

AUTOREFERAT PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Dr Sylwia Wrotek
Zakład Immunologii UMK

1. **Imiona i nazwisko:** Sylwia Elżbieta Wrotek

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

2000 rok tytuł magistra, specjalizacja biologia molekularna

Tytuł pracy magisterskiej: „Immunochemiczna charakterystyka i występowanie syntazy indolilo-3-acetylo-1-0-β-D-glukozy (IAGlusyntazy) w tkankach roślinnych.” Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biochemii.

Promotor pracy: prof. dr hab. Jadwiga Gniot-Szulżycka

2004 rok stopień doktora nauk biologicznych

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Poszukiwanie genu przedsionkowego peptydu natriuretycznego u *Pharbitis nil*.” Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Biotechnologii.

Promotor pracy: prof. dr hab. Andrzej Tretyn

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

2004 - 2006: asystent, Zakład Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMK.

2006 - 2012: adiunkt, Zakład Immunologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UMK.

2009 - 2010: postdoctoral researcher, Clinical & Administrative Pharmacy, Stroke Laboratory, UGA College of Pharmacy in Augusta, University of Georgia, Hospital of Veterans Affairs in Augusta (USA).

2012 - do chwili obecnej: adiunkt, Zakład Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, UMK.

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

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

GLUTATION JAKO MODULATOR REAKCJI GORACZKOWEJ

- b. Prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:

Osiągnięcie naukowe, będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl pięciu oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w latach 2011-2016, w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny Impact Factor tych pozycji (zgodny z rokiem opublikowania) wynosi 14.303, a sumaryczna liczba punktów MNiSW 125. We wszystkich publikacjach jestem pierwszym autorem, w czterech pracach jestem autorem korespondencyjnym.

** autor korespondencyjny*

[1] **Wrotek S**, Jędrzejewski T, Potera-Kram E, Kozak W* (2011a) Antipyretic activity of N-acetylcysteine. *J Physiol Pharmacol* 62(6): 669-675.

[IF2011=2.267], [MNiSW2011=25]

Mój wkład w powstanie pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu literatury z tej dziedziny, pełną koordynację badań, uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej, uzyskaniu Grantu wewnętrznego UMK (558-B) na sfinansowanie badań, indukcję gorączki endotoksynowej i aseptycznej nekrozy tkanek, biotelemetryczny pomiar temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej szczurów, zbadanie wpływu NAC na przebieg obu modeli gorączki, interpretację wyników, przygotowanie wszystkich rycin, napisanie wstępnej wersji manuskryptu pracy.

Mój udział procentowy szacuję na 75%

[2] **Wrotek S***, Jędrzejewski T, Piotrowski J, Kozak W (2016a) N-acetyl-L-cysteine exacerbates generation of IL-10 in cells stimulated with endotoxin in vitro and produces antipyresis via IL-10 dependent pathway in vivo. *Immunology Letters* 27 (177): 1-5.

[IF2016=2.483], [MNiSW2016=20]

Mój wkład w powstanie pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu literatury z tej dziedziny, uzyskanie zgody Lokalnej

Komisji Etycznej, indukcję gorączki endotoksynowej, biotelemetryczny pomiar temperatury ciała szczurów, analizy immunoenzymatyczne (IL-10, PGE₂), zbadanie wpływu przeciwciał anty IL-10 i NAC na przebieg gorączki endotoksynowej, przeprowadzenie interpretacji wyników, wykonanie analizy statystycznej, przygotowanie wszystkich rycin, napisanie manuskryptu pracy, korespondencję z redakcją.

Mój udział procentowy szacuję na 75%

[3] **Wrotek S***, Jędrzejewski T, Nowakowska A, Kozak W (2015) Glutathione deficiency attenuates endotoxic fever in rats. *International Journal of Hyperthermia* 31(7): 793-9.

[IF2015=3.361], [MNI SW2015=25]

Mój wkład w powstanie pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu literatury z tej dziedziny, pełną koordynację badań, uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej, uzyskanie Grantu NCN (2012/07/B/NZ4/00197) na sfinansowanie badań, indukcję gorączki endotoksynowej, biotelemetryczny pomiar temperatury ciała, zbadanie wpływu foronu na przebieg gorączki, przeprowadzenie analiz immunoenzymatycznych (TNF- α), przeprowadzenie analiz biochemicznych (pomiar stężenia glutationu w tkankach), przeprowadzenie interpretacji wyników, przygotowanie wszystkich rycin, napisanie manuskryptu pracy, korespondencję z redakcją.

Mój udział procentowy szacuję na 80%

[4] **Wrotek S***, Domagalski K, Jędrzejewski T, Dec E, Kozak W (2017) Buthionine sulfoximine, a glutathione depletor, attenuates endotoxic fever and reduces IL-1 β and IL-6 level in rats. *Cytokine* 90: 31-37.

[IF2016=2.940], [MNI SW2016=25]

Mój wkład w powstanie pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu literatury z tej dziedziny, pełną koordynację badań, uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej, uzyskanie Grantu NCN (2012/07/B/NZ4/00197) na sfinansowanie badań, indukcję gorączki endotoksynowej, biotelemetryczny pomiar temperatury ciała, zbadanie wpływu BSO na przebieg gorączki, przeprowadzenie analiz immunoenzymatycznych (IL-1 β , IL-6), przeprowadzenie analiz biochemicznych (pomiar stężenia glutationu w tkankach), udział w analizach z użyciem techniki Real-time PCR, przeprowadzenie interpretacji wyników, przygotowanie wszystkich rycin, napisanie manuskryptu pracy, korespondencję z redakcją.

Mój udział procentowy szacuję na 70%

[5] **Wrotek S***, Jędrzejewski T, Nowakowska A, Kozak W (2016b) LPS alters pattern of sickness behavior but does not affect glutathione level in aged male rats. *Biogerontology* 17(4): 715-23.

[IF2016=3.252], [MNI SW2016=30]

Mój wkład w powstanie pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie przeglądu literatury z tej dziedziny, uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej, uzyskanie Grantu NCN (2012/07/B/NZ4/00197) na sfinansowanie badań, opiekę nad zwierzętami laboratoryjnymi podczas całego doświadczenia; indukcję gorączki endotoksynowej, biotelemetryczny pomiar temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej, przeprowadzenie analiz immunoenzymatycznych (IL-6), przeprowadzenie analiz biochemicznych (pomiar stężenia glutationu w tkankach), przeprowadzenie interpretacji wyników, przygotowanie wszystkich rycin, napisanie manuskryptu pracy, korespondencję z redakcją.

Mój udział procentowy szacuję na 80%

- c. Komentarz autorski do publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.

GLUTATION JAKO MODULATOR REAKCJI GORĄCZKOWEJ

W poniższym opisie cytowania własnych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały oznaczone pogrubioną czcionką, natomiast cytowania własnych prac wchodzących w skład dorobku dodatkowego zostały oznaczone podkreśleniem.

WSTĘP

Gorączka jest stanem powszechnie występującym u ludzi i zwierząt. Towarzyszy ona chorobie, która już się ujawniła lub dopiero wkrótce zostanie zmanifestowana. Współcześnie u pacjentów często można zaobserwować negatywny stosunek do niej. Wynika to z następujących przyczyn: utożsamiania gorączki z chorobą; złego samopoczucia osoby gorączkującej; licznych reklam środków przeciwgorączkowych, które utwierdzają pacjentów w trafności postępowania mającego na celu obniżenie gorączki. Ponadto nawet w literaturze naukowej można odnaleźć nieuzasadnione zalecenia dotyczące przeciwdziałania gorączce w celu przyspieszenia powrotu do zdrowia [Kent i wsp. 1992]. W związku z tym obserwuje się nowe zjawisko społeczne zwane „fever phobia” (fobia gorączkowa) [Dong i wsp. 2015].

W rzeczywistości wzrost temperatury ciała jest sygnałem alarmowym organizmu. Podczas gorączki można zaobserwować zespół reakcji behawioralnych zwanych zachowaniem chorobowym (*sickness behaviour*). Należą do nich między innymi senność, zmniejszenie aktywności ruchowej oraz hipofagia (zmniejszenie ilości pobieranego pokarmu) prowadząca do obniżenia masy ciała. Uważa się, że ten zespół reakcji pozwala na zogniskowanie organizmu na walce z czynnikiem chorobotwórczym [Soszyński 2004]. Stanowisko to jest zgodne z dawnymi poglądami, w których uważano gorączkę za potężny oręż do walki z chorobami. Do historii przeszło zdanie greckiego lekarza i filozofa Parmenidasa: „Dajcie mi możliwość wytworzenia gorączki, a wyleczę was ze wszystkich waszych chorób.” [cyt. za Kozak 2009]. Badania wielokrotnie potwierdziły, że gorączka towarzysząca chorobom infekcyjnym przynosi korzystne efekty [Kluger i wsp. 1996, 1998; Hopton Cann i wsp. 2002, 2006]. Badacze zajmujący się tym zagadnieniem uważają, że jest

to reakcja adaptacyjna, której celem jest przywrócenie homeostazy zaburzonej działaniem czynników urazowych i infekcyjnych [Baumann i Gauldie 1994; Kluger i wsp. 1998]. Sugeruje to, że brak takiej reakcji przynosi negatywne skutki, utrudniając lub uniemożliwiając powrót do homeostazy organizmu. Potwierdzają to znane w medycynie przypadki osób niegorączkujących. Już dawno zaobserwowano, że taką grupę stanowią pacjenci cierpiący na choroby nowotworowe [Laurence 1855]. Jednak jak dotąd nie podjęto próby zbadania przyczyny tego zjawiska.

Chociaż współcześnie nie zwraca się uwagi na brak gorączki podczas chorób infekcyjnych, to jej wystąpienie (zwłaszcza w początkowym etapie choroby) jest jednym z podstawowych parametrów rzutujących na dobór odpowiedniego leczenia. Okazuje się jednak, że brak wzrostu temperatury ciała podczas infekcji może być związany nie tylko z dobrą kondycją pacjenta, lecz także z czynnikami, które nie zawsze są brane pod uwagę przez klinicystów. Obok leków, których właściwości przeciwgorączkowe są dobrze poznane, istnieje wiele preparatów, których wpływ na gorączkę nie był badany. Zdarza się, że pacjent i lekarz nie wiedzą, iż niektóre preparaty hamują reakcję gorączkową. Może to prowadzić do błędów w ocenie zarówno stanu zdrowia pacjenta, jak i efektywności terapii antybiotykowej [Cunha 2012]. Z tego powodu niezbędna jest znajomość lub przynajmniej umiejętność przewidywania antypiretycznych właściwości stosowanego leku. Bez wątplenia możliwe to będzie dzięki pełnemu poznaniu mechanizmu prowadzącego do indukcji gorączki.

Mimo że mechanizm gorączki u organizmów stałocieplnych od wielu lat jest opisywany w pracach naukowych [Atkins 1960; Caputa 1977], to wciąż nie jest on w pełni poznany. Najlepiej zbadany model gorączki infekcyjnej jest indukowany pirogenem egzogennym czyli endotoksyną, którą stanowi lipopolisacharyd (LPS) izolowany z bakterii *Escherichia coli*. Aktualnie przyjmuje się, że gorączka powstaje w wyniku kontaktu błonowych receptorów Toll-like znajdujących się na komórkach gospodarza z pirogenem egzogennym, pochodzącym z patogenu. Następnie sygnał gorączkotwórczy przekazywany do wnętrza komórki aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (NF- κB). Nasze badania wykazały, że myszy pozbawione genu kodującego NF- κB nie gorączkują po iniekcji LPS [Kozak i wsp. 2006a]. Wynika to z faktu, iż NF- κB reguluje syntezę pirogenów endogennych, do których zalicza się cytokiny takie jak interleukiny IL-1 β , IL-6 oraz czynnik martwicy

nowotworów α (TNF- α) [Kluger i wsp. 1995; Lee i wsp. 2003]. Zgodnie z aktualną wiedzą dotyczącą mechanizmu indukcji gorączki, cytokiny te stymulują uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych. Wolny kwas arachidonowy jest substratem dla cyklooksygenaz (COX-1 i COX-2), które przekształcają go w prostaglandynę E₂ (PGE₂) - ostateczny mediator reakcji gorączkowej [Milton 1989; Roth i Blatteis 2014].

Istnieją naukowe przesłanki sugerujące, że elementem spajającym powyższe, kluczowe czynniki zaangażowane w gorączkę może być glutation [Kent i wsp. 1992; Haddad i wsp. 2001; Kudo i Murakami 2005; Kil i wsp. 2008; Seidel i wsp. 2009]. Glutation jest tripeptydem zbudowanym z trzech aminokwasów – kwasu glutaminowego, glicyny i cysteiny. Występuje on we wszystkich organizmach żywych: w komórkach roślin, zwierząt i człowieka. Do głównych jego funkcji należy: neutralizacja wolnych rodników i reaktywnych form tlenu; stymulacja prawidłowego działania układu immunologicznego; detoksykacja organizmu [Bains i Bains 2015]. Niedobory glutationu stwierdzono w schorzeniach takich jak AIDS, mukowiscydoza, zapalenie oskrzeli [Atkuri i wsp. 2007], choroba Alzheimera [Adair i wsp. 2001], cukrzyca [De Mattia i wsp. 1998] i rak jelita grubego [Estensen i wsp. 1999]. Przyjmuje się także, że z wiekiem dochodzi do istotnego obniżenia się jego stężenia w organizmie [Liu i Choi 2000; Liu i wsp. 2004; Mosoni i wsp. 2004].

Na rolę glutationu jako modulatora gorączki wskazują doświadczenia dowodzące, że wpływa on na wydzielanie pirogennych cytokin takich jak: IL-1 β , IL-6, TNF- α [Haddad i wsp. 2001] oraz reguluje aktywację czynnika NF- κ B [Kil i wsp. 2008; Seidel i wsp. 2009]. Ponadto, zaobserwowano brak aktywności mikrosomalnej syntetazy prostaglandyny E₂ (mPGES-1) przy braku glutationu [Kent i wsp. 1992; Kudo i Murakami 2005], co zgodnie z aktualną wiedzą uniemożliwia rozwój gorączki prostaglandyno-zależnej. Powyższe informacje skłoniły mnie do postawienia hipotezy badawczej dotyczącej roli glutationu w reakcji gorączkowej. Zagadnienie to nie było dotąd badane.

Głównym celem prac składających się na osiągnięcie naukowe opisane w niniejszym opracowaniu, było zweryfikowanie hipotezy zakładającej, iż glutation jest zaangażowany w indukcję reakcji gorączkowej.

Prace realizowałam w dwóch etapach, które wiązały się z badaniem:

1. przebiegu gorączki oraz jej molekularnego mechanizmu u szczurów, którym podawałam farmakologiczne modulatory stężenia glutationu,
2. przebiegu gorączki oraz jej molekularnego mechanizmu u zwierząt w zaawansowanym wieku, które zgodnie z danymi literaturowymi, powinny charakteryzować się obniżonym stężeniem glutationu.

Badania prowadziłam na poziomie komórkowym (*in vitro* na komórkach mononuklearnych krwi obwodowej), jak i integracyjnym (*in vivo* na szczurach). Zwierzęta poddawane były iniekcjom podskórnym (terpentyna), dootrzewnowym (LPS, TNF- α , przeciwciała anty IL-10), domięśniowym (anestetyki) oraz procedurom anestezjologicznym i chirurgicznym. Do pomiaru głębokiej temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej szczurów stosowałam system biotelemetrii (Data Sciences International, USA). Umożliwił on wielodobową rejestrację temperatury i aktywności lokomotorycznej w przedziałach 5 minutowych u zwierząt swobodnie poruszających się w swoich mieszkalnych klatkach, w pełnej izolacji od eksperymentatora. W ten sposób wyeliminowany został problem związany ze stresowym wzrostem temperatury ciała zwierząt. Chciałabym podkreślić, że Zakład Immunologii UMK jako jeden z nielicznych ośrodków naukowo-badawczych w Polsce dysponuje tego typu aparaturą. W pobranych podczas doświadczeń próbach przeprowadziłam analizy z wykorzystaniem techniki biochemicznej (oznaczanie poziomu glutationu), immunoenzymatycznej (ELISA: oznaczanie stężenia cytokin i PGE₂) i biologii molekularnej (Real-time PCR: oznaczanie ekspresji genów cytokin).

GORĄCZKA U SZCZURÓW TRAKTOWANYCH PREKURSOREM GLUTATIONU (N-ACETYLOCYSTEINĄ)

W ciągu życia wielokrotnie jesteśmy narażeni na infekcje górnych dróg oddechowych. Jeżeli infekcji takiej towarzyszy zwiększone wydzielanie śluzu w drogach oddechowych, ulgę mogą przynieść leki mukolityczne, które powodują jego upłynnienie i zmniejszenie lepkości. Jednym z takich preparatów jest N-acetylocysteina (NAC), która jest źródłem

cysteiny niezbędnej do syntezy glutationu. Z tego powodu NAC jest substancją powszechnie stosowaną w badaniach eksperymentalnych [Cai i wsp. 2015; Ortiz i wsp. 2016] i klinicznych [Pirabbasi i wsp. 2016; Hamzeh i wsp. 2016] do podwyższania stężenia glutationu w organizmie. Chociaż przeciwzapalne właściwości NAC były opisywane w różnych badaniach eksperymentalnych [Turkyilmaz i wsp. 2016; Micolka i wsp. 2016], to jej wpływ na gorączkę dotąd nie był znany.

Celem pracy **Wrotek i wsp. (2011a)** było zbadanie wpływu NAC na przebieg gorączki infekcyjnej oraz aseptycznej gorączki terpentynowej. Te dwa typy reakcji, chociaż mają różną etiologię, charakteryzują się podobnym mechanizmem molekularnym – są zależne od cytokin i od PGE₂ [Cooper i wsp. 1994; Kozak i wsp. 1997, 1998]. Wykazałam, że iniekcja dobranej przeze mnie dawki NAC nie zaburza dobowego rytmu temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej szczurów kontrolnych [**Wrotek i wsp. 2011a**]. Natomiast podanie NAC przed indukcją gorączki infekcyjnej lub aseptycznej, znacząco je obniżało. Te antypiretyczne właściwości NAC nie były dotąd znane. Dopiero rok później Ferreira i wsp. (2012) dowiedli, że NAC hamuje także gorączkę indukowaną drożdżami piekarniczymi. Na tej podstawie można wnioskować, że **NAC jest skuteczna w hamowaniu gorączki o różnej etiologii.**

Ze względu na fakt, iż wystąpieniu gorączki towarzyszy *sickness behaviour* w omawianej pracy przeprowadziłam również analizę zmian masy ciała u szczurów w obu modelach gorączki. Stwierdziłam, że iniekcja NAC nie wpływa na zmniejszenie masy ciała obserwowane u zwierząt traktowanych lipopolisacharydem, ale zmniejsza ubytek masy ciała u szczurów traktowanych terpentyną. Oznacza to, że w obu typach gorączki mechanizm prowadzący do zmniejszenia masy ciała różni się na poziomie molekularnym. Na podstawie uzyskanych wyników uważam też, że chudnięcie towarzyszące gorączce endotoksynowej nie jest bezpośrednią konsekwencją wzrostu temperatury ciała, ponieważ mimo zahamowania gorączki endotoksynowej za pomocą NAC nadal obserwuje się ubytek masy ciała. Musi być on zatem indukowany poprzez inne mechanizmy towarzyszące reakcji zapalnej. W celu pogłębienia wiedzy na temat wpływu NAC na *sickness behaviour* badałam także aktywność lokomotoryczną szczurów. Wykazałam, że NAC zmniejsza ubytek aktywności lokomotorycznej indukowany pirogenami.

Wyniki uzyskane w omawianej pracy dowiodły, że NAC ma właściwości przeciwgorączkowe, jednak molekularny mechanizm leżący u ich podstaw nadal pozostawał nieznanym. To zagadnienie stało się tematem mojej kolejnej publikacji **[Wrotek i wsp. 2016a]**.

Dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że działanie substancji o właściwościach antypiretycznych może być konsekwencją bezpośredniego hamowania syntezy lub aktywności pirogenów endogennych, czyli cytokin (IL-1 β , IL-6), a ostatecznie hamowania syntezy PGE₂. Istnieje jeszcze inna możliwość, wynikająca z faktu, iż gorączka jest reakcją precyzyjnie regulowaną. Zgodnie z koncepcją endogennej antypirezy w organizmie istnieją mechanizmy, które na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego ograniczają pułap gorączki [Kozak i wsp. 2000]. W mechanizm ten zaangażowane mogą być różne czynniki, takie jak hormony (na przykład hormon melanotropowy α i glukokortykoidy); neuropeptydy (na przykład wazopresyna argininowa, neuropeptyd Y); metabolity kwasu arachidonowego (na przykład prostaglandyna D₂, kwas 11,12-epoksyheksatrienowy) i cytokiny [Kozak i wsp. 2000; Ogoina 2011]. Jedną z cytokin o potwierdzonych właściwościach antypiretycznych jest IL-10 [de Waal Malefyt i wsp. 1991; Nava i wsp. 1997; Ledebor i wsp. 2000; Ledebor i wsp. 2002].

Celem mojej pracy wspomnianej powyżej **[Wrotek i wsp. 2016a]** było ustalenie czy antypiretyczne działanie NAC zachodzi za pośrednictwem IL-10. W związku z tym, obok analizy wpływu NAC na uwalnianie IL-10, badałam także stężenie finalnego mediatora gorączki - PGE₂. Do doświadczeń wykorzystałam komórki mononuklearne krwi (PBMCs) szczura stymulowane lipopolisacharydem. Stwierdziłam, że NAC powoduje obniżenie stężenia PGE₂ uwalnianej z komórek PBMCs stymulowanych przez LPS oraz wzrost produkcji IL-10 w porównaniu do stężenia w komórkach traktowanych tylko lipopolisacharydem. Wyniki te dowiodły, że NAC może oddziaływać na gorączkę poprzez IL-10. W celu jednoznacznego potwierdzenia, że IL-10 jest rzeczywiście cytokiną odpowiadającą za antypiretyczne właściwości NAC, przeprowadziłam serię badań *in vivo* na szczurach. Okazało się, że podanie przeciwciał neutralizujących IL-10 szczurom potraktowanym LPS i NAC znacząco zahamowało antypiretyczne właściwości NAC. Na tej podstawie wysnułam wniosek, że **przeciwgorączkowe działanie NAC jest związane ze wzmożoną syntezą antypiretycznej IL-10**. Odkrycie to wskazuje na nowe możliwości wykorzystania NAC, na przykład w schorzeniach, w których obok właściwości

przeciwgorączkowych tego specyfiku, korzyści przynosić będzie jego zdolność do indukcji IL-10. Już teraz wiadomo, że IL-10 łagodzi eksperymentalne zapalenie jelita grubego [Barbara i wsp. 2000], modelowe stwardnienie rozsiane [Rott i wsp. 1994], zapalenie trzustki [Van Laethem i wsp. 1995], cukrzycę [Pennline i wsp. 1994], eksperymentalną endotoksemię [Gerard i wsp. 1993] i artretyzm [Persson i wsp. 1996]. W przeciwieństwie do NAC niesteroidowe leki przeciwzapalne, które także tłumią gorączkę, nie podwyższają stężenia IL-10, a wręcz przeciwnie - mogą je obniżyć [Page i wsp. 2010; Housby i wsp. 1999].

Wielokrotnie wykazano, że NAC jest substancją podwyższającą poziom glutationu [Ortiz i wsp. 2016; Hamzeh i wsp. 2016], co sama potwierdziłam eksperymentalnie (dane niepublikowane). Dla pełnego zbadania roli glutationu w mechanizmie gorączki, kontynuowałam badania z wykorzystaniem zwierząt charakteryzujących się obniżonym stężeniem glutationu w organizmie.

GORĄCZKA ENDOTOSYNOWA U SZCZURÓW Z FARMAKOLOGICZNIE OBNIŻONYM STĘŻENIEM GLUTATIONU

Jak wspomniałam we wstępie, dane literaturowe sugerują, że glutation wpływa na czynniki zaangażowane w mechanizm gorączki [Kent i wsp. 1992; Haddadi i wsp. 2001; Kudo i Murakami 2005]. Ponadto moje badania [Wrotek i wsp. 2011a i 2016a] wykazały, że prekursor glutationu jakim jest NAC hamuje gorączkę. Z tego powodu w dalszych doświadczeniach badałam jej przebieg u szczurów z eksperymentalnie obniżonym stężeniem glutationu.

Celem mojej kolejnej pracy [Wrotek i wsp. 2015] było ustalenie czy indukowany niedobór glutationu moduluje przebieg gorączki wywołanej pirogeną dawką lipopolisacharydu i czy wpływa na stężenie czynnika martwicy nowotworu (TNF- α). W omawianych badaniach użyłam foronu (2,6-dimethyl-2,5-heptadiene-4-one), związku wielokrotnie stosowanego przez innych badaczy do zmniejszenia zasobów glutationu w organizmie [Traber i wsp. 1992; Jung i wsp. 2008]. Analizując poziom glutationu w wątrobie szczurów potwierdziłam, że zastosowana dawka foronu skutecznie go obniża. Najistotniejszym jednak wynikiem było wykazanie, że **zwierzęta z obniżonym stężeniem glutationu reagują osłabioną gorączką na pirogeną dawkę endotoksyny**. Ponadto stwierdzałam, że zwierzęta te charakteryzowały się niższym stężeniem TNF- α w osoczu krwi

w porównaniu do poziomu rejestrowanego u osobników z niemodyfikowanym stężeniem glutationu w organizmie. Postanowiłam ostatecznie zweryfikować doświadczalnie rolę TNF- α w omawianym zjawisku, podwyższając jego stężenie poprzez podanie szczurom traktowanym foronem, rekombinowanego TNF- α . Ta procedura pozwoliła częściowo przywrócić im gorączkę. Praca ta dowiodła, że niskie stężenie glutationu w organizmie moduluje gorączkę endotoksynową w sposób zależny od TNF- α . Jest to zgodne z wynikami innych autorów, którzy wykazali, że synteza TNF- α wymaga szlaku sygnałowego, w który zaangażowany jest glutation [Haddad i Land 2002]. Ponadto moje badania sugerują, że obniżony poziom glutationu w organizmie hamuje także działanie innych czynników zaangażowanych w indukcję gorączki. W pracy tej zbadalam także pirogenne właściwości samego TNF- α . Publikowane dotąd wyniki dotyczące wpływu tej cytokiny na gorączkę były niejednoznaczne. Niektóre badania wskazywały, że TNF- α ma właściwości pirogenne [Dinarelli i wsp. 1986] inne natomiast sugerowały działanie antypiretyczne tej cytokiny [Long i wsp. 1992; Kozak i wsp. 1995]. Autorzy tych trzech prac stosowali rekombinowany TNF- α pochodzący z innego gatunku niż organizm badany. Ja natomiast przeprowadziłam te badania stosując u szczurów rekombinowany TNF- α pochodzący z tego samego gatunku. Uzyskane wyniki potwierdziły pirogenność TNF- α .

Wyniki moich badań nad zwierzętami traktowanymi foronem potwierdziły, że glutation jest modulatorem gorączki endotoksynowej. Jednak nie można było wykluczyć, że obserwowane obniżenie gorączki mogło być ubocznym skutkiem działania foronu, niezależnym od glutationu. W kolejnym etapie badań nad rolą glutationu w gorączce [Wrotek i wsp. 2017] przyjąłam założenie, że jeżeli glutation rzeczywiście jest istotny dla jej przebiegu, to niezależnie od tego w jaki sposób dojdzie do obniżenia stężenia tego tripeptydu, obserwowane efekty powinny być podobne. W pracy tej do uszczuplenia zasobów glutationu zastosowałam sulfoksyminę butioniny (buthionine sulfoximine; BSO), której mechanizm działania całkowicie różni się od mechanizmu działania foronu. Foron podlega w organizmie ssaków sprzężaniu z glutationem przy udziale S-transferazy glutationowej, po czym następuje wydalenie tych koniugatów z żółcią. Natomiast BSO jest inhibitorem syntetazy gamma-glutamylcysteinowej (gamma-GCS) – kluczowego enzymu zaangażowanego w syntezę glutationu [Plummer i wsp. 1981; Griffith 1982; Sunahara i Chiesa 1992]. Ponadto BSO jest substancją, którą próbuje się stosować w leczeniu

onkologicznym. Wiele lat temu zaobserwowano, że komórki nowotworowe charakteryzują się podwyższonym poziomem glutationu [Deml i Oesterle 1980]. Ta ich właściwość powoduje, że stają się one odporne na działanie zarówno chemioterapii, jak i radioterapii. Wykazano, że doświadczalne obniżenie poziomu glutationu w komórkach nowotworowych uwrażliwia je na działanie obu powyższych terapii [Miura i Saski 1991; Awasthi i wsp. 2007; Traverso i wsp. 2013]. Z tego powodu rozpoczęto badania biomedyczne, w których zastosowano BSO w celu obniżenia stężenia glutationu i w konsekwencji uwrażliwienia nowotworu na stosowane zabiegi terapeutyczne. Efekty działania tej substancji obserwowane były nie tylko w badaniach przedklinicznych, ale także w klinicznych [Griffith 1982; O'Dwyer i wsp. 1996]. Biorąc pod uwagę fakt, że wystąpienie gorączki infekcyjnej od dawna jest traktowane jako czynnik sprzyjający powrotowi do zdrowia osób z chorobą onkologiczną [Kleef i Hager 2006], uznałam za niezbędne ustalenie czy stężenie glutationu obniżone za pomocą BSO również zahamuje reakcję gorączkową. We wspomnianej pracy **[Wrotek i wsp. 2017]** badałam czy związek ten wpływa na poziom pirogennych cytokin IL-1 β oraz IL-6. Na wstępie tych badań potwierdziłam, że stosowana dawka BSO obniża stężenie glutationu. Jednocześnie ustaliłam, że dawka ta nie zaburza przebiegu normalnej temperatury ciała szczurów. Przede wszystkim jednak wykazałam, że iniekcje BSO obniżają pułap i skracają czas trwania gorączki indukowanej pirogeną dawką LPS. Towarzyszy temu obniżenie ekspresji mRNA IL-1 β i IL-6. Hamujący wpływ BSO na ekspresję genu IL-1 β widoczny jest już cztery godziny po iniekcji LPS, a po upływie następnych trzech godzin cytokina ta nie jest wykrywana w osoczu. Natomiast hamowanie za pomocą BSO ekspresji genu IL-6 u szczurów traktowanych lipopolisacharydem następuje wcześniej. Już cztery godziny po podaniu endotoksyny w grupie traktowanej BSO stężenie IL-6 w osoczu było obniżone w porównaniu do wartości odnotowanych u zwierząt kontrolnych otrzymujących sól fizjologiczną zamiast BSO. Wyniki przedstawione w omawianej pracy potwierdziły moje wcześniejsze obserwacje **[Wrotek i wsp. 2015]**, że **zwierzęta z obniżonym stężeniem glutationu mają znacznie osłabioną reakcję gorączkową.**

GORĄCZKA ENDOTOSYNOWA U SZCZURÓW W WIEKU STARCZYM

Wyniki uzyskane w moich pracach **[Wrotek i wsp. 2011a, 2015, 2016a i 2017]** wskazały, że preparaty modulujące poziom glutationu wpływają na gorączkę. Do dalszych

badania poszukiwałam modelu, w którym stężenie glutationu ulega spontanicznemu obniżeniu. W literaturze naukowej można odnaleźć wiele publikacji sugerujących, że warunek ten jest spełniony u osobników starych [Liu i Choi 2000; Liu i wsp. 2004; Mosoni i wsp. 2004]. W związku z tym w mojej kolejnej pracy [Wrotek i wsp. 2016b] badałam stężenie glutationu i zdolność do gorączkowania u szczurów w wieku starczym. W doświadczeniach wzięłam pod uwagę fakt, że starzejące się zwierzęta zapadają na różne schorzenia związane z wiekiem, którym może towarzyszyć obniżenie stężenia glutationu [Ghezzi 2011]. Sytuacja ta znacznie utrudniłaby analizę wyników. Z tego powodu, aby ograniczyć wpływ powyższych schorzeń do badań opisanych w tej pracy wybrałam zwierzęta, które:

- nie wykazywały ubytku masy ciała,
- charakteryzowały się prawidłowym rytmem dobowym temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej,
- miały liczbę leukocytów w zakresie norm przewidzianych dla szczurów (pomiędzy 2.0 a 8.0 komórek [$\times 10^9/L$]).

W omawianej pracy badałam czy istnieje różnica pomiędzy poziomem glutationu w wątrobie szczurów młodych (8-tygodniowych) i wyselekcjonowanych starych (24-miesięcznych). Zasadniczym celem było jednak porównanie gorączki endotoksynowej i zbadanie aktywności lokomotorycznej w obu grupach wiekowych. Ponadto chciałam sprawdzić czy obserwowane różnice są związane z poziomem IL-6 w osoczu, która jest zaangażowana w indukcję gorączki oraz *sickness behaviour* [Kozak i wsp. 1997].

Hodowla szczurów prowadzona w zwierzętarni Zakładu Immunologii pozwoliła mi wyłonić zwierzęta spełniające przyjęte powyżej kryteria. Moje badania wykazały, że poziom glutationu u starych szczurów nie różnił się istotnie od stężenia obserwowanego u młodych zwierząt. Wyniki te nie są zgodne z powszechnie panującym przekonaniem o niskim poziomie glutationu u osobników starych [Liu i Choi 2000, Liu i wsp. 2004, Mosoni i wsp. 2004]. Nasuwa to więc wniosek, że **niskie stężenie glutationu nie jest związane *per se* z zaawansowanym wiekiem, lecz ze stanami chorobowymi jakie towarzyszą osobnikom starym, które nie były poddawane selekcji tak jak w przypadku doświadczeń przeze mnie przeprowadzonych.**

W omawianej pracy badane stare szczury mimo selekcji pod kątem stanu zdrowia, wykazywały jednak obniżoną podstawową temperaturę ciała i aktywność lokomotoryczną w porównaniu do wartości rejestrowanych u osobników młodych. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych autorów [Foster i wsp. 1992]. Na tej podstawie przypuszczam, że obniżona aktywność lokomotoryczna i temperatura ciała są charakterystycznymi objawami starości, które mogą być spowodowane np. obniżeniem masy mięśniowej [Delp i wsp. 1998] lub niewydolnością mechanizmów termoregulacyjnych [Vogelaere i Pereira 2005]. Stwierdziłam również, że stare szczury reagują gorączką na pirogeną dawkę LPS, ale dokładna analiza wzorca tej gorączki wykazała różnice w jej pułapie i przebiegu w porównaniu do gorączki osobników młodych. Ponadto stare zwierzęta potrzebowały więcej czasu, aby ich temperatura powróciła do wartości początkowej. Świadczy to, że mechanizmy zaangażowane w ten proces są u nich mniej efektywne.

W omawianej pracy potwierdziłam także wcześniejsze obserwacje Leon i wsp. (1997), że iniekcja LPS wyzwała *sickness behaviour*. Wykazałam istotne obniżenie aktywności lokomotorycznej zarówno u starych, jak i młodych szczurów. Dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że jedną z głównych cytokin zaangażowanych w indukcję *sickness behaviour* jest IL-6 [Kozak i wsp. 1997, Bluthé i wsp. 2000]. Przeprowadzona przeze mnie analiza IL-6 w osoczu krwi dowiodła, że podanie pirogennej dawki LPS powoduje wysoki wzrost jej stężenia w obu grupach wiekowych. Reasumując w pracy **Wrotek i inni (2016b)** wykazałam, że **stare szczury zachowują zdolność do gorączkowania, a obserwowana u nich zmiana wzorca przebiegu gorączki endotoksynowej nie jest spowodowana zmienionym poziomem glutationu czy IL-6.**

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Moje badania, składające się na osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, zmierzają do identyfikacji czynników odpowiedzialnych za obserwowany u niektórych pacjentów brak gorączki podczas chorób infekcyjnych. Na podstawie analizy literatury naukowej założyłam, że glutation jest istotny dla indukcji i przebiegu gorączki. Aby zweryfikować tę hipotezę postawiłam sobie za cel:

- a. ustalenie czy czynniki modulujące stężenie glutationu wpływają na przebieg gorączki

- b. sprawdzenie jak przebiega gorączka u osobników starych, które zgodnie z danymi literaturowymi powinny charakteryzować się spontanicznie obniżonym poziomem glutationu.

Uzyskane wyniki wskazują, że zaburzenie homeostazy glutationu spowodowane czynnikami farmakologicznymi powoduje znaczne zahamowanie gorączki. Zbadałam mechanizm molekularny leżący u podstaw tego zjawiska. Stwierdziłam, że zastosowane preparaty modulujące stężenie glutationu wpływają na poziom cytokin pro- i przeciwzapalnych.

Ponadto zweryfikowałam powszechnie przyjęty pogląd dotyczący spontanicznego obniżania się poziomu glutationu z wiekiem. Moje wyniki przeczą tej opinii. Osobniki stare, które nie wykazują objawów świadczących o chronicznych stanach zapalnych, charakteryzują się stężeniem glutationu zbliżonym do tego, który jest obserwowany u osobników młodych. Wskazuje to, że niskie stężenie glutationu nie jest bezpośrednim skutkiem zaawansowanego wieku, lecz np. niewykrytych, patologicznych procesów przebiegających w organizmie.

Stare szczury, chociaż nie mają zaburzonej homeostazy glutationu, to podobnie jak zwierzęta traktowane substancjami uszczuplającymi zasoby tego związku reagują zmodyfikowaną gorączką. Jednak dokładna analiza przebiegu procesu gorączkowego wykazała istotne różnice pomiędzy nimi. Gorączka u osobników starych jest wyższa i wydłużona w porównaniu do obserwowanej u osobników młodych z zaburzonym poziomem glutationu. Zauważyłam także, że endogenne mechanizmy ograniczające ją są mniej sprawne niż u młodych zwierząt. Te różnice wzorca przebiegu gorączki znajdują potwierdzenie na poziomie molekularnym. Osłabiona gorączka endotoksynowa u szczurów z obniżonym stężeniem glutationu wiązała się między innymi z niższym stężeniem IL-6 w osoczu krwi. U organizmów starych nie zaobserwowałam takiej tendencji.

Dostępność różnych związków farmakologicznych pozwala zarówno na podwyższanie jak i obniżanie stężenia glutationu, co stało się procedurą często stosowaną zarówno w badaniach eksperymentalnych, jak i klinicznych. Należy brać pod uwagę, że stosowanie tego typu związków nie ogranicza się jedynie do ich wpływu na poziom glutationu. Wykazałam, że zasięg działania tych preparatów jest szerszy, ponieważ działając

antypiretycznie w istotny sposób wpływają one na reakcję zapalną. Chciałabym podkreślić, że te właściwości modulatorów stężenia glutationu dotąd nie były znane.

Moje badania mają potencjalne znaczenie kliniczne. Wskazują, że brak gorączki u niektórych pacjentów podczas infekcji może być związany z zaburzeniem homeostazy glutationu. Mogą je spowodować leki mukolityczne takie jak NAC lub substancje obniżające stężenie glutationu. Nie branie tego faktu pod uwagę może utrudnić ocenę rzeczywistego stanu zdrowia pacjenta. Co więcej, w badaniach nad zastosowaniem BSO w onkologii należy pamiętać, że preparat ten obniżając poziom glutationu będzie eliminował gorączkę infekcyjną, której wystąpienie dawniej było uważane za dobry prognostyk w chorobie onkologicznej.

Za swoje najważniejsze osiągnięcia badawcze uważam następujące wyniki:

- 1. zaburzenie homeostazy glutationu w organizmie znacząco osłabia reakcję gorączkową, o czym świadczą dwa spostrzeżenia:**
 - a. N-acetylocyteina, powszechnie stosowany lek mukolityczny i prekursor glutationu, wykazuje właściwości przeciwgorączkowe**
 - b. substancje uszczuplające zasoby glutationu takie jak foron i BSO, również wykazują właściwości antypiretyczne**
- 2. N-acetylocyteina indukując wzrost stężenia IL-10 stymuluje endogenną antypirezę**
- 3. zaburzenie homeostazy glutationu wpływa na stężenie cytokin zaangażowanych w mechanizm gorączki, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α**
- 4. zaawansowany wiek nie jest wystarczającym warunkiem prowadzącym do obniżenia stężenia glutationu w organizmie**
- 5. gorączka w wieku starczym ma odmienny przebieg niż ta obserwowana u osobników młodych. Zjawisko to nie jest związane ani z glutationem ani z poziomem endogenne pirogeny jakim jest IL-6.**

5. **Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Cytowania własnych prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zostały oznaczone pogrubioną czcionką, natomiast cytowania prac wchodzących w skład dorobku dodatkowego zostały oznaczone podkreśleniem.

Pozostały dorobek naukowy niewchodzący w skład osiągnięcia naukowego to 19 prac o łącznym współczynniku wpływu IF= 25.492 (punktacja MNiSW wynosi: 293). Jestem także autorem 36 doniesień zjazdowych.

PRACA NAUKOWA PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Procesy biochemiczne przebiegające w żywych organizmach były w kręgu moich zainteresowań już od czasów studenckich. Z tego powodu zdecydowałam się realizować pracę magisterską w Zakładzie Biochemii Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK. Moje badania miały na celu dokonanie immunochemicznej charakterystyki enzymu syntazy indolilo-3-acetylo-1-0-β-D-glukozy (IAGlუსyntazy). Enzym ten jest zaangażowany w syntezę hormonu roślinnego należącego do grupy auksyn. W pracy uzyskałam oczyszczoną, rekombinowaną IAGlूसyntazę, którą użyłam do immunizacji zwierząt. Uzyskane przeciwciała pozwoliły mi zidentyfikować IAGlूसyntazę w różnych tkankach u roślin. Ponadto dokonałam charakterystyki zidentyfikowanych przeze mnie, silnie immunoreaktywnych polipeptydów i porównałam uzyskane wyniki z sekwencjami zdeponowanymi w bazie danych (NCBI).

W maju 2000 roku obroniłam pracę magisterską i uzyskałam dyplom magistra biologii z oceną bardzo dobrą. Zarówno doświadczenia, które zdobyłam w trakcie realizacji pracy magisterskiej, jak i zdany egzamin pozwoliły mi w 2000 roku podjąć studia doktoranckie. W Zakładzie Biotechnologii Instytutu Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK rozpoczęłam realizację badań pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Tretyna. Celem tych badań była identyfikacja roślinnego homologu przedsiorkowego peptydu natriuretycznego (ANP). Do realizacji tego projektu niezbędne było stosowanie technik inżynierii genetycznej. Z tego powodu w czasie studiów doktoranckich odbyłam staż na Uniwersytet Alberta Ludwiga we Freiburgu (Niemcy), gdzie miałam możliwość ich opanowania. Ponadto w swojej pracy doktorskiej stosowałam techniki immunochemiczne, biochemiczne, mikrobiologiczne oraz prowadziłam hodowle roślin *in vitro*. Wykazałam, że pomimo wówczas powszechnego

poglądu o istnieniu roślinnego homologu ANP, nie ma danych wskazujących na jego rzeczywiste istnienie. Zarówno techniki immunochemiczne jak i przeszukiwanie biblioteki cDNA, nie doprowadziły do wyłonienia roślinnej sekwencji odpowiadającej konserwatywnemu fragmentowi ANP.

Efektom moich badań prowadzonych podczas studiów doktoranckich są trzy prace badawcze i jedna przeglądowa. W artykule Wrotek i wsp. (2002) przedstawiłam nową procedurę regeneracji *Pharbitis nil* z węzłów liścieniowych. Uzyskane regeneranty zostały wykorzystane do dalszych badań [Dąbrowska i wsp. 2002]. W celu zidentyfikowania różnic na poziomie mRNA między eksplantatami pochodzącymi z hypokotyli *Pharbitis nil* ulegającymi regeneracji, a niewykazującymi zdolności regeneracyjnych zastosowaliśmy technikę DDPCR (differentia display PCR). Uzyskaliśmy trzy produkty różnicowe. Jeden z tych produktów został dokładnie opisany a sekwencja mRNA została zdeponowana w Banku Genów NCBI (*Ipomoea nil* CAB-like protein, numer dostępu AY547298).

W 2004 roku przedterminowo obroniłam pracę doktorską zatytułowaną „Poszukiwania genu przedsionkowego peptydu natriuretycznego u *Pharbitis nil*”. Praca ta została wyróżniona przez Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMK. Za przedterminowe ukończenie studiów doktoranckich otrzymałam również nagrodę od Prorektora UMK ds. dydaktyki.

Kolejne artykuły opublikowałam po obronie pracy doktorskiej. W pracy [Wrotek i wsp. 2006] wykorzystując metody immunochemiczne, genetyczne jak i przeszukiwanie baz danych dowiodłam, że identyfikowane dotąd przez innych autorów białka określane jako „ANP-like protein” nie są roślinnymi homologami ANP. W związku z tym napisałam pracę przeglądową [Wrotek i wsp. 2005], stanowiąca polemikę z ówczesnymi poglądami dotyczącymi istnienia roślinnego homologu ANP.

PRACA NAUKOWA PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

W październiku 2004 roku wzięłam udział w konkursie na stanowisko asystenta w nowo utworzonej Pracowni Immunologii. Po jego wygraniu rozpoczęłam pracę nad mechanizmem gorączki pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Kozaka. Stanowiło to dla mnie niemałe wyzwanie, ponieważ dotąd prowadziłam badania na materiale roślinnym.

Z chwilą objęcia etatu w Pracowni Immunologii, musiałam poznać od podstaw specyfikę pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi.

Oprócz problemu badawczego, składającego się na moje osiągnięcie naukowe, prowadzone przeze mnie badania skupiają się wokół czterech zagadnień:

- a. Gorączka i stan zapalny w chorobie nowotworowej
- b. Gorączka i stan zapalny w chorobach neurologicznych
- c. Gorączka behawioralna
- d. Inne badania nad mechanizmem gorączki

- a. Gorączka i stan zapalny w chorobie nowotworowej

Zagadnienia immunologiczne związane z chorobą nowotworową zajmują w moich zainteresowaniach naukowych istotne miejsce. W styczniu 2005 roku rozpoczęłam badania ankietowe dotyczące tendencji polskich pacjentów onkologicznych do gorączkowania. Badania te nadal kontynuuję. Część uzyskanych wyników została opublikowana w pracy Wrotek i wsp. (2009). Analiza sześciuset ankiet wykazała między innymi, że pacjenci onkologiczni znacznie częściej deklarowali całkowity brak chorób gorączkowych niż osoby, które nie mają zdiagnozowanej takiej choroby. W ten sposób potwierdziłam, że to dawno opisane zjawisko [Laurence 1855] nadal występuje i dotyczy również polskich pacjentów. Ponadto wykazałam, że alergie również są rzadziej obserwowane u pacjentów onkologicznych w porównaniu do częstości ich występowania u osób zdrowych. Badaniem tego zagadnienia zajęła się doktorantka Zakładu Immunologii, której byłam promotorem pomocniczym. Część tych badań opublikowaliśmy w kolejnej pracy [Kowalczevska i wsp. 2014], w której opisaliśmy negatywną zależność pomiędzy alergią i rakiem piersi, w którą nie są zaangażowane IL-1 β , IL-4 i IL-6 i IFN- γ .

W pracy przeglądowej [Kowalczevska i wsp. 2010] poruszamy zagadnienie dotyczące możliwości łagodzenia kacheksji za pomocą kwasów omega-3, zwłaszcza kwasu eikosapentaenowego (EPA). Wprowadzenie do diety EPA obniża produkcję cytokin, proces lipolizy i aktywność czynnika indukującego proteolizę (PIF). W przeciwieństwie do innych leków, które tylko poprawiają apetyt, suplementacja EPA

wydłuża przeżycie pacjentów onkologicznych z kacheksją [Kowalczevska i wsp. 2010].

Istotnym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju choroby nowotworowej jest występowanie immunosupresji. Na rynku farmaceutycznym dostępne są różne preparaty, które mają właściwości immunostymulujące i w związku z tym potencjalnie mogłyby doprowadzić do przełamania immunosupresji. Można przypuszczać, że zastosowanie ich powinno przynieść korzyści pacjentom onkologicznym. W kolejnej pracy przeglądowej [Wrotek i wsp. 2014b] przeprowadziłam analizę badań klinicznych dotyczących stosowania w onkologii preparatów uzyskiwanych z jemioty. Dostępne dane wskazują, że przyjmowanie tych preparatów nie koliduje z konwencjonalnym leczeniem. Stosowanie ich przynosi korzyści pacjentom onkologicznym, poprawiając znacząco funkcjonowanie układu immunologicznego.

Innym preparatem, którego zastosowanie w onkologii budzi duże nadzieje jest polisacharydopeptyd uzyskiwany z grzyba *Coriolus versicolor*. W pracy opublikowanej w *Journal of Thermal Biology* [Jędrzejewski i wsp. 2014a] wykazaliśmy jego właściwości immunomodulujące. Preparat ten podawany samodzielnie powoduje zależne od TNF- α obniżenie temperatury ciała. W kolejnej pracy stwierdziliśmy, że podawany razem z pirogenną dawką LPS powoduje zależne od IL-6 wydłużenie czasu trwania gorączki [Jędrzejewski i wsp. 2015].

b. Gorączka i stan zapalny w chorobach neurologicznych

Gorączka towarzysząca udarom mózgu jest zagadnieniem stosunkowo mało poznanym. Nie do końca wiadomo jaka jest jej etiologia. Nasze wyniki wskazują, że jednym z czynników prowadzących do wystąpienia gorączki towarzyszącej udarowi może być hem uwolniony do tkanek mózgu podczas krwotoku [Walentynowicz i wsp. 2006]. Iniekcje hemu powodowały wzrost stężenia PGE₂ w płynie mózgowo-rdzeniowym. W celu jednoznacznego stwierdzenia czy gorączka indukowana hemem jest zależna od PGE₂ zastosowaliśmy przeciwciała anti-PGE₂. Stwierdziliśmy, że rzeczywiście hamują one reakcję gorączkową. Następnie zastosowaliśmy inhibitor cyklooksygenazy, która jest jednym z enzymów szlaku syntezy PGE₂.

Inhibitor ten nie wpłynął na przebieg gorączki, co świadczy, że enzym ten nie jest zaangażowany w mechanizm indukcji gorączki indukowanej hemem. Obserwacja ta tłumaczy, dlaczego wzrost temperatury ciała towarzyszący udarom krwotocznym nie daje się obniżyć za pomocą standardowych niesteroidowych leków przeciwzapalnych, które są inhibitorami cyklooksygenaz.

Problem podwyższonej temperatury ciała podczas udaru mózgu poruszony został w pracy przeglądowej [Wrotek i wsp. 2011b], w której wraz z farmaceutą klinicznym i neurologiem klinicznym zwróciliśmy uwagę na fakt, iż może ona być związana z dwoma różnymi mechanizmami: gorączką lub hipertermią. W pracy podałam zasadnicze różnice pomiędzy tymi dwoma mechanizmami. Przedstawiłam również możliwe warianty etiologii gorączki towarzyszącej udarowi. Wskazałam, że gorączka może mieć podłoże infekcyjne i nieinfekcyjne. Dałam wskazówki, co do możliwości odróżnienia tych dwóch typów gorączki. Ponieważ gorączka towarzysząca udarom jest trudna do obniżenia środkami farmakologicznymi w dalszej części powyższej pracy przeanalizowałam badania kliniczne dotyczące niefarmakologicznych metod chłodzenia ciała za pomocą koców chłodzących z cyrkulacją zimnego powietrza oraz wlewy dożylnie schłodzonej soli fizjologicznej. Dostępne dane literaturowe wskazują, że takie postępowanie może skutecznie obniżyć temperaturę ciała u pacjenta z udarem mózgu.

W latach 2009/10 odbyłam sześciomiesięczny staż naukowy (PostDoc) na Athens University w Auguście (USA). Pracowałam w laboratorium badającym udary mózgu. Podczas stażu opanowałam chirurgiczną technikę indukcji modelu niedokrwiennego udaru mózgu (MCAO, ang. *Middle cerebral artery occlusion*). W trakcie stażu moim zadaniem między innymi było opracowanie procedury pozwalającej na jednoczesną analizę wielu cytokin w jednej próbce. Za pomocą systemu Bioplex 2200 (Bio-Rad) badałam poziom różnych cytokin w mózgu i surowicy krwi u szczurów z udarem mózgu. Efektem tej współpracy jest też praca przeglądowa dotycząca zaburzeń temperatury podczas udaru mózgu [Wrotek i wsp. 2011b] omówiona powyżej.

Po powrocie do kraju jednym z zagadnień, którego badania się podjęłam było stwardnienie rozsiane. Opanowałam technikę indukcji szczurzego modelu

stwardnienia rozsianego (EAE, ang. *Experimental allergic encephalitis*). Umiejętność ta pozwoliła mi przeprowadzić badania zaburzeń temperatury ciała towarzyszących EAE. Część uzyskanych wyników została zaprezentowana przeze mnie w formie wystąpienia ustnego na Międzynarodowym Kongresie Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego (doniesienie nr 30). Następnie wyniki te zostały opublikowane [Wrotek i wsp. 2014a]. Między innymi wykazałam, że 24 godziny przed wystąpieniem pierwszych symptomów EAE widoczny jest charakterystyczny wzrost temperatury ciała, natomiast wystąpieniu objawów towarzyszy obniżenie temperatury ciała. Obserwacje te pozwalają na precyzyjne oszacowanie terminu pojawienia się pierwszych objawów EAE.

Moje badania nad EAE prowadzone były we współpracy z lekarzem neurologiem. Efektem tej współpracy jest też praca przeglądowa [Rosochowicz i wsp. 2015]. Jak wiadomo w wielu schorzeniach neurodegeneracyjnych dochodzi do nieodwracalnego uszkodzenia układu nerwowego. W artykule tym opisujemy białka Nogo-A, MAG i OMgp, które są odpowiedzialne za hamowanie regeneracji ośrodkowego układu nerwowego. Przeanalizowaliśmy także dostępne preparaty o potencjalnych właściwościach znoszących niekorzystne działanie tych białek.

c. Gorączka behawioralna

Reakcja gorączkowa u zwierząt stałocieplnych następuje w wyniku wewnętrznych mechanizmów kumulacji ciepła metabolicznego. U bezkręgowców, które są zwierzętami ektotermicznymi, zmiana temperatury ciała następuje na skutek przejścia do cieplejszej lub chłodniejszej strefy ich niszy ekologicznej. Istnieją prace wskazujące, że organizmy te mogą reagować gorączką behawioralną na czynniki infekcyjne [Kluger 1977; Myhre i wsp. 1977; Lefcort i Eiger 1993], co jest konsekwencją zmian ich preferencji termicznych. Do pomiaru temperatury preferowanej służą urządzenia generujące gradient temperatury. Dysponując takimi urządzeniami rozpoczęliśmy badania nad gorączką u pantofelka (*Paramecium caudatum*). Zdobyte doświadczenie umożliwiło mi wzięcie udziału w badaniach będących częścią grantu „Termiczne preferencje osobników *Planorbarius corneus* jako przejaw adaptacji do inwazji pasożytów”, (Grant NCN# N303 324736;

3247/B/P01/2009/36). W wyniku współpracy z Zakładem Zoologii Bezkręgowców UMK powstała praca oryginalna [Żbikowska i wsp. 2013]. W pracy tej wykazaliśmy, że iniekcje pirogenów takich jak LPS i zymozan do nogi ślimaka *Planorbarius corneus* zmieniają preferencje termiczne zwierzęcia. Ślimaki wybierały wyższą temperaturę w komorze z gradientem termicznym, co odpowiada gorączce u zwierząt endotermicznych. Wykazaliśmy w ten sposób, że *Planorbarius corneus* jest dobrym modelem do badań gorączki behawioralnej u bezkręgowców.

d. Inne badania nad mechanizmem gorączki

Do indukcji modelowej gorączki infekcyjnej najczęściej wykorzystuje się LPS, który jest składnikiem ściany bakterii Gram-ujemnych. Badania Nichani i wsp. (2004) wykazały, że wzrost temperatury ciała wywołują także oligonukleotydy CpG pochodzące z DNA bakteryjnego. Zbadaliśmy molekularny mechanizm gorączki indukowanej syntetycznymi oligonukleotydami CpG-DNA [Kozak i wsp. 2006a]. Stosując myszy z usuniętym genem IL-6 lub NF-κB, myszy z mutacją w genie receptora Toll-like 4 oraz inhibitory kinazy I-κB i cyklooksygenazy-2 (COX-2) porównaliśmy molekularny mechanizm obu gorączek. Stwierdziliśmy, że są one zależne od IL-6, COX-2, PGE₂ i jądrowego czynnika NF-κB. Zidentyfikowaliśmy także różnice pomiędzy nimi. Tylko gorączka indukowana oligonukleotydami CpG-DNA angażowała czynnik IκB oraz receptor Toll-like 4 (jeden z receptorów rozpoznających wzorce patogenów). W 2011 roku BioMedLib (BiomedicalLibrary) umieściła ten artykuł na liście dziesięciu najlepszych artykułów opublikowanych w danej tematyce od 2000 roku.

W latach 2004-2007 byłem wykonawcą w grantie przyznany przez Komisję Europejską (kontrakt MIRG-CT-2004-006152). W związku z tym brałem udział w badaniach nad hipoksją u szczurów laboratoryjnych. Wykazaliśmy, że hipoksja indukuje anoreksję i kacheksję oraz powoduje obniżenie temperatury ciała i aktywności lokomotorycznej. Związane jest to ze wzrostem stężenia IL-6, co potwierdziły nasze badania z wykorzystaniem myszy z usuniętym genem IL-6. Zwierzęta te reagowały słabszym obniżeniem temperatury ciała niż zwierzęta kontrolne. Ponadto zaobserwowaliśmy, że hipoksja hamuje syntezę PGE₂

indukowaną lipopolisacharydem, ale stymuluje syntezę IL-6. W efekcie badane zwierzęta zamiast gorączką reagowały na iniekcje pirogennej dawki LPS znacznym obniżeniem temperatury ciała. Uzyskane wyniki opublikowaliśmy *in extenso* [Kozak i wsp. 2006b]. Również ten artykuł w 2011 roku został umieszczony przez BioMedLib (BiomedicalLibrary) na liście dziesięciu najlepszych artykułów opublikowanych w danej tematyce od 2000 roku.

Znaczna część badań dotyczących mechanizmu gorączki koncentruje się na roli różnych cytokin [Kozak i wsp. 1998; Long i wsp. 1992; Kozak i wsp. 1995; Leon i wsp. 1997]. Głównym źródłem tych cytokin są komórki takie jak limfocyty, monocyty i komórki tuczne [Barret 1996]. Badając myszy pozbawione funkcjonalnych limfocytów T i B (myszy scid) wykazaliśmy, że komórki te nie są niezbędne do indukcji zarówno gorączki endotoksynowej, jak i terpentynowej [Kozak i wsp. 2006c]. Wyniki te wskazują, że fagocytarne komórki linii mieloidalnej odgrywają istotniejszą rolę podczas indukcji gorączki niż limfocyty. Tym samym potwierdziliśmy opinię, że gorączka jest mechanizmem starym ewolucyjnie.

Obok badań mających na celu poznanie mechanizmu gorączki, uczestniczyłam w pracach związanych z charakterystyką pirogenności właściwości nanocząsteczek srebra. Nanocząsteczki srebra są nową generacją czynników antybakteryjnych stosowanych w opatrunkach oraz do pokrywania narzędzi chirurgicznych i protez kości [Sharma i wsp. 2009; Zhou i wsp. 2009]. W związku z tym, że na skutek zranienia jak i zabiegów chirurgicznych może rozwinąć się stan zapalny, niezbędne stało się zbadanie czy same nanocząsteczki srebra wpływają na reakcję gorączkową. W pracy Jędrzejewski i wsp. (2014b) wykazaliśmy, że podanie szczurom medium pochodzącego z hodowli komórek mononuklearnych krwi stymulowanych lipopolisacharydem i dodatkowo nanocząsteczkami srebra indukuje u nich wyższą gorączkę niż u zwierząt, które otrzymały supernatanty uzyskane po stymulacji komórek tylko LPS. Zjawisko to związane jest ze zdolnością nanocząsteczek srebra do nasilania sekrecji IL-1 β w komórkach mononuklearnych krwi, natomiast nie stwierdziliśmy istotnego wpływu nanocząsteczek srebra na produkcję IL-6 i TNF- α stymulowaną lipopolisacharydem.

Wykaz wszystkich moich publikacji oraz opis działań składających się na moją aktywność naukowo-badawczą i dydaktyczną przedstawiłam w załącznikach nr 6 i 7.

LITERATURA

- Adair JC, Knoefel JE, Morgan N (2001) Controlled trial of Nacetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology* 57: 1515-1517.
- Atkins E (1960) Pathogenesis of fever. *Physiol Rev* 40: 580-646.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2007) N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 7(4): 355-9.
- Awasthi YC, Sharma R, Yadav S, Dwivedi S, Sharma A, Awasthi S (2007) The non-ABC drug transporter RLIP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. *Curr Drug Metab* 8(4): 315-23.
- Bains VK, Bains R (2015) The antioxidant master glutathione and periodontal health. *Dent Res J (Isfahan)* 12(5):389-405.
- Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gaudie J, Collins SW (2000) Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 46: 344-349.
- Barrett KE (1996) Cytokines: sources, receptors and signalling. *Baillieres Clin Gastroenterol* 10(1): 1-15.
- Baumann H, Gaudie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* 15(2):74-80.
- Bluthé RM, Michaud B, Poli V, Dantzer R. (2000) Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav* 70(3-4): 367-73.
- Cai Z, Lou Q, Wang F, Li E, Sun J, Fang H, Xi J, Ju L (2015) N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 8(7): 8655-62.
- Caputa M (1977) Mechanism and biological significance of fever. *Postepy Hig Med Dosw* 31(1): 79-94.
- Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, et al. (1994) Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol* 267: 1431-1436.
- Cunha BA (2012) Fever myths and misconceptions: the beneficial effects of fever as a critical component of host defenses against infection. *Heart Lung* 41(1): 99-101.
- Dąbrowska G, Wrotek S, Tretyn A (2002) Technika różnicowego profilowania ekspresji genów w badaniu kultur in vitro. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych* 488: 651-660.
- De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, et al. (1998) Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 41: 1392-1396.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174(5): 1209-1220.
- Delp MD, Evans MV, Duan C (1998) Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer- 344 rats. *Appl Physiol* 85(5): 1813-1822.
- Deml E, Oesterle D (1980) Histochemical demonstration of enhanced glutathione content in enzyme-altered islands induced by carcinogens in rat liver. *Cancer Res* 40(2): 490-1.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV (1986) Tumor necrosis factor (cachectin) is an

- endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *Exp Med* 163(6): 1433-50.
- Dong L, Jin J, Lu Y, Jiang L, Shan X (2015) Fever phobia: a comparison survey between caregivers in the inpatient ward and caregivers at the outpatient department in a children's hospital in China. *BMC Pediatr* 15: 163.
- Estensen RD, Levy M, Klopp SJ, et al. (1999) N-Acetylcysteine suppression of the proliferative index in the colon of patients with previous adenomatous colonic polyps. *Cancer Lett* 147: 109-114.
- Ferreira AP, Pasin JS, Saraiva AL, Ratzlaff V, Rossato MF, Andrighetto R, Rubin MA, Ferreira J, Mello CF (2012) N-Acetylcysteine prevents baker's-yeast-induced inflammation and fever. *Inflamm Res* 61(2): 103-12.
- Foster KD, Conn CA, Kluger MJ (1992) Fever, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in young, mature, and aged Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 262(2 Pt 2): R211-5.
- Gerard C, Bruyins C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T (1993) Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 177: 547-550.
- Ghezzi P (2011) Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int J Gen Med* 4: 105-113
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 257(22): 13704-13712.
- Haddad JE, Safieh-Garabedian B, Saade NE, Land SC (2001) Thiol Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines Reveals a Novel Immunopharmacological Potential of Glutathione in the Alveolar Epithelium. *JPET* 296: 996-1005.
- Haddad JJ, Land SC (2002) Redox/ROS regulation of lipopolysaccharide-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and MAPK-mediated TNF- α biosynthesis. *Br J Pharmacol* 135(2): 520-36.
- Hamzeh N, Li L, Barkes B, Huang J, Canono B, Gillespie M, Maier L, Day B (2016) The effect of an oral anti-oxidant, N-Acetyl-cysteine, on inflammatory and oxidative markers in pulmonary sarcoidosis. *Respir Med* 112: 106-11.
- Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C (2006) Acute infections as a means of cancer prevention: opposing effects to chronic infections? *Cancer Detect Prev* 30(1): 83-93.
- Hopton Cann SA, van Netten JP, van Netten C, Glover DW (2002) Spontaneous regression: a hidden treasure buried in time. *Med Hypotheses* 58(2): 115-9.
- Housby JN, Cahill CM, Chu B, Prevelige R, Bickford K, Stevenson MA, Calderwood SK (1999) Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit the expression of cytokines and induce HSP70 in human monocytes. *Cytokine* 11(5): 347-58.
- Jędrzejewski T, Piotrowski J, Wrotek S, Kozak W (2014a) Polysaccharide peptide induces a tumor necrosis factor- α -dependent drop of body temperature in rats. *J Therm Biol* 44: 1-4.
- Jędrzejewski T, Wrotek S, Piotrowski J, Kozak W (2014b) Silver nanoparticles augment releasing of pyrogenic factors by peripheral blood mononuclear cells stimulated with lipopolisaccharide in vitro. *Central European Journal of Biology* 9(11): 1058-1067.

- Jędrzejewski T, Piotrowski J, Kowalczevska M, Wrotek S, Kozak W (2015)
Polysaccharide peptide from *Coriolus versicolor* induces interleukin 6-related extension of endotoxin fever in rats. *Int J Hyperthermia* 31(6): 626-634.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13(1): 24-8.
- Kil IS, Kim SY, Park JW (2008) Glutathionylation regulates I κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 373(1): 169–73.
- Kleef R, D. Hager D (2006) Fever, pyrogens and cancer. w: Baronzio GF, Hager ED *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer*. Springer Science and Business Media. New York. pp. 276-337.
- Kluger MJ (1977) Fever in the frog *Hyla cinerea*. *J Therm Biol* 2: 79-81.
- Kluger MJ, Kozak W, Leon LR, Soszynski D, Conn CA (1995) Cytokines and fever. *Neuroimmunomodulation* 2(4): 216-23.
- Kluger MJ, Kozak W, Conn CA, Leon LR, Soszynski D (1996) The adaptive value of fever. *Infect Dis Clin North Am* 10(1): 1-20.
- Kluger MJ, Kozak W, Conn CA, Leon LR, Soszynski D (1998) Role of fever in disease. *Ann N Y Acad Sci*. 856: 224-33.
- Kowalczevska M, Wrotek S, Jędrzejewski T, Kozak W (2010) Cancer cachexia: mediating factors and the effect of eicosapentaenoic acid dieting. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 4(2): 108-111.
- Kowalczevska M, Brożyna A, Jóźwicki W, Pławski K, Przybyszewski M, Wrotek S, Bartuzi Z, Kozak W (2014) Analysis of the involvement of cytokines in allergy and breast cancer association. *Contemp Oncol* 18(6): 396–402.
- Kozak W (2009) Geneza gorączki. Biologiczne mechanizmy i praktyka medyczna. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. s. 327.
- Kozak W, Conn CA, Klir JJ, Wong GH, Kluger MJ (1995) TNF soluble receptor and antiserum against TNF enhance lipopolysaccharide fever in mice. *Am J Physiol* 269(1 Pt 2): R23-9.
- Kozak W, Poli V, Soszynski D, Conn CA, Leon LR, Kluger MJ (1997) Sickness behavior in mice deficient in interleukin-6 during turpentine abscess and influenza pneumonitis. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2): R621-30.
- Kozak W, Kluger MJ, Soszynski D, Conn CA, et al. (1998) IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann N Y Acad Sci* 856: 33-47.
- Kozak W, Kluger MJ, Tesfaigzi J, Kozak A, Mayfield KP, Wachulec M, Dokladny K (2000) Molecular mechanisms of fever and endogenous antipyresis. *Ann N Y Acad Sci*. 917: 121-34.
- Kozak W, Wrotek S, Kozak A (2006a) Pyrogenicity of CpG-DNA in mice: Role of interleukin-6, cyclooxygenases, and nuclear-factor-kappa-B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(4): R871-80.
- Kozak W, Wrotek S, Walentynowicz K (2006b) Hypoxia-induced sickness behaviour. *J Physiol Pharmacol* 57: 35-50.
- Kozak W, Wrotek S, Walentynowicz K, Waszak P (2006c) Fever and symptoms of sickness are present in mice lacking functional B and T lymphocytes. *Acta Biologica Cracoviensis* 48: 9-20.
- Kudo I, Murakami M (2005) Prostaglandin E Synthase, a Terminal Enzyme for Prostaglandin E2 Biosynthesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(6): 633-8.

- Laurence JZ (1855) The diagnosis of surgical bladder cancer. (The Liston Prize Essay for 1854). London, Churchill 1855.
- Ledeboer A, Brevé JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM (2000) Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia* 30 (2): 134–142.
- Ledeboer A, Binnekade R, Breve JJ, Bol JG, Tilders FJ, Van Dam AM (2002) Site-specific modulation of LPS-induced fever and interleukin-1 beta expression in rats by interleukin-10. *Am J Physiol* 282: R1762–R1772.
- Lee JJ, Huang WT, Shao DZ, Liao JF, Lin MT (2003) Blocking NF-kappaB activation may be an effective strategy in the fever therapy. *Jpn J Physiol* 53(5): 367-75.
- Lefcort H, Eiger SM (1993) Antipredatory behaviour of feverish tadpoles: implications for pathogen transmission. *Bahaviour* 126: 13-27.
- Leon LR, Kozak W, Peschon J, Kluger MJ (1997) Exacerbated febrile responses to LPS, but not turpentine, in TNF double receptor-knockout mice. *Am J Physiol* 272(2 Pt 2): R563-9.
- Liu RM, Choi J (2000) Age-associated decline in c-glutamylcysteine synthetase gene expression in rats. *Free Radic Biol Med* 28: 566–574.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM (2004) Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N Y Acad Sci* 1019: 346–349.
- Long NC, Morimoto A, Nakamori T, Murakami N (1992) Systemic injection of TNF-alpha attenuates fever due to IL-1beta and LPS in rats. *Am J Physiol* 263: R987-R991.
- Mikolka P, Kopincova J, Mikusiakova LT, Kosutova P, Calkovska A, Mokra D (2016) Antiinflammatory Effect of N-Acetylcysteine Combined with Exogenous Surfactant in Meconium-Induced Lung Injury. *Adv Exp Med Biol* 934: 63-75.
- Milton AS (1989) Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. *Ann N Y Acad Sci* 559: 392-410.
- Miura M, Sasaki T (1991) Role of glutathione in the intrinsic radioresistance of cell lines from a mouse squamous cell carcinoma. *Radiat Res* 126(2): 229-36.
- Mosoni L, Breuille D, Buffie`re C, Obled C, Mirand PP (2004) Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp Gerontol* 39(2): 203–210.
- Myhre K, Cabanac M, Myhre G (1977) Fever and behavioural temperature regulation in the frog *Rana esculenta*. *Acta Physiol Scand* 101: 219-229.
- Nava F, Calapai G, Facciola G, Cuzzocrea S, Marciano MC, De Sarro A, Caputi AP (1997) Effects of interleukin-10 on water intake, locomotory activity, and rectal temperature in rat treated with endotoxin. *Int J Immunopharmacol* 19: 31–38.
- O'Dwyer PJ, Hamilton TC, LaCreta FP, Gallo JM, Kilpatrick D, Halbherr T, Brennan J, Bookman MA, Hoffman J, Young RC, et al. (2011) Phase I trial of buthionine sulfoximine in combination with melphalan in patients with cancer. *J Clin Oncol* 14: 249-256.
- Ogoina D (2011) Fever, fever patterns and diseases called 'fever'—a review. *J Infect Public Health* 4 (3): 108–124.

- Ortiz MS, Forti KM, Suárez Martínez EB, Muñoz LG, Husain K, Muñiz WH (2016) Effects of Antioxidant N-acetylcysteine Against Paraquat-Induced Oxidative Stress in Vital Tissues of Mice. *Int J Sci Basic Appl Res* 26(1): 26-46.
- Page TH, Turner JJ, Brown AC, Timms EM, Inglis JJ, Brennan FM, Foxwell BM, Ray KP, Feldmann M (2010) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase TNF production in rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood. *J Immunol* 5;185(6): 3694-701.
- Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M (1994) Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 169–175.
- Persson M, Mikulowska A, Narula S, O'Garra A, Holmdahl R (1996) Interleukin- 10 suppresses the development of collagen type II-induced arthritis and ameliorates sustained arthritis in rats. *Scand J Immunol* 44: 607–614.
- Pirabbasi E, Shahar S, Manaf ZA, Rajab NF, Manap RA (2016) Efficacy of Ascorbic Acid (Vitamin C) and/N-Acetylcysteine (NAC) Supplementation on Nutritional and Antioxidant Status of Male Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Patients. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 62(1): 54-61.
- Plummer JL, Smith BR, Sies H, Bend JR (1981) Chemical depletion of glutathione in vivo. *Methods Enzymol* 77: 50–59.
- Rosochowicz TW, Wrotek S, Kozak W (2015) Axonal regeneration inhibitors: emerging therapeutic options. *Acta Neurol Belg* 115(4): 527-32.
- Roth J, Blatteis CM (2014) Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. *Compr Physiol* 4(4): 1563-604.
- Rott O, Fleischer B, Cash E (1994) Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24: 1434–1440.
- Seidel P, Merfort I, Hughes JM, Oliver BG, Tamm M, Roth M (2009) Dimethylfumarate inhibits NF-κB function at multiple levels to limit airway smooth muscle cell cytokine secretion. *Am J Physiol* 297: L326–39.
- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y (2009) Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci* 145(1-2): 83-96.
- Soszyński D (2004) „Sickness behavior” - mechanizmy powstania i znaczenie. *Postepy Hig Med Dosw* 58: 74-82.
- Sunahara GI, Chiesa A (1992) Phorone (diisopropylidene acetone), a glutathione depletor, decreases rat glucocorticoid receptor binding in vivo. *Carcinogenesis* 13(7): 1083-9.
- Traber J, Suter M, Walter P, Richter C (1992) In vivo modulation of total and mitochondrial glutathione in rat liver. Depletion by phorone and rescue by N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol* 43(5): 961-4.
- Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C (2013) Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 972913.
- Turkyilmaz S, Usta A, Cekic AB, Alhan E, Kural BV, Ercin C (2016) N-acetylcysteine amid reduces pancreatic damage in a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *J Surg Res* 203(2): 383-9.
- Van Laethem JL, Marchant A, Delvaux A, Goldman M, Robberecht P, Velu T, Deviere J (1995) Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 108: 1917–1922.

- Vogelaere P, Pereira C (2005) Thermoregulation and aging. *Rev Port Cardiol* 24(5): 747-61.
- Walentynowicz K, Szefer M, Wojtal B, Terlecki P, Wrotek S, Kozak W (2006) Role of prostaglandins in heme-induced fever. *J Physiol Pharmacol* 57: 73-82.
- Wrotek S, Tyburski J, Dąbrowska G, Tretyn A (2002) Badania nad bezpośrednią regeneracją P. nil. *Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych* 488: 661-666.
- Wrotek S, Dąbrowska G, Tretyn A (2005) Czy istnieje roślinny homolog zwierzęcego peptydu natriuretycznego? *Postępy Biologii Komórki* 32(3): 449-462.
- Wrotek S, Dąbrowska G, Tyburski J, Tretyn A (2006)** There is no proof for the existence of a trial natriuretic peptide (ANP) homologue in a plant *Pharbitis nil*. *Med. Biol Sci* 20(4): 181-186.
- Wrotek S, Kamecki K, Kwiatkowski S, Kozak W (2009) Cancer patients report a history of fewer fevers during infections than healthy controls. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 3: 031-035.
- Wrotek S, Jędrzejewski T, Potera-Kram E, Kozak W (2011a)** Antipyretic activity of N-acetylcysteine. *J Physiol Pharmacol* 62(6): 669-675.
- Wrotek S, Kozak W, Hess D, Fagan SC (2011b) Fever after stroke: conflicting evidence. *Pharmacotherapy* 31(11): 1085-91.
- Wrotek S, Rosochowicz T, Nowakowska A, Kozak W (2014a) Thermal and motor behavior in experimental autoimmune encephalitis in Lewis rats. *Autoimmunity* 47(5): 334-40.
- Wrotek S, Skawiński R, Kozak W (2014b) Immunostymulujące właściwości ekstraktów z jemioli i ich zastosowanie w onkologii. *Postępy Hig Med Dosw* 68: 1216-24.
- Wrotek S, Jędrzejewski T, Nowakowska A, Kozak W (2015)** Glutathione deficiency attenuates endotoxic fever in rats. *International Journal of Hyperthermia* 31(7): 793-9.
- Wrotek S, Jędrzejewski T, Nowakowska A, Kozak W (2016b)** LPS alters pattern of sickness behavior but does not affect glutathione level in aged male rats. *Biogerontology* 17(4): 715-23.
- Wrotek S, Jędrzejewski T, Piotrowski J, Kozak W (2016a)** N-acetyl-L-cysteine exacerbates generation of IL-10 in cells stimulated with endotoxin in vitro and produces antipyresis via IL-10 dependent pathway in vivo. *Immunology Letters* 177: 1-5.
- Wrotek S, Domagalski K, Jędrzejewski T, Dec E, Kozak W (2017)** Buthionine sulfoximine, a glutathione depletor, attenuates endotoxic fever and reduces IL-1 β and IL-6 level in rats. *Cytokine* 90: 31-37.
- Zhou M, Wei Z, Qiao H, Zhu L, Yang H, Xia T (2009) Particle size and pore structure characterization of silver nanoparticles prepared by confined arc plasma. *J Nanomater* 1-5. DOI: 10.1155/2009/968058
- Żbikowska E, Wrotek S, Cichy A, Kozak W (2013) Thermal preferences of wintering snails *Planorbium corneum* (L.) exposed to lipopolysaccharide and zymosan. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: 57-61.

Sylvia Wrotek