RKW (podobny trend zauważono w grupie RKW-A, jednakże nie był on znamienny statystycznie). Analiza populacji limfocytów wykazała istotne zmniejszenie się odsetka komórek CD3+ (RKW-14%, $p=0,0434$; RKW-A-10%, $p=0,0337$) i CD4+ (odpowiednio 15%, $p=0,0184$ i 13%, $p=0,0116$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto w grupie RKW odnotowano niższy odsetek komórek CD8+ i podwyższony odsetek komórek NK (CD335+) w porównaniu do

grupy kontrolnej. Nie odnotowano natomiast zmian w odsetku komórek B (CD19+) pomiędzy grupami. Istotne obniżenie się odsetka CD4+ we krwi obwodowej może świadczyć o pewnym upośledzeniu funkcjonowania odporności nabytej. W konsekwencji może to prowadzić do zaburzeń w stymulacji komórek CD19+ i produkcji przez nie swoistych przeciwciał. Częściowo wyniki te potwierdziły się w teście SRBC (immunizacja myszy krwinkami barana), w którym obserwowano dużo niższy poziom przeciwciał anty-SRBC w surowicy myszy, których matki karmione były w okresie ciąży i laktacji wodno-alkoholowym wyciągiem *Rhodiola kirilowii*. Wyjaśnienie mechanizmu osłabienia odpowiedzi nabytej w grupie RKW-A może być również związane ze zwiększonym stężeniem IL-10 w surowicy. Cytokina ta wykazuje działanie przeciwzapalne i hamuje syntezę innych prozapalnych cytokin niezbędnych do aktywacji/stymulacji układu immunologicznego do odpowiedzi na swoiste antygeny. Nie zaobserwowano takich zmian dla wyciągu wodnego (RKW). Nie zauważono również istotnych zmian w odsetku komórek T regulatorowych (CD4+, CD25+, FoxP3) oraz komórek CD4+ i CD25+ pomiędzy badanymi grupami.

Oba wyciągi *Rhodiola kirilowii* stosowane przez okres ciąży i laktacji u matek, pobudzały proces fagocytozy u ich potomstwa. Dotyczyło to zarówno zwiększenia wchłaniania opsonizowanych bakterii *E. coli* jak również zwiększenia intensywności wybuchu tlenowego stymulowanego *E. coli* i zymosanem. Co ciekawe w grupie RKW, odnotowano istotne obniżenie stężenia IL-17a w surowicy. IL-17a jest cytokiną odpowiedzialną między innymi za wspomaganie procesów fagocytozy bakterii zewnątrzkomórkowych. Wydaje się, że zaobserwowana sytuacja może mieć związek z aktywacją granulocytów przez związki polifenolowe obecne w wyciągach, która z kolei prowadzi do zmniejszenia wydzielania IL-17a tak, aby układ immunologiczny nie był „nadmiernie aktywowany". Brak dodatkowej stymulacji ze strony IL-17a mógł również doprowadzić do zmniejszenia w populacji monocytów grupy RKW odsetka komórek fagocytujących oraz komórek z wybuchem tlenowym po stymulacji zymosanem. Przedstawione powyżej wyniki zostały opisane w pracy oryginalnej pt. Administration of *Rhodiola kirilowii* extracts during mouse pregnancy and lactation stimulates innate but not adaptive immunity of the offspring (**praca nr 4**) oraz w pracy oryginalnej pt. Modulatory effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts on the immune system of offspring (**praca nr 2**).

Śledziony potomstwa myszy karmionych wyciągami z *Rhodiola kirilowii* nie różniły się masą i indeksem masy (waga śledziony/wagę myszy) oraz komórkowością w porównaniu do śledzion

uzyskanych od grupy kontrolnej. Nie zanotowano istotnych różnic w budowie morfologicznej śledzion. W badaniu cytometrycznym komórek śledzion nie zauważono istotnych różnic w odsetku komórek CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ i CD335+. W badaniu histologicznym nie zauważono istotnych różnic w liczbie i lokalizacji komórek CD4+, natomiast wykazano istotne różnice w lokalizacji tkankowej i liczbie komórek CD8+. Komórki te znajdowały się, oprócz regionów charakterystycznych (potwierdzonych dla grupy kontrolnej), także w okołonaczyniowej pochewce limfatycznej (PALS), strefie pęcherzykowej komórek B oraz w miazdze czerwonej. Dodatkowo zanotowano dużo wyższą liczbę CD8 pozytywnych komórek w preparacie, głównie w części centralnej narządu. Może to świadczyć o zwiększonej mobilności tych komórek, a co za tym idzie zwiększonej zdolności do odpowiedzi przeciwwirusowej. Suplementacja matek wyciągami z *Rhodiola kirilowii* w okresie ciąży i laktacji wpływała również na proliferację komórek stymulowaną suplementacją mitogenami (LPS, PHA i ConA). Zaobserwowano zmniejszenie się tempa proliferacji komórek w grupie RKW-A pod wpływem stymulacji LPS i PHA w porównaniu do grupy kontrolnej jak również obniżenie proliferacji w grupie RKW-A pod wpływem stymulacji ConA w porównaniu do grupy RKW. Przedstawione dane świadczą o osłabieniu zdolności do odpowiedzi układu odporności nabytej w efekcie działania wodno-alkoholowego wyciągu z *Rhodiola kirilowii*. Przedstawione powyżej wyniki zostały opisane w pracy oryginalnej pt. Modulatory effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts on the immune system of offspring (**praca nr 2)** oraz w pracy Lewicki i wsp. [21].

Zmiany w odsetku komórek krwi należących do układu odpowiedzi nabytej (głównie CD3+) sugerowały ewentualne zaburzenia dojrzewania tych komórek w grasicy. Dlatego wykonano oznaczenia wybranych parametrów grasicy u potomstwa. Średnia masa grasicy tak jak indeks grasicy nie różnił się między badanymi grupami. Nie zaobserwowano istotnych różnic w ocenie morfologicznej grasic pomiędzy grupami. Nie stwierdzono również żadnych nieprawidłowości w strukturalnej budowie zrazików, stosunku kory i rdzenia oraz zawartości komórek nabłonkowych. Nie wykryto także przerostu lub atrofii grasicy. Potomstwo myszy, których matki karmione były w okresie ciąży i laktacji wyciągami z *Rhodiola kirilowii* (RKW i RKW-A) miały znacząco niższą liczbę komórek apoptotycznych (marker M30) w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie zanotowano natomiast istotnej różnicy w liczbie komórek wykazujących syntezę IL-7. Uzyskane dane pozwalały na stwierdzenie, że wyciągi z *Rhodiola kirilowii* przedłużają

funkcjonowanie komórek grasicy u potomstwa, co może mieć istotne znaczenie w skutecznym pokonywaniu infekcji [22].

Ostatnim etapem prowadzonych badań było określenie występowania zaburzeń angiogenezy płodowej, wywołanej spożywaniem wyciągów z *Rhodiola kirilowii* przez samice w okresie ciąży i laktacji, poprzez określenie zmian w budowie i funkcji nerek ich potomstwa. Analiza morfologiczna i morfometryczna nerek została wykonana we współpracy z Zakładem Immunologii, Biochemii i Żywienia, Wydziału Nauki o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Nie wykazano istotnych różnic w masie, indeksie oraz makroskopowej budowie nerek pomiędzy badanymi grupami. Zauważono wyższy odsetek osobników posiadających stężenie kreatyniny w surowicy powyżej 0,65mg% w grupach: RKW i RKW-A. Ponadto zanotowano nieznacznie podwyższone stężenie mocznika i obniżone stężenie Cystatyny C u potomstwa, którego matki suplementowane były w okresie ciąży i laktacji 50% wodno-alkoholowym wyciągiem z *Rhodiola kirilowii.* Dane te sugerowały pewne nieprawidłowości, szczególnie w grupie RKW-A, które potwierdziły się w badaniach morfometrycznych nerek. W grupie RKW-A zaobserwowano bowiem wyższą liczbę kłębków na mm^2 i ich mniejszą średnicę, co może świadczyć o ich atrofii. Zmiany te mogły być wywołane bezpośrednio przez substancje aktywne obecne w surowicach matek i/lub pośrednio poprzez wpływ na wydzielanie czynników proangiogennych. Zaobserwowano bowiem zarówno różnice w stężeniach polifenoli w surowicy matek karmionych RKW i RKW-A (głównie katechiny i salidrozyd), jak i niższe stężenie VEGF u potomstwa matek z grupy RKW-A. Dane te potwierdziły przypuszczenia, które powstały po analizie surowic matek - wodno-alkoholowy roztwór *Rhodiola kirilowii* nie powinien być podawany długoterminowo kobietom w ciąży. Przedstawione powyżej wyniki zostały opisane w pracy oryginalnej pt. Morpho-functional renal alterations in progeny of mice fed *Rhodiola kirilowii* extracts or epigallocatechin during pregnancy and lactation (**praca nr 4**).

Podsumowując wyniki uzyskane dla potomstwa należy stwierdzić, że wyciąg wodny z *Rhodiola kirilowii* (RKW) jest mniej szkodliwy dla zdrowia potomstwa. Wniosek ten opiera się na następujących danych:

- potomstwo matek żywionych w czasie ciąży i okresu karmienia wyciągiem wodnym *Rhodiola kirilowii* wykazuje stymulację nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (granulocyty i komórki

NK) oraz niewielki spadek aktywności monocytów, bez zmian w swoistej odpowiedzi układu odpornościowego (test SRBC). W przeciwieństwie do tego, wyniki w grupie RKW-A wskazują na istotne zaburzenia w swoistej odpowiedzi układu odpornościowego;

- w RKW nie stwierdzono znaczących różnic w odpowiedzi proliferacyjnej komórek śledzion po stymulacji mitogenami (LPS i PHA) oraz niewielkie obniżenie po ConA. W przeciwieństwie do tego RKW-A zmniejsza odpowiedź proliferacyjną komórek śledzion na wszystkie mitogeny;

- oba wyciągi chroniły komórki grasicy przed apoptozą;

- potomstwo z grupy RKW, w przeciwieństwie do grupy RKW-A, nie miało istotnych różnic w strukturze i funkcji nerek;

- potomstwo z grupy RKW-A miało wyższy poziom czynników angiogennych (VEGF i bFGF) w surowicy;

- nie stwierdzono zgonów noworodków w grupie RKW i grupach kontrolnych, natomiast zaobserwowano kilka zgonów noworodków w grupie RKW-A.

Reasumując, wyniki uzyskane dla matek karmionych w okresie ciąży i laktacji wyciągiem wodnym lub 50% wodno-alkoholowym i ich potomstwa sugerują, że wyłącznie ekstrakt wodny może być w miarę bezpiecznie stosowany jako immunostymulant. Dla potwierdzenia pełnego bezpieczeństwa stosowania RKW w okresie ciąży i laktacji należałoby jednak wykonać dodatkowe badania, w których określony zostanie:

- maksymalny bezpieczny czas suplementacji preparatem

- maksymalna dawka preparatu

- korzyści wynikające ze spożywania preparatu przed infekcją i w trakcie infekcji bakteryjnych oraz wirusowych

- wpływ na organizm ludzki (badania kliniczne)

Przeprowadzenie powyższych badań powinno jednoznacznie dać odpowiedź dotyczącą bezpieczeństwa stosowania wyciągu wodnego z *Rhodiola kirilowii* na organizm matki i dziecka. W pełni bezpieczny preparat można byłoby wykorzystać jako:

- preparat chroniący organizm przed zakażeniami bakteryjno-wirusowymi;

- preparat wspomagający leczenie antybiotykowe infekcji bakteryjnych;

- preparat zastępujący podawanie antybiotyków w trakcie zakażeń bakteryjno-wirusowych.

Literatura:

1. Hecht A. Drug safety labeling for doctors. FDA Consumer, 1979; 13(8):12-13.
2. Skopińska-Różewska E, Mościcka-Wesołowska M, Wasiutyński A, Małdyk J, Malejczyk M, Pazdur J. Lymphatic system of mice born from mothers treated with ampicillin or cloxacillin during gestation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1986; 34(2):203-8.
3. Jędrychowski W, Gałaś W, Whyatt R, Perera F. The prenatal use of antibiotics and the development of allergic disease in one year old infants. A preliminary study. Int J Occup Med Environ Health. 2006; 19(1):70–6.
4. Grech-Baran M, Sykłowska-Baranek K, Pietrosiuk A. Approaches of *Rhodiola kirilowii* and *Rhodiola rosea* field cultivation in Poland and their potential health benefits. Ann Agric Environ Med. 2015; 22(2):281-5.
5. Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Anti-cellular and immunomodulatory potential of aqueous extract of *Rhodiola imbricata* rhizome. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2012; 34(3):513-8.
6. Cui JL, Guo TT, Ren ZX, Zhang NS, Wang ML. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata, R. angusta,* and *R. sachalinensis*. PLoS One. 2015; 10(3):e0118204. doi: 10.1371/journal.pone.0118204.
7. Wójcik R, Siwicki AK, Skopińska-Rózewska E, Wasiutyński A, Sommer E, Furmanowa M. The effect of Chinese medicinal herb *Rhodiola kirilowii* extracts on cellular immunity in mice and rats. Pol J Vet Sci. 2009; 12(3):399-405.
8. Zdanowski R, Lewicki S, Skopińska-Różewska E, Buchwald W, Mrozikiewicz PM, Stankiewicz W. Alcohol- and water-based extracts obtained from *Rhodiola rosea* affect differently the number and metabolic activity of circulating granulocytes in Balb/c mice. Ann Agric Environ Med. 2014; 21(1):120-3.
9. Bany J, Zdanowska D, Skopińska-Różewska E, Sommer E, Siwicki AK, Wasiutyński A. The effect of *Rhodiola rosea* extracts on the bacterial infection in mice. Centr Eur J Immunol. 2009; 34(1):35-7.
10. Skopińska-Różewska E, Stankiewicz W, Zdanowski R, Siwicki AK, Furmanowa M, Buchwald W, Wasiutyński A. The *in vivo* effect of *Rhodiola quadrifida* extracts on the antibody production, on the blood leukocytes subpopulations and on the bacterial infection in mice. Centr Eur J Immunol. 2012; 37(2):140-4.
11. Zuo G, Li Z, Chen L, Xu X. Activity of compounds from Chinese herbal medicine *Rhodiola kirilowii* (Regel) Maxim against HCV NS3 serine protease. Antiviral Res. 2007; 76(1):86-92.
12. Wong YC, Zhao M, Zong YY, Chan CY, Che CT. Chemical constituents and anti-tuberculosis activity of root of *Rhodiola kirilowii*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2008; 33(13):1561-5.
13. Khanna K, Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Golden root: A wholesome treat of immunity. Biomed Pharmacother. 2017; 87:496-502.

14. Zdanowski R, Skopinska-Różewska E, Wasiutyński A, Skopiński P, Siwicki AK, Sobiczewska E, Lewicki S, Buchwald W, Kocik J, Stankiewicz W. The effect of *Rhodiola kirilowii* extracts on tumor-induced angiogenesis in mice. Centr Eur J Immunol. 2012; 37(2):131-9.

15. Chorostowska-Wynimko J, Skopińska-Rózewska E, Sommer E, Rogala E, Skopiński P, Wojtasik E. Multiple effects of theobromine on fetus development and postnatal status of the immune system. Int J Tissue React. 2004; 26(1-2):53-60.

16. Skopińska-Różewska E, Chorostowska-Wynimko J, Rogala E, Radomska-Leśniewska D, Skopiński P, Sommer E, Siwicki AK. Caffeic acid feeding of pregnant and lactating mice influences the immune response of their progeny. Pol J Food Nutr Sci. 2004; 13(12):63-6.

17. Wasiutyński A, Siwicki AK, Siwicki AK, Bałan BJ, Sommer E, Bany J, Wąsik M, Patnicki A, Skurzak H, Skopińska-Różewska E Inhibitory effect of cocoa catechins on embryonic and tumor angiogenesis in mice. Pol J Environm Studies. 2005; 14:800-5.

18. Zdanowski R, Skopińska- Różewska E, Wilczak J, Borecka A, Lewicka A, Lewicki S. Different effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* aqueous and hydro-alcoholic extracts on their serum angiogenic activity and selected polyphenols content. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(1):17-23.

19. Lewicki S, Skopińska- Różewska E, Zdanowski R. The decrease in number of splenic lymphocytes in mice fed during pregnancy and lactation Rhodiola kirilowii concerns mainly CD19+ and CD4+ cells. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(4): 42 (4): 331-5.

20. Blach-Olszewska Z, Leszek J. Mechanisms of over-activated innate immune system regulation in autoimmune and neurodegenerative disorders. Neuropsychiatr Dis Treat. 2007; 3(3):365-72.

21. Lewicki S, Orłowski P, Krzyżowska M, Kiepura A, Skopińska-Różewska E, Zdanowski R. The effect of feeding mice during gestation and nursing with *Rhodiola kirilowii* extracts or epigallocatechin on CD4 and CD8 cells number and distribution in the spleen of their progeny. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(1):10-6.

22. Bień K, Lewicki S, Zdanowski R, Skopinska-Różewska E, Krzyżowska M. Feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts helps to preserve thymus function of their adult progeny. Pol J Vet Sci. 2016; 19(3):581–7.

5 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza powyższym osiągnięciem naukowym, które jest podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, mój dorobek naukowy obejmuje m.in. publikacje z zakresu: 1. antyangiogennych i immunomodulujących właściwości związków pochodzenia naturalnego; 2. oceny funkcjonowania układu immunologicznego u ludzi w stanach fizjologicznych i patologicznych; 3. charakterystyki *in vitro* linii nowotworowych raka nerki; 4. biotechnologii i inżynierii komórkowej.

Poniżej przedstawiam wybrane zagadnienia i osiągnięcia naukowo-badawcze, wynikiem których były publikacje w danej grupie tematycznej. Listę wszystkich moich publikacji załączyłem w załączniku: Wykaz dorobku.

1. Antyangiogenne oraz immunomodulujące właściwości związków pochodzenia naturalnego

Rośliny są źródłem wielu związków wykazujących szerokie działanie biologiczne na organizm. Z tego powodu od wieków były wykorzystywane w medycynie naturalnej w leczeniu różnorodnych chorób. W swoich badaniach skupiłem się głównie na ocenie właściwości antyangiogennych i immunomodulujących ekstraktów roślin z gatunków: *Rhodiola* (*kirilowii, rosea*), *Aloe (vera, arborescens*) i *Vaccinium macrocarpon*. Wykorzystałem także dwa preparaty będące na rynku: PERVIVO (ekstrakt alkoholowy 27 różnych ziół, w którym dominującym składnikiem jest imbir) oraz Padma 28 (kompozycja 20 ziół z Tybetu oraz 2 składników nieziołowych). Badania właściwości ekstraktów z roślin prowadziłem z wykorzystaniem zarówno modelu *in vitro* (linie komórek nowotworowych i linie zdrowe), jak i na modelu zwierzęcym (*ex vivo* i *in vivo* - myszy). Prace powstały przy współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym (prof. Urszula Demkow, prof. Aleksander Wasiutyński, dr hab. Piotr Skopiński), Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim (prof. Andrzej Krzysztof Siwicki), Zakładem Ochrony Mikrofalowej WIHE (dr hab. Wanda Stankiewicz) oraz Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich (dr hab. Waldemar Buchwald).

<u>*Rhodiola kirilowii*</u>

Rhodiola kirilowii jest rośliną występującą w wysokich partiach gór Azji i Europy. Ekstrakty z tej rośliny stosowane są w tradycyjnej medycynie chińskiej głównie do zwiększenia zdolności adaptacyjnych organizmu oraz jako substancje o działaniu antyoksydacyjnym, przeciwstresowym

i przeciwzapalnym. Ekstrakty: wodny (RKW) i wodno-alkoholowy (RKW-A) z korzeni i kłączy tej rośliny wykazują działanie stymulujące układ immunologiczny, dlatego postanowiliśmy zbadać możliwość ich zastosowania w okresie ciąży i laktacji. W badaniach wykazano, że:

- *in vitro* oba ekstrakty hamowały wzrost komórek mięsaka L1 oraz stymulowały proliferacje komórek śródbłonka linii HECa10; RKW – indukował migrację komórek HECa10 pod wpływem komórek L1, RKW-A hamował tę reakcję (badania *in vitro*).

- podawany przez 7 dni roztwór wodno-alkoholowy hamował angiogenezę wywołaną podaniem komórek nowotworowych mięsaka L1, roztwór wodny nie miał wpływu na angiogenezę.

- podawanie przez okres ciąży i laktacji: nie stwierdzono zgonów noworodków w grupie RKW i grupach kontrolnych, natomiast zaobserwowano kilka zgonów noworodków w grupie RKW-A. Oba wyciągi chroniły komórki grasicy potomstwa przed apoptozą. W obu grupach *Rhodiola kirilowii* zaobserwowano zwiększenie liczby komórek T (CD8+) oraz ich mobilności w śledzionie potomstwa. Zaobserwowano także różnice w aktywności angiogennej oraz zawartości polifenoli w surowicy matek. Oba wyciągi zmniejszały liczbę komórek CD19+ i CD4+ u matek.

W ramach tego tematu badawczego powstał także rozdział w monografii pt. „Aktywność biologiczna wyciągów z kłączy i korzeni roślin należących do rodzaju *Rhodiola* i ich składników".

Zdanowski R, Skopińska-Różewska E, Wasiutyński A, Skopiński P, Siwicki AK, Sobiczewska E, **Lewicki S**, Buchwald W, Kocik J, Stankiewicz W: The effect of *Rhodiola kirilowii* extracts on tumor-induced angiogenesis in mice. Centr Eur J Immunol. 2012; 37(2):131-9.

Zdanowski R, **Lewicki S**, Sikorska K, Żmigrodzka M, Buchwald W, Wilczak J, Skopińska-Różewska E. The influence of aqueous and hydro-alcoholic extracts of roots and rhizomes of *Rhodiola kirilowii* on the course of pregnancy in mice. Centr Eur J Immunol. 2014; 39 (4):471-5.

Bień K, **Lewicki S**, Zdanowski R, Skopinska-Różewska E, Krzyżowska M. Feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* extracts helps to preserve thymus function of their adult progeny. Pol J Vet Sci. 2016; 19(3):581–7.

Lewicki S, Orłowski P, Krzyżowska M, Kiepura A, Skopińska-Różewska E, Zdanowski R. The effect of feeding mice during gestation and nursing with *Rhodiola kirilowii* extracts or epigallocatechin on CD4 and CD8 cells number and distribution in the spleen of their progeny. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(1):10-6.

Zdanowski R, Skopińska- Różewska E, Wilczak J, Borecka A, Lewicka A, **Lewicki S**. Different effects of feeding pregnant and lactating mice *Rhodiola kirilowii* aqueous and hydro-alcoholic extracts on their serum angiogenic activity and selected polyphenols content. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(1):17-23.

Lewicki S, Skopińska- Różewska E, Zdanowski R. The decrease in number of splenic lymphocytes in mice fed during pregnancy and lactation *Rhodiola kirilowii* concerns mainly CD19+ and CD4+ cells. Centr Eur J Immunol. 2017; 42(4): 331-5.

Lewicki S, Borecka A, Antkowiak B, Lewicka A, Siwicka-Gieroba D, Zdanowski R, Skopińska- Różewska E. Suska M. Rozdział: Aktywność biologiczna wyciągów z kłączy i korzeni roślin należących do rodzaju *Rhodiola* i ich składników. w „Wybrane zagadnienia biologii i medycyny" Praca zbiorowa pod red. Ewy Skopińskiej – Różewskiej, Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, Roberta Zdanowskiego. Wydawnictwo Edycja s.c., Olsztyn. ISBN 978-83-94917-1-9, str. 7-34, 2015.

Rhodiola rosea

Ekstrakty z podziemnych części rośliny *Rhodiola rosea* (RR) są naturalnymi substancjami używanymi jako adaptogeny i leki przeciwdepresyjne. Celem pracy było zbadanie wpływu *in vivo* wodnego (RRW) i 50% wodno-alkoholowego (RRW-A) ekstraktu z *Rhodiola rosea* na liczbę i aktywność metaboliczną granulocytów krwi u myszy. Myszy karmiono przez 7 dni ekstraktami *Rhodiola rosea* w dawkach 0,05; 0,1; 0,2 lub 0,4 mg/dzień. Aktywność metaboliczną granulocytów krwi określano przez pomiar aktywności chemiluminescencyjnej zależnej od luminolu po stymulacji zymosanem. We wszystkich grupach myszy, którym podawano ekstrakt wodno-alkoholowy *R. rosea* liczba granulocytów uległa zmniejszeniu, a ich chemiluminescencja była zwiększona w porównaniu do grupy kontrolnej. Wodny ekstrakt (RRW) był nieskuteczny we wszystkich stosowanych stężeniach.

Zdanowski R, **Lewicki S,** Skopińska-Różewska E, Buchwald W, Mrozikiewicz PM, Stankiewicz W. Alcohol- and water-based extracts obtained from *Rhodiola rosea* affect differently the number and metabolic activity of circulating granulocytes in Balb/c mice. Ann Agric Environ Med. 2014; 21(1):120-3.

Aloe vera

Test angiogenezy wywołanej przez limfocyty (LIA) jest modelem miejscowej reakcji przeszczepu przeciwko gospodarzowi (GVHD), który jest markerem wczesnych zdarzeń wynikających z aktywacji limfocytów dawcy po kontakcie z pół-allogenicznymi antygenami zgodności tkankowej gospodarza. Badano wpływ doustnego podawania żelu aloesowego (z *Aloe vera*) przez 21 dni u myszy szczepu Balb/c (dawca) na zdolność do indukowania angiogenezy skórnej (test LIA) u biorców F1 Balb/c *x* C3H. Reakcje te są wywoływane przez podanie splenocytów izolowanych ze śledzion dawców (Balb/c). Neowaskularyzacja oceniana po 72 godzinach od podania komórek śledzion była istotnie zmniejszona u myszy F1, którym podano limfocyty pobrane od myszy suplementowanych aloesem w porównaniu do grupy kontrolnej. Ta obserwacja otwiera możliwość bezpiecznego i etycznie akceptowalnego użycia żelu aloesowego w zapobieganiu GVHD u osób z przeszczepami szpiku kostnego.

Skopiński P, **Lewicki S**, Bałan BJ, Kocik J, Zdanowski R, Skopińska-Różewska E, Siwicki AK. *In vivo* inhibitory effect of *Aloe vera* gel on the ability of mouse parental splenic lymphocytes to induce cutaneous angiogenesis in recipient F1 mice. Pol J Vet Sci. 2014; 17(1):131-6.

Vaccinium macrocarpon

Żurawina (*Vaccinium macrocarpon*) i suplementy diety pochodzące z żurawiny są często zalecane w leczeniu zakażeń układu moczowego, także w okresie ciąży. Produkty te zawierają silnie antyangiogenne związki chemiczne, które nie są obojętne dla rozwijającego się płodu. W niniejszej pracy oceniano wpływ podawania myszom ciężarnym i karmiącym, komercyjnie dostępny ekstrakt żurawiny amerykańskiej (Żurawit, dawka dobowa 0,88 mg) na morfologię oraz niektóre parametry śledziony i nerek u dorosłego potomstwa (6 tygodni po porodzie). Oceniano: morfometrię śledziony i nerki, fenotyp limfocytów śledziony, odpowiedź na podanie SRBC (ang. Sheep Red Blood Cells) oraz stężenie kreatyniny i mocznika w surowicy krwi u potomstwa. Śledziony z grupy otrzymującej żurawinę miały niższą liczbę guzków limfatycznych i ich większą średnicę w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza cytometryczna komórek śledziony u potomstwa, którego matki były karmione żurawiną w okresie ciąży i laktacji wykazała wyższy odsetek limfocytów CD19 + i CD8 + w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono różnicy w odpowiedzi na immunizację krwinkami czerwonymi owcy (SRBC) pomiędzy kontrolą a grupą otrzymującą żurawinę. Zaobserwowano zwiększenie średnicy kłębuszków w nerkach grupy doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano żadnych nieprawidłowości w stężeniu kreatyniny i mocznika. Wykazano natomiast wyższe stężenie VEGF i bFGF w surowicy krwi zwierząt z grupy żurawinowej w porównaniu z kontrolą. Chociaż zaobserwowane różnice między grupą kontrolną a grupą eksperymentalną nie były duże, zaleca się ostrożność w stosowaniu żurawin i ich ekstraktów w czasie ciąży, do czasu wykonania badań szczegółowych.

Bałan BJ, **Lewicki S**, AK Siwicki, Stelmasiak M, Skopiński P, Skopińska-Różewska E, A Wasiutyński, R Zdanowski Morphometric abnormalities in spleen and kidney of the progeny of mice fed American cranberry extract (*Vaccinium macrocarpon*) during pregnancy and lactation. Pol J Vet Sci. 2017; 20(1):57–65.

Aloe arborescens i Vaccinium macrocarpon

Liście aloesu drzewiastego (*Aloe arborescens*) zawierają wiele fizjologicznie aktywnych substancji o pośrednim i bezpośrednim działaniu przeciwnowotworowym. Podobne właściwości przypisuje się również żurawinie, głównie ze względu na potencjalną zdolność do modulacji procesu angiogenezy. Celem badania była ocena wpływu *in vivo* trzech dostępnych na rynku

preparatów roślinnych na proces neowaskularyzacji wywołany śródskórnym podaniem syngenicznego mięsaka linii L1 lub ksenogenicznego (ludzkiego) raka płuca i nerki. Wykazano, że oprócz właściwości immunostymulujących, preparaty aloesu i żurawiny zachowują się jak inhibitory angiogenezy w guzie.

Skopiński P, Zdanowski R, Bałan BJ, Siwicki AK, Kocik J, **Lewicki S**, Suska M, Pastewka K, Skopińska-Różewska E, Demkow U. *Aloe arborescens* and American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extracts inhibit tumor– induced cutaneous angiogenesis in mice. Centr Eur J Immunol. 2013; 38(4):480-5.

PERVIVO

Stosowane w tradycyjnej medycynie leki na bazie ziołowych ekstraktów mogą dorównywać działaniu leków syntetycznych. Celem badania była ocena wpływu karmienia myszy preparatem PERVIVO na komórkową odpowiedź immunologiczną oraz wzrost i unaczynienie syngenicznego nowotworu L-1. Badanie przeprowadzono na samicach myszy mieszańców F1 Balb/c *x* C3H (biorców komórek śledziony w teście GVH) oraz myszach Balb/c, które otrzymywały doustnie przez 3, 7 lub 14 dni 40µl /mysz /dzień) PERVIVO, rozcieńczony w wodzie 2, 8 i 32 razy (preparat zawierał 32% alkoholu etylowego). Myszom kontrolnym podawano 40µl nośnika (10% alkohol etylowy). W grupie otrzymującej PERVIVO wykazano istotną stymulację aktywności proliferacyjnej mysich splenocytów i zwiększenie aktywności chemokinetycznej mysich splenocytów w hodowli *ex vivo*. Preparat nie miał wpływu na liczbę i aktywność metaboliczną granulocytów krwi, odpowiedź immunologiczną limfocytów na obce antygeny MHC w teście LIA (angiogeneza indukowana limfocytami) oraz na masę guza. Zauważono wpływ preparatu PERVIVO na procesy angiogenezy. Z tego powodu postanowiono porównać zdolność do hamowania angiogenezy nowotworowej PERVIVO z działaniem niesteroidowego leku przeciwzapalnego sulindaku. W badaniach określano: wzrost guza, proces angiogenezy nowotworowej oraz objętość guza u myszy Balb/c, którym podskórnie przeszczepiono mięsaka linii L-1. Działanie hamujące obserwowano w grupach eksperymentalnych leczonych produktem PERVIVO lub sulindakiem. Wyniki badań wykazały, że połączony efekt badanych leków może być najlepszym sposobem na uzyskanie najsilniejszego efektu antyangiogennego i przeciwnowotworowego.

Bałan BJ, Stankiewicz W, Skopińska- Różewska E, Zdanowski R, Kocik J, **Lewicki S**, Sokolnicka I, Nowakowska J, Rogala E, Skopiński E. The effect of multi-component herbal remedy PERVIVO on cellular immunity and tumor angiogenesis in mice. Centr Eur J Immunol, 2013; 38(1):54-6.

Skopiński P, Bałan BJ, Kocik J, Zdanowski R, **Lewicki S**, Niemcewicz M, Gawrychowski K, Skopińska-Różewska E, Stankiewicz W. Inhibitory effect of herbal remedy PERVIVO and anti-inflammatory drug sulindac on L-1 sarcoma tumor growth and tumor angiogenesis in Balb/c mice. Mediat Inflamm. 2013; 2013:289789. doi: 10.1155/2013/289789.

PADMA 28

PADMA 28 jest preparatem ziołowym wykazującym szerokie spektrum działania, wywodzącym się z tradycyjnej medycyny tybetańskiej. Posiada między innymi właściwości przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przyśpieszające gojenie ran. Celem badania było określenie wpływu tego preparatu na skórną angiogenezę wywołaną przez limfocyty (test LIA) i ocenę aktywności metabolicznej granulocytów u myszy szczepu Balb/c. Myszy karmiono codziennie przez 7 dni 5,8 mg preparatu PADMA (przeliczenie dawki ludzkiej) lub 0,085 mg (dawka sugerowana wynikami wcześniejszych badań preparatów ziołowych). Odnotowano istotny wzrost liczby nowo powstałych naczyń krwionośnych w teście LIA po przeszczepieniu splenocytów pochodzących od myszy szczepu Balb/c hybrydom F1 (Balb / c *x* C3H). Zwiększenie liczby limfocytów i granulocytów krwi odnotowano tylko u myszy karmionych niższą dawką PADMA-28. Zaobserwowano znaczne hamowanie aktywności metabolicznej granulocytów krwi (test chemiluminescencji) u myszy karmionych wyższą dawką preparatu. Badania te wykazały, że preparat PADMA 28 stymuluje procesy fizjologicznej angiogenezy, ale w tym celu powinien być stosowany w znacznie niższych dawkach niż zalecane przez producentów. Wyższe dawki preparatu obniżają aktywność metaboliczną granulocytów.

Radomska-Leśniewska DM, Skopiński P, Niemcewicz M, Zdanowski R, **Lewicki S**, Kocik J, Skopińska-Różewska E, Stankiewicz W. The effect of anti-inflammatory and antimicrobial herbal remedy PADMA 28 on immunological angiogenesis and granulocytes activity in mice. Mediators Inflamm. 2013; 2013:853475. doi: 10.1155/2013/853475.

Oprócz badania gotowych preparatów ziołowych lub wyciągów z roślin w badaniach wykorzystywałem również leki i substancje chemiczne o potencjalnym charakterze anty-angiogennym lub modulującym odpowiedź układu immunologicznego. Poniżej przedstawiam syntetyczny opis prac związanych z tym zagadnieniem.

Epigallokatechina

Epigallokatechina (EGC) - jest organicznym związkiem chemicznym z grupy flawonoidów, polifenolem pochodzenia roślinnego. Występuje w znacznej ilości w zielonej herbacie. Jest silnym przeciwutleniaczem i jest uznawana za inhibitor angiogenezy. W badaniach oceniono czy

codzienne karmienie ciężarnych i karmiących myszy epigallokatechiną (EGC) w dawce 0,2 mg / kg masy, może prowadzić do nieprawidłowości w morfologii śledziony oraz zaburzeń niektórych parametrów funkcji immunologicznej ich dorosłego, 6-tygodniowego potomstwa. W badaniach morfometrycznych zauważono mniejszą liczbę grudek limfatycznych i ich większą średnicę w śledzionach potomstwa z grupy EGC w porównaniu do grupy kontrolnej. Liczba splenocytów w przeliczeniu na gram narządu była mniejsza u potomstwa z grupy EGC. Analiza cytometryczna wykazała obniżenie liczby komórek z markerami CD335+ ($p < 0,001$), CD19+ ($p < 0,01$) i CD4+ ($p < 0,05$). Nie zaobserwowano różnic w odpowiedzi humoralnej na immunizację SRBC oraz w odpowiedzi proliferacyjnej splenocytów na stymulację mitogenami: PHA, ConA i LPS.

Bałan BJ, Skopińska-Różewska E, Skopiński P, Zdanowski R, Leśniak M, Kiepura A, **Lewicki S.** Morphometric abnormalities in the spleen of the progeny of mice fed epigallocatechin during gestation and nursing. Pol J Vet Sci. 2017; 20(1):5–12.

Resweratrol

Zwyrodnienie plamki żółtej (AMD) i retinopatia cukrzycowa stanowią ważny problem chorób oczu. W obu tych schorzeniach angiogeneza odgrywa ważną rolę, dlatego poszukuje się związków naturalnych, które będą wykazywać właściwości anty-angiogenne. Resweratrol jest polifenolem występującym w skórce czerwonych winogron, czerwonym winie, orzeszkach ziemnych i innych naturalnych źródłach. Resweratrol wpływa na proliferację komórek, indukcję, różnicowanie i apoptozę w różnych liniach komórek nowotworowych. W badaniu oceniono proliferację, migrację i inwazyjność komórek śródbłonka myszy - linii HECa10. Resweratrol hamuje proliferację komórek śródbłonka w teście MTT (w stężeniu 1, 10 i 50 μM) i AlamarBlue® (przy 50 μM), a przy stężeniu 50 μM znacząco hamuje migrację komórek śródbłonka. Wykryto zależne od stężenia zmniejszenie potencjału do inwazyjności komórek HECa10 inkubowanych z resweratrolem w stężeniu 10 i 50 μM. Wyniki badań *in vitro* mogą zachęcać badaczy do określenia skuteczności stosowania tego polifenolu w praktyce klinicznej jako naturalnego i bezpiecznego środka przeciwangiogennego.

Rokicki D, Zdanowski R, **Lewicki S,** Leśniak M, Suska M, Wojdat E, Skopińska-Różewska E, Skopiński P. Inhibition of proliferation, migration and invasiveness of endothelial murine cells culture induced by resveratrol. Centr Eur J Immunol. 2014; 39 (4):449-54.

Fluorometylofosfonian izopropylu (IMPF)

Acetylocholinesteraza (AChE) i receptory cholinergiczne odgrywają ważną rolę w układzie odpornościowym. Blokowanie AChE fluorometylofosfonianem izopropylu (IMPF) może wpływać na poziom acetylocholiny (neuromediator cholinergiczny) i powodować zmiany w fizjologii różnych komórek (np. neuronów, limfocytów, makrofagów, komórek tucznych itp.). Celem badania było określenie wpływu podawania IMPF na wybrane parametry układu odpornościowego oraz na czynniki regulujące proces angiogenezy. 1, 7, 14 i 21 dni po podaniu IMPF myszom oznaczano w surowicy stężenie: wybranych cytokin (IL-2, IL-4, IL-5, IFN-γ), stężenie immunoglobulin (IgA, IgE), stężenie VEGF, bFGF, TNF-α i IFN-gamma, aktywność acetylocholinoesterazy oraz angiogenezę skórną wywołaną podaniem limfocytów (test LIA). IMPF spowodował zmiany w wydzielaniu dwóch cytokin: IL-4 i IL-5 (w porównaniu do grupy kontrolnej). W obu przypadkach statystycznie istotne różnice (wzrost IL-4 i zmniejszenie IL-5) obserwowano w 7 dniu po zatruciu IMPF. Podobnie, poziom IgE (w porównaniu z grupą kontrolną) był znacząco wyższy po 1 i 7 dniach od zatrucia. Wykazano również istotne różnice w stężeniu cytokin w surowicy. Zaobserwowano 6- i 8-krotne zwiększenie stężenia VEGF w dniach 1 i 7 eksperymentu, a także spadek (w dniach 14 i 21 po podaniu). Stężenie bFGF istotnie wzrosło wyłącznie w 1 dniu po podaniu IMPF. Obserwowano statystycznie istotne zmniejszenie stężenia IFN-gamma we wszystkich punktach czasowych. Maksymalny spadek stężenia TNF-α stwierdzono w dniach 1 i 7 po podaniu IMPF. Wykazano również istotne obniżenie liczby nowo tworzonych naczyń krwionośnych po podaniu IMPF. Wyniki wskazują, że zatrucie IMPF może powodować zmiany w stężeniach wybranych cytokin i immunoglobulin w surowicy, które mogą prowadzić do zaburzeń odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowane zmiany wydzielania cytokin angiogennych i prozapalnych mogą mieć istotny wpływ na regulację procesów angiogenezy.

Zdanowski R, Krzyżowska M, **Lewicki S**, Rutkowski P, Leśniak M, Saracyn M, Niemcewicz M, Michalski A, Kowalczyk M. Effect of isopropyl methylphosphonofluoridate (IMPF) poisoning on selected immunological parameters of angiogenesis. Ann Agric Environ Med, 2014; 21(4):733-8.

Zdanowski R, Krzyżowska M, Ujazdowska D, **Lewicki S**, Stankiewicz-Szymczak W, Skopińska-Różewska E, Brytan M, Paluch M: Th1/Th2 response after isopropyl methylphosphonofluoridate intoxication. Centr Eur J Immunol. 2012; 37(1):1-5.

Pentoksyfilina

Metyloksantyny są obecne w wielu ziołach i roślinnych produktach żywnościowych takich jak herbata, kawa lub czekolada. Pentoksyfilina - 3,7-dimetylo-l- (5-oksoheksylo) ksantyna (PTX) jest syntetyczną pochodną ksantyny. Jej biologiczne działanie związane jest głównie z układem krążenia (zwiększa przepływ krwi przez naczynia, zmniejsza lepkość krwi, hamuje agregację płytek krwi, zapobiega tworzeniu się zakrzepów). Związek ten wykazuje również właściwości przeciwzapalne. Pentoksyfilina stosowana jest w leczeniu chromania przestankowego kończyn, w chorobie niedokrwiennej serca lub owrzodzeniach niedokrwiennych kończyn. Celem badania było określenie wpływu pentoksyfiliny (stosowanej pojedynczo i w połączeniu z niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym sulindak) na proces neowaskularyzacji wywołanej podskórnym wszczepianiem komórek mięsaka typu L-1 do myszy szczepu Balb/c. Preinkubacja komórek nowotworowych przez 90. min. z różnymi stężeniami PTX spowodowała zależne od dawki zmniejszenie liczby nowo powstałych naczyń krwionośnych. Podawanie PTX u myszy-biorców komórek nowotworowych, spowolniło rozwój nowotworu i zmniejszyło jego wielkość. Obserwowano synergistyczne działanie hamujące PTX i sulindaku szóstego i trzynastego dnia po wszczepieniu mięsaka L-1 do myszy Balb/c. Uzyskane wyniki dają możliwość potencjalnego stosowania PTX jako związku zmniejszającego wzrost i angiogenezę nowotworową.

Bałan BJ, Demkow U, Skopiński P, Bychawska M, Skopińska-Różewska E, **Lewicki S,** Zdanowski R. The effect of pentoxifylline on L-1 sarcoma tumor growth and angiogenesis in Balb/c mice. Cent Eur J Immunol. 2017; 42 (2):131-9.

2. Ocena funkcjonowania układu immunologicznego u ludzi w stanach fizjologicznych i patologicznych

Układ immunologiczny jest niezwykle ważny nie tylko w kontekście eliminacji zagrożeń związanych z przedostaniem się do organizmu substancji „obcych", ale także dla prawidłowego działania organizmu. Funkcjonowanie układu immunologicznego uzależnione jest od współdziałania bardzo wielu czynników (m.in. czynniki genetyczne, środowiskowe, żywieniowe itp.). Zaburzenia funkcjonowania tego układu prowadzą do różnych chorób, które w znaczny sposób obniżają komfort życia pacjenta, a w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do śmierci. W swoich badaniach zająłem się oceną wybranych parametrów układu immunologicznego w przebiegu chorób o podłożu alergicznym (współpraca z prof. Anną Jung oraz z dr. hab.

Bolesławem Kalickim z Wojskowego Instytutu Medycznego) oraz pracowników medycznych, u których występuje zwiększone narażenie na czynniki biologiczne (współpraca z prof. Ewą Skopińską-Różewską z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii).

Choroby alergiczne

Atopia to nieprawidłowa reakcja uczulonego wcześniej organizmu na powtórne zetknięcie z antygenem. W jej wyniku może dochodzić do bardzo silnej stymulacji układu immunologicznego zarówno typu humoralnego jak i komórkowego. Do chorób atopowych zalicza się: alergiczny nieżyt nosa, atopowe zapalenie skóry (AZS), alergiczne zapalenie spojówek, astma, wstrząs anafilaktyczny i alergie pokarmowe. Głównym czynnikiem obserwowanych objawów klinicznych chorób alergicznych są przeciwciała klasy IgE. IgE łączy się ze swoistymi receptorami FcεRI, zlokalizowanymi głównie na komórkach tucznych i po powtórnym kontakcie z antygenem następuje masowe uwalnianie mediatorów stanu zapalnego (głównie histaminy). Jest wiele czynników wpływających na powstanie alergii. W moich badaniach skupiłem się na poznaniu roli układu immunologicznego oraz potencjalnym wpływie witaminy D i kotyniny na przebieg chorób alergicznych. W badaniu pilotażowym wykazaliśmy dodatnią korelację między komórkami regulatorowymi (Tregs), a 25-OHD3 tylko u dzieci z objawami alergicznymi (brak korelacji w grupie kontrolnej), przy jednoczesnym znaczącym zmniejszeniu odsetka limfocytów CD4 w tej grupie. Następnie zostało przebadanych 19 dzieci z atopowym zapaleniem skóry. Znaczącym odkryciem była wyraźnie mniejsza liczba limfocytów T regulatorowych w surowicy dzieci z atopowym zapaleniem skóry w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0{,}00001$). Nie było znaczących różnic między tymi dwiema grupami pod względem odsetka limfocytów: CD3+, CD4+, CD8+, indeksu CD4 / CD8, CD19+, CD16/56+, komórek NKT, aktywowanych limfocytów T (HLA-DR+) oraz odsetka limfocytów, monocytów, granulocytów i eozynofili. Wykazaliśmy także odwrotną zależność pomiędzy zawartością witaminy D w surowicy a odsetkiem komórek CD8+ ($p < 0{,}05$; $r = 0{,}62$) w grupie z atopowym zapaleniem skóry. W badaniu grupy dzieci z astmą (29 lub 34 dzieci) stwierdzono istotnie niższy odsetek limfocytów Treg we krwi w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie chorych na astmę obserwowano również statystycznie istotne zmniejszenie stężenia witaminy D. Nie stwierdzono istotnych różnic w innych badanych czynnikach immunologicznych (subpopulacje limfocytów, populacje WBC). Nie stwierdzono również istotnego związku między witaminą D

lub kotyniną a przebiegiem astmy, stężeniem wydychanego tlenku azotu (eNO), odsetkiem limfocytów Treg i innych czynników immunologicznych. Jednak odsetek limfocytów Treg był dodatnio skorelowany z poziomem eNO ($p < 0,02$). Nie udowodniono również wpływu witaminy D na ciężkość choroby. Podsumowując, w badaniach wykazano rolę limfocytów T regulatorowych w patogenezie wybranych chorób alergicznych u dzieci, ale nie dowiedziono istotnego wpływu witaminy D na przebieg tych chorób.

Ponadto wykonaliśmy badania pilotażowe dotyczące nietolerancji histaminy (pseudoalergia). Schorzenie to jest związane z niedostateczną degradacją egzogennej histaminy, co powoduje wystąpienie objawów klinicznych charakterystycznych dla alergii. Głównym enzymem odpowiedzialnym za degradację histaminy w macierzy pozakomórkowej jest oksydaza diaminowa (DAO). Celem niniejszej pracy była ocena stężenia DAO, morfologii krwi obwodowej, fenotypowania limfocytów (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, komórek NK, komórek NKT i aktywowanych komórek T) oraz naturalnych komórek regulatorowych Treg (nTreg) (CD4+, CD25+, CD127low i FoxP3+) u 34 pacjentów pediatrycznych z objawami alergii. Pacjentów podzielono na dwie grupy: klasyczną alergię i pseudoalergię na podstawie stężenia IgE. Stwierdzono istotnie niższe stężenie DAO w surowicy dzieci z pseudoalergią w porównaniu z grupą dzieci z alergią. Inne badane parametry nie różniły się. Co ciekawe w obu grupach zanotowano podobny poziom limfocytów nTreg. Wyniki te sugerują, że stężenie DAO w surowicy może odpowiadać za objawy kliniczne nietolerancji histaminy. Ponadto ogólny spadek liczby komórek nTreg w porównaniu z osobami zdrowymi może prowadzić do nasilenia objawów pseudoalergii.

W ramach tego tematu badawczego powstała także praca poglądowa pt. „Nowe trendy w diagnostyce i leczeniu alergii" oraz rozdział w monografii pt. „Uwarunkowania chorób alergicznych".

Kalicki B, **Lewicki S,** Stankiewicz W, Jung A, Rustecka A, Turkowska M, Rutkowski P, Bodera P, Zdanowski R. Examination of correlation between vitamin D3 (25-OHD3) concentration and percentage of regulatory T lymphocytes (FoxP3) in children with allergy symptoms. Centr Eur J Immunol. 2013; 38(1):70-5.

Lipińska-Opałka A, Wawrzyniak A, **Lewicki S**, Zdanowski R, Kalicki B. Evaluation of immune indices and serum vitamin D content in children with atopic dermatitis Adv Exp Med Biol. 2017; 1020:81-9.

Kalicki B, Wawrzyniak A, Lipińska- Opałka A, **Lewicki S**, Zdanowski R. Influence of vitamin D and cotinine on T-regulatory (Treg) cells and course of the disease in children with asthma. Adv Exp Med Biol. 2017; 1021:27-36.

Wawrzyniak A, Lipińska-Opałka A, Zdanowski R, **Lewicki S**, Murawski P, Kalicki B. Evaluation of selected immunological parameters and the concentration of vitamin D in children with asthma. Case- control study. Cent Eur J Immunol. 2017; 42(1):101-6.

Kacik J, Wróblewska B, **Lewicki S**, Zdanowski R, Kalicki B. Serum diamine oxidase in pseudoallergy in the pediatric population. Adv Exp Med Biol. 2018; 1039:35-44.

Lewicki S, Jasińska J, Kalicki B, Lewicka A, Zdanowski R. Nowe trendy w diagnostyce i leczeniu alergii. „Zeszyty Naukowe" ALMAMER Szkoła Wyższa. 2015; 76(3):7-28.

Zdanowska A, Święs Z, Zdanowski R, **Lewicki S**, Kalicki B, Stankiewicz W. Rozdział: Uwarunkowania chorób alergicznych. w Biologia Medyczna – wybrane zagadnienia" Praca zbiorowa pod red. Ewy Skopińskiej – Różewskiej oraz Andrzeja Krzysztofa Siwickiego i Roberta Zdanowskiego Studium Przygotowawcze Wydawnictw „Edycja", ISBN 978-83-88545-83-2, str. 385-406, 2013.

Ocena narażenia pracowników medycznych

Niektóre substancje produkowane przez mikroorganizmy (głównie grzyby) są w stanie modulować aktywność układu immunologicznego przez co łatwiej może dochodzić do zakażeń. Określenie potencjalnie negatywnych czynników w środowisku pracy, które mogłyby upośledzać działanie układu immunologicznego może doprowadzić do konieczności stosowania odpowiednich zabezpieczeń i dodatkowych badań oceny zdrowia. Badania zostały wykonane w ramach projektu naukowego (II.P.19 nr 42/2014/PW-PB), we współpracy z Centralnym Instytutem Ochrony Pracy. Celem badania była ocena zależności pomiędzy liczbą i składem mikroorganizmów w środowisku pracy (pracownicy medyczni vs pracownicy biurowi) a wybranymi parametrami układu immunologicznego. Odciski z podłóg i ścian zbierano zimą. Krew pobrano wiosną kolejnego roku od 40 mężczyzn w wieku od 26 do 53 lat (pracownicy ochrony zdrowia w szpitalnych oddziałach ratunkowych - SOR), którzy pracowali przez co najmniej pięć lat na obecnym stanowisku oraz od 36 mężczyzn odpowiednio dobranej grupy kontrolnej (pracownicy biurowi). Analiza jakościowa powierzchni i próbek powietrza wykazała występowanie szczepów należących do rodzajów *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. W badaniach układu immunologicznego wykonano ocenę: odsetka populacji limfocytów (CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD19 +, komórek NK, komórek NKT i aktywowanych komórek T) i naturalnych komórek regulatorowych (nTreg, CD4+, CD25+, CD127low i FoxP3+) oraz zdolność do fagocytozy i indukcji wybuchu tlenowego w komórkach fagocytujących (granulocyty i monocyty). Nie zauważono istotnych zmian w składzie odsetkowym komórek układu immunologicznego poza zmniejszonym odsetkiem komórek NK u pracowników medycznych. Nie wykazano istotnych różnic w fagocytozie granulocytów i monocytów. Wykazano korelacje pomiędzy liczbą fagocytujących monocytów we krwi a obecnością przetrwalników grzybów

(ujemna), liczbą fagocytujących monocytów we krwi a zanieczyszczeniem miejsc kontrolnych grzybami (dodatnia), pomiędzy całkowitą ilością grzybów (CFU / 25 cm2) a procentem komórek NK (dodatnia) oraz pomiędzy całkowitą ilością grzybów (CFU / 25 cm2) i odsetkiem limfocytów CD4+ (ujemna).

Lewicki S, Bielawska-Drózd A, Winnicka I, Leszczyński P, Cieślik P, Korniłłowicz-Kowalska T, Bohacz J, Jaroszuk-Ściseł J, Skopińska-Różewska E, Kocik J. Negative correlation between mycological surfaces pollution in hospital emergency departments and blood monocytes phagocytosis of healthcare workers. Centr Eur J Immunol 2015; 40(3):360-5.

Suska M, **Lewicki S**, Kiepura A, Winnicka I, Leszczyński P, Bielawska-Drózd A, Cieślik P, Kubiak L, Depczyńska D, Brewczyńska A, Skopińska-Różewska E, Kocik J. Pollution of mycological surfaces in hospital emergency departments correlates positively with blood NKT $CD3^+$ 16^+ 56^+ and negatively with $CD4^+$ cell levels of their staff. Cent Eur J Immunol 2016; 41(1):71-7.

3. Charakterystyka in vitro linii nowotworowych raka nerki

Rak nerkowokomórkowy (RCC) jest najczęstszym typem raka nerki i stanowi 3% wszystkich przypadków raka na świecie. Prognozy dla pacjentów z RCC nie są dobre. Uważa się, że ze względu na późną diagnostykę około 40% guzów tworzy przerzuty. Metastatyczny RCC jest oporny na konwencjonalne terapie, w tym chemioterapię i radioterapię. Niedawno wysunięto hipotezę, że oporność na leki, progresja choroby i nawroty zależą od komórek nowotworowych podobnych do komórek macierzystych (SCLCC), określanych również jako rakowe komórki macierzyste / komórki inicjujące nowotwór (CSC/TIC). W badaniach zająłem się charakterystyką wybranych populacji komórek zawartych w liniach komórkowych ludzkich nowotworów nerki oraz oceną rodzaju śmierci komórkowej i cyklu komórkowego w tych komórkach. Prace powstały przy współpracy z Wojskowym Instytutem Medycznym (prof. Cezary Szczylik).

Przeprowadziliśmy izolacje i określenia profilu ekspresji komórek potencjalnie wykazujących cechy macierzystych komórek nowotworowych. Następnie określono ekspresję markerów powierzchniowych CD105+ i CD133+ RCC. Wyizolowane komórki CD105+ zostały zweryfikowane pod kątem ekspresji markerów mezenchymalnych - CD24+, CD146+, CD90+, CD73+, CD44+, CD11b+, CD19+, CD34+, CD45+, HLA-DR+ i fosfatazy alkalicznej. Zastosowano test zawieszonej kropli do zbadania kohezji komórek CD105+. Wykonano test formowania sfer 3D. Przeprowadzono analizę Real-Time PCR genów uznawanych za markery macierzystości (Oct-4, Nanog i Ncam) oraz ekspresję wszystkich genów techniką mikromacierzy (Agilent GE 4x44K v2). Wyniki przedstawiono dla pierwotnych (Caki-2) i przerzutowych (ACHN) linii komórkowych raka nerki. Przerzutowe linie komórkowe RCC (ACHN i Caki-1)

wykazały wyższą zdolność tworzenia kolonii w porównaniu z pierwotnymi liniami komórkowymi RCC. Metastatyczne linie komórkowe RCC zawierają liczne subpopulacje komórek CD105+ i mają wyższą ekspresję genów macierzystości (Oct-4 i Nanog). Komórki CD105+ w warunkach hodowli 3D przyjmują trójwymiarowe struktury w kształcie winogron. Wyizolowane komórki CD105+ są pozytywne dla ludzkich markerów mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) CD90, CD73, CD44, CD146 i aktywności fosfatazy alkalicznej, ale nie dla CD24 i markerów krwiotwórczych linii CD34, CDllb, CD19, CD45 i HLA-DR. Zanotowano zmianę ekspresji 1411 genów w komórkach CD105+ raka nerkowokomórkowego (zarówno izolowanych z linii pierwotnej - Caki-2, jak i linii przerzutowej - ACHN) w porównaniu ze zdrową linią komórek nabłonka nerki (ASE-5063). Zmiany te dotyczyły wielu ważnych białek m.in.:TGF-β, Wnt / β-katenina, przejścia nabłonkowo-mezenchymalne (EMT), sygnalizacja Rapl, kinazy PI3-Akt i szlak sygnałowy Hippo, TGFB1, ERBB2 i TNF. Wyniki badań potwierdzają że wyizolowane komórki RCC-CD105+ wykazują właściwości komórek macierzystych. Komórki te mogłyby stanowić nowy cel terapii.

Zbadaliśmy występowanie populacji CD105+ i CD133+ w wybranych liniach komórkowych papilarnego raka nerki (RCC). Do wstępnej analizy wybrano następujące linie komórkowe RCC (786-O, SMKT-R2, Caki-2, 796-P, ACHN, RCC6). Kontrolą były ludzkie komórki macierzyste raka nerki (HKCSC) i komórki nerkowe pochodzenia embrionalnego (ASE-5063). Wykonano również charakterystyki komórek hodowanych w warunkach hipoksji. W liniach 769-P i RCC6 nie mogliśmy wykryć populacji CD105+. Nie znaleziono w badanych liniach komórkowych populacji podwójnie pozytywnych (CD105+ i CD 133+). Najwyższy odsetek komórek CD105+ znaleziono w linii Caki-2, które nie dały pozytywnych wyników w komórkowych testach określających macierzystość komórek. Niedotlenienie w różny sposób wpływa na wzrost komórek RCC i zmniejsza macierzystość komórek nowotworowych raka nerki. Występowanie białek uznawanych za markery macierzystych komórek nowotworowych RCC - CD105+ i CD133+ nie jest wyznacznikiem funkcjonalnej macierzystości komórek. Należałoby poszukać nowych białek lepiej definiujących komórki nowotworowe o cechach komórek macierzystych.

Pacjenci z rakiem nerki, u których rozwinęła się niedoczynność tarczycy podczas leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej (TKI), mają statystycznie większe szanse na dłuższe życie. Postanowiliśmy określić wpływ trójjodotyroniny (T3) oraz receptora dla tego hormonu (TRβ) na wybrane cechy ludzkich linii komórkowych raka nerek izolowanych z guzów pierwotnych

i przerzutowych. Receptor hormonu tarczycy jest powszechnie eksprymowany w ludzkich liniach komórkowych raka nerki. Jego poziom jest zwiększony w liniach Caki-2, RCC6, SKRC-42, SKRC-45. Poziom mRNA receptora hormonu tarczycy w komórkach 769-P, ACHN, HKCSC i HEK293 jest znacznie obniżony. Białko receptora hormonu tarczycy (TRβ) było obecne w dużej ilości w cytoplazmie komórek 786-O, Caki-2, RCC6 i SKRC-45 oraz w jądrze SKRC-42, ACHN, 769-P i rakowych komórkach macierzystych. Trijodotyronina miała wpływ na proliferację komórek HKCSC, Caki-2, ASE, ACHN, SK-RC-42, SMKT-R2, Caki-1, 786-0 i SK-RC-45. Inhibitor kinazy tyrozynowej i sunitynib bezpośrednio hamuje proliferację komórek RCC, podczas gdy antagonista receptora hormonu tarczycy 1-850 (CAS 251310-57-3) ma mniej znaczący wpływ. Stymulacja T3 nie znosi hamującego działania sunitynibu. Komórki nowotworowe raka nerki hipostymulowane T3 mogą być bardziej wrażliwe na hamujące działanie kinazy tyrozynowej. Natomiast brak wrażliwości komórek nowotworowych na modulujący proliferację wpływ hormonu T3 może być związany z deregulacją szlaków VHL i / lub c-Met. Wykazane różnice ekspresji TRβ oraz odpowiedzi komórek raka nerkowokomórkowego na stymulację T3 mogą stanowić istotne przesłanki do opracowania nowych metod leczenia tego typu nowotworu.

Matak D, Brodaczewska KK, Szczylik C, Koch I, Myszczyszyn A, **Lewicki S,** Szymanski L, Zdanowski R, Czarnecka AM. Functional significance of CD105 positive cells in papillary renal cell cancer. BMC Cancer. 2017; 17:21. doi: 10.1186/s12885-016-2985-7.

Khan MI, Czarnecka AM, **Lewicki S**, Helbrecht I, Brodaczewska K, Koch I, Zdanowski R, Krol M, Szczylik C. Comparative gene expression profiling of primary and metastatic renal cell carcinoma cancer stem cell. Plos One. 2016; 11(11):e0165718. doi: 10.1371/journal.pone.0165718.

Czarnecka AM, Matak D, Szymański Ł, Czarnecka KH, **Lewicki S**, Zdanowski R, Brzeziańska-Lasota E, Szczylik C. Triiodothyronine regulates cell growth and survival in renal cell cancer. Int J Oncol. 2016; 49(4):1666-78.

4. Biotechnologia i inżynieria komórkowa

Prace powstały przy współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym (prof. Artur Kamiński, dr hab. Piotr Skopiński, dr hab. Ireneusz Grudziński, dr hab. Tomasz Grzela) oraz Centrum Onkologii (prof. Zygmunt Pojda). Zebrane w tym punkcie prace dotyczą różnych tematów badawczych. Łączą je użyte techniki badawcze (monitorowanie różnych aspektów metabolizmu komórek w hodowli *in vitro*).

Liposomy

Liposomy zbudowane są z dwuwarstwy lipidowej, która imituje błonę komórkową. Mogą one przenosić zarówno związki hydrofilowe, jak i hydrofobowe. Liposomy stosuje się do enkapsulacji związków czynnych. Wydłuża to ich czas przebywania w organizmie i umożliwia stopniowe uwalnianie i/lub ukierunkowane dostarczanie substancji. Ważne obszary zastosowań klinicznych liposomów to leczenie nowotworów, podawanie antybiotyków i medycyna regeneracyjna. Rozmiar i ładunek liposomów odgrywa ważną rolę w ich dystrybucji w organizmie. W dostępnej literaturze jest wiele prac poświęconych leczeniu różnych chorób przez liposomy, natomiast niewiele informacji dotyczących wpływu liposomów na komórki macierzyste i komórki progenitorowe. W badaniach opracowano technologię wytwarzania liposomów. Oceniano wpływ liposomów wytworzonych metodą konwencjonalną, o różnym ładunku błony zewnętrznej, na wzrost mezenchymalnych i macierzystych komórek krwi izolowanych z pępowiny. Neutralne i dodatnio naładowane liposomy wykazywały niekorzystny wpływ na proliferację komórek macierzystych. Wykonane badania pozwoliły na selekcję ujemnie naładowanych liposomów do dalszych doświadczeń, jako jedynego rodzaju liposomów, który nie wpływa na proliferację komórek macierzystych.

Lewicki S, Leśniak M, Machaj E, Antos-Bielska M, Trafny E, Kocik J, Pojda Z. Physical properties and biological interactions of liposomes developed as a drug carrier in the field of regenerative medicine. J Liposome Res 2017; 27(2):90-8.

Nanocząstki żelaza zamknięte w szkielecie węglowym

Nanocząstki żelaza zamknięte w szkielecie węglowym (CEINs) kwalifikuje się jako metalo-nieorganiczne nanomateriały hybrydowe. Stanowią one dobry materiał do zastosowań biomedycznych. W badaniu oceniano metabolizm komórek i efekt cytotoksyczny w komórkach HECa10 (śródbłonek mysi) wywołany dodatkiem CEINs zsyntetyzowanych metodą łuku węglowego. CEINs zostały scharakteryzowane jako pierwotne (średnica pomiędzy 47 a 56 nm) i hydrodynamiczne (średnica między 270 a 460 nm). Badania cytotoksyczności i internalizacji CEINs zostały przeprowadzone w stężeniu (0,0001 -100 μg/ml). Inkubacja z CEINs przez 24h spowodowała istotne zmiany potencjału Zeta w komórkach, które można uznać za kluczowy czynnik wpływający na transport błony, dystrybucję w komórce i cytotoksyczność tych nanocząstek. Wykazano, że CEINs wnikały do komórek śródbłonka poprzez szlak endocytarny, a nie przez dyfuzję bierną. CEINs lokalizowały się w komórce na błonie komórkowej,

w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze komórkowym. W badania wykazano, że CEINs indukują cytotoksyczność w sposób zależny od dawki. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy podkreślają znaczenie charakterystyki fizykochemicznej CEINs w badaniu magnetycznych interakcji między nanocząsteczkami a komórkami śródbłonka, ponieważ w modelach *in vitro* aglomeraty CEINs mogą sedymentować w różnym tempie.

Cywinska MA, Bystrzejewski M, Poplawska M, Kosmider A, Zdanowski R, **Lewicki S,** Fijalek Z, Ostrowska A, Bamburowicz M, Cieszanowski A, Grudzinski IP. Internalization and cytotoxicity effects of carbon-encapsulated iron nanoparticles in murine endothelial cells: Studies on internal dosages due to loaded mass agglomerates. Toxicol In Vitro. 2016; 34:229-36.

Owodnia

Owodnia uważana jest za bogate źródło czynników sprzyjających regeneracji tkanek. Wykazuje ona również pewne właściwości antyangiogenne. Jednakże, ze względu na procedury pobrania błony owodniowej może być ona narażona na zakażenia patogenami, co zmniejsza możliwość wykorzystania owodni jako opatrunku. Celem badania była ocena dodania do pożywki owodni poddanej lub nie poddanej procesowi sterylizacji radiacyjnej na proliferację komórek śródbłonka HECa10 *in vitro*. Dodatkowo zbadano wpływ formy dodania owodni do hodowli (skrawki lub homogenat). Wpływ owodni na proliferację komórek HECa10 oceniano za pomocą odczynnika AlamarBlue®. Skrawki owodni nie poddane sterylizacji radiacyjnej znacząco stymulowały ($p < 0,05$) proces proliferacji komórek HECa10. Natomiast owodnia poddana sterylizacji radiacyjnej znacznie zmniejszała proliferację komórek HECa10 ($p < 0,001$) w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Nie zaobserwowano różnicy między grupą kontrolną a hodowlami, do których dodano niesterylny homogenat tkanek owodniowych. Zaobserwowano natomiast istotnie niższą proliferację komórek HECa10 w hodowlach komórkowych zawierających homogenat błony owodniowej sterylizowanej radiacyjnie. Przedstawione wyniki wskazują, że metoda sterylizacji radiacyjnej nie jest odpowiednią metodą do sterylizacji błony owodniowej, używanej jako element opatrunku stymulującego angiogenezę.

Skopiński P, Zdanowski R, Grzela T, Kamiński A, **Lewicki S**, Skopińska-Różewska E, Stankiewicz W: The influence of sterilized and non-sterilized amniotic dressings on the proliferation of endothelial cells *in vitro.* Centr Eur J Immunol. 2012; 37(2): 114-8.

Skóra i osierdzie

Gojenie się ran jest bardzo dynamicznym procesem, umożliwiającym przywrócenie integralności fizycznej tkanki po urazie. Wymaga ono wysoce skoordynowanej współpracy wielu typów komórek. Jednym z dobrze tolerowanych przez organizm pacjentów i możliwych do wykorzystania materiałów są skóra i elementy serca (osierdzie) uzyskane w trakcie pobierania narządów do przeszczepu od dawców. Taki rodzaj opatrunku wymaga jednakże skutecznej metody sterylizacji, tak aby z jednej strony można było zapobiec zakażeniom leczonej rany, a z drugiej zachowane były wszystkie walory biologiczne takiego opatrunku. Celem naszych badań było porównanie wpływu dwóch materiałów: skóry i osierdzia poddanych lub nie poddanych sterylizacji radiacyjnej. Proliferację komórek śródbłonka HECa10 *in vitro*, mierzono za pomocą AlamarBlue®. Wykazaliśmy stymulację proliferacji komórek HECa10 dla wszystkich użytych materiałów, z wyjątkiem wysterylizowanego osierdzia, w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Sterylizacja radiacyjna jest odpowiednią metodą wytworzenia jałowego opatrunku ze skóry, natomiast nie nadaje się w przypadku sterylizacji osierdzia.

Zdanowski R, Stankiewicz W, Kamiński A, Grzela T, Skopiński P, **Lewicki S,** Skopińska-Różewska E. The effect of sterilization by irradiation of human pericardium and skin frozen tissues on their ability to influence the proliferation of endothelial cells *in vitro.* Centr Eur J Immunol. 2012; 37(2):119-22.

W ramach tego tematu badawczego powstała także praca poglądowa pt. „Role of α7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways" oraz 4 rozdziały w monografiach pt. „Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) charakterystyka i możliwość zastosowania w leczeniu choroby popromiennej; Charakterystyka głównych typów chorobotwórczych szczepów Escherichia Coli; Białko CTAGE5 związane z pierwotnymi chłoniakami skóry T-komórkowymi – jako nowy antygen nowotwór/jądro; Charakterystyka wybranych właściwości biosurfaktantów, metody ich syntezy i możliwości zastosowania".

Zdanowski R, Krzyżowska M, Ujazdowska D, Lewicka A, **Lewicki S.** Role of α7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. Centr Eur J Immunol 2015; 40(3):373-9.

Leśniak M, Zdanowski R, **Lewicki S**, Suska M. Rozdział: Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) charakterystyka i możliwość zastosowania w leczeniu choroby popromiennej. w „Biologia Medyczna – wybrane problemy" Praca zbiorowa pod red. Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, Ewy Skopińskiej – Różewskiej, Roberta Zdanowskiego. Wydawnictwo Edycja s.c., ISBN 978-83-88545-89-4, str. 399-306, 2014.

Turkowska M, Rzewuska M, Zdanowski R, **Lewicki S**, Suska M. Rozdział: Charakterystyka głównych typów chorobotwórczych szczepów Escherichia Coli. w „Biologia Medyczna – wybrane zagadnienia" Praca zbiorowa pod red. Ewy Skopińskiej – Różewskiej oraz Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, Roberta Zdanowskiego Studium Przygotowawcze Wydawnictw „Edycja", ISBN 978-83-88545-83-2, str. 341-358, 2013.

Ujazdowska D, **Lewicki S**, Turkowska M, Zdanowski R. Rozdział: Białko CTAGE5 związane z pierwotnymi chłoniakami skóry T-komórkowymi – jako nowy antygen nowotwór/jądro w: „Wpływ czynników endogennych i egzogennych na układ odpornościowy." Praca zbiorowa pod red. Ewy Skopińskiej – Różewskiej oraz Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, Studium Przygotowawcze Wydawnictw „Edycja", ISBN 978-83-885-74-0, str. 257-276, 2012.

Suska M, Adamczak M, **Lewicki S**, Turkowska M, Zdanowski R. Rozdział: Charakterystyka wybranych właściwości biosurfaktantów, metody ich syntezy i możliwości zastosowania. w „Biologia Medyczna – wybrane zagadnienia" Praca zbiorowa pod red. Ewy Skopińskiej – Różewskiej oraz Andrzeja Krzysztofa Siwickiego, Roberta Zdanowskiego Studium Przygotowawcze Wydawnictw „Edycja", ISBN 978-83-88545-83-2, str. 301-320, 2013.

Sławomir Lewicki